

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Instituto de Ciencias Agrícolas



**ADICIÓN DE DL-METIONINA Y SU HIDROXIANÁLOGO A
DIETAS PARA CERDOS EN ESTRÉS POR CALOR:
RENDIMIENTO, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, MORFOLOGÍA
INTESTINAL Y EXPRESIÓN GÉNICA**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA

SINDY JAZMÍN PÉREZ MEJÍA


DIRECTOR


Ph. D. MIGUEL CERVANTES RAMÍREZ


La presente tesis titulada “Adición de DL-metionina y su hidroxianálogo a dietas para cerdos en estrés por calor: rendimiento, actividad antioxidante, morfología intestinal y expresión génica”, realizada por la C. Sindy Jazmín Pérez Mejía, dirigida por el Ph. D. Miguel Cervantes Ramírez, ha sido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:


**MAESTRO EN CIENCIAS EN SISTEMAS
DE PRODUCCIÓN ANIMAL**

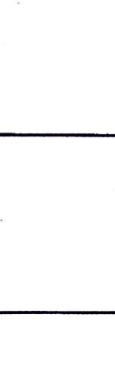
Comité particular

Director 
Ph. D. Miguel Cervantes Ramírez

Co-Director 
Dr. Hugo Bernal Barragán

Sinodal 
Dra. Adriana Morales Trejo

Sinodal 
Dra. Reyna Lucero Camacho Morales

Sinodal 
Dr. Ernesto Avelar Lozano

“POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE”

Mexicali, Baja California, México; febrero de 2022

AGRADECIMIENTOS

A:

Ph. D. Miguel Cervantes Ramírez, por compartir sus conocimientos, por la oportunidad y la confianza para la realización de este proyecto de investigación.

Dra. Adriana Morales Trejo, por brindarme su apoyo y consejos durante la realización de los análisis de laboratorio, por su asesoría y dirección para la redacción de esta tesis.

Dr. Hugo Bernal Barragán, por la oportunidad de poder llevar a cabo este trabajo experimental en la UANL y por brindarme su apoyo cada vez que lo necesité.

Dra. Reyna Lucero Camacho Morales, por los conocimientos compartidos y el apoyo brindado durante la realización de este proyecto.

Dr. Ernesto Avelar Lozano, por brindarme su apoyo, sus conocimientos y por las sugerencias para la redacción de este documento de tesis.

Dr. Néstor Arce Vázquez, por el apoyo en la conducción del trabajo experimental y por los conocimientos impartidos.

Dra. Nydia Vásquez, por su apoyo para procesar las muestras de histología intestinal de este trabajo; por brindarme de su tiempo y conocimientos para realizar las mediciones.

A mis compañeros del Cuerpo Académico de Nutrición Animal, Bayron Pérez, Verónica Sánchez, Estela Montoya, Cecilia Hernández, Fernanda González, Alan Valle, por su apoyo y amistad.

A la Universidad Autónoma de Baja California y al Instituto de Ciencias Agrícolas, por brindarme la oportunidad de continuar con mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el financiamiento otorgado para la realización de mis estudios de posgrado.

DEDICATORIA

*A **Dios**, por permitirme llegar a este momento tan especial de mi vida; por cuidar de mí en todo momento, guiarme e iluminarme en este camino de experiencias inolvidables, lleno de retos, logros y alegrías; a Él, por fortalecer mi alma y mi espíritu en los momentos difíciles y por brindarme la sabiduría necesaria para alcanzar con éxito esta meta.*

*A **mis padres y hermanas**, que son parte fundamental en todo este proceso; por ser un pilar esencial en mi vida, un gran ejemplo a seguir; por brindarme su apoyo incondicional, su amor y sus consejos siempre; mis palabras no bastarían para agradecer todo lo que han hecho por mí.*

*A **mis sobrinos**, por hacerme una tía muy feliz.*

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	iv
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	3
III. OBJETIVOS	4
3.1 General	4
3.2 Específicos	4
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	5
4.1 Estrés por calor en la producción porcina	5
4.2 Estrés oxidativo	6
4.3 Importancia de la suplementación de aminoácidos	8
4.4 Metionina, AA funcional	9
4.5 Anatomía y fisiología del intestino delgado	12
4.6 Digestión y absorción de aminoácidos	14
4.7 Transporte de aminoácidos	16
4.7.1 <i>Sistemas de transporte</i>	17
V. MATERIALES Y MÉTODOS	18
5.1 Lugar del experimento	18
5.2 Animales y manejo	18

5.3 Dietas y tratamientos experimentales	19
5.4 Recolección de muestras	20
5.5 Análisis de laboratorio	21
5.5.1 Análisis de actividad enzimática.....	21
5.5.1.1 Actividad de superóxido dismutasa.....	22
5.5.1.2 Actividad de glutatión peroxidasa.....	22
5.5.1.3 Actividad de catalasa.....	22
5.5.1.4 Actividad de glutatión.....	23
5.6 Análisis histomorfológico	24
5.6.1 Medición de altura de vellosidades y profundidad de la cripta.....	24
5.7 Extracción y purificación total de ARN	25
5.8 Transcripción reversa	26
5.9 PCR cuantitativa (qPCR)	27
5.10 Análisis estadístico	29
VI. RESULTADOS	30
6.1. Temperatura ambiental y humedad relativa	30
6.2 Índice de temperatura y humedad	31
6.3. Parámetros productivos.....	31
6.6 Actividad enzimática	33
6.6.1 Superóxido dismutasa	33
6.6.2 Glutatión peroxidasa	33
6.6.3 Catalasa	34
6.6.4 Glutatión.....	35
6.4 Morfología intestinal.....	36
6.5 Expresión de transportadores de aminoácidos	39
VII. DISCUSIÓN.....	42

VIII. CONCLUSIONES 51
IX. LITERATURA CITADA 52

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición de ingredientes de las dietas experimentales.....	20
Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados para análisis de PCR cuantitativo de ARNm derivados de transportadores de aminoácidos (B ⁰ , b ^{0,+}) y RPL4.	28
Cuadro 3. Parámetros de comportamiento productivo de los cerdos bajo condiciones de EC alimentados con metionina extra como DL-Met o MHA.....	32
Cuadro 4. Concentración de enzimas antioxidantes en suero sanguíneo de cerdos alimentados con metionina extra como DL-Met o MHA bajo condiciones de estrés por calor.....	36
Cuadro 5. Histomorfología de duodeno, yeyuno e íleon de cerdos expuestos a condiciones de estrés por calor alimentados con Met extra como DL-Met o MHA.....	38
Cuadro 6. Análisis del ΔC_t de la expresión del ARNm de los transportadores de aminoácidos B ⁰ y b ^{0,+} en intestino delgado de cerdos bajo condiciones de estrés por calor alimentados con metionina extra como DL-Met o MHA.....	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Vías del metabolismo de metionina a través de transmetilación, remetilación, transsulfuración y transaminación (Adapatado de Mastrototaro et al., 2016).....	10
Figura 2. Ilustración representativa de la anatomía de la pared y epitelio del intestino delgado (Adapatado de Yen, 2000).	13
Figura 3. Mecanismo de absorción y transporte de aminoácidos y péptidos transmembrana por el enterocito (Adaptado de Krehbiel y Matthews, 2003).....	16
Figura 4. Ejemplo de medición de la altura de la vellosidad (flecha amarilla) y profundidad de cripta (flecha negra), de un corte histológico de intestino delgado (íleon) (Adaptado de Alshamy et al., 2018).....	25
Figura 5. Temperatura ambiental (°C) y humedad relativa (%), valores registrados diariamente a intervalos de 10 minutos durante las 24 h del día con la ayuda de un higrotermógrafo.	30
Figura 6. Variación del índice de temperatura y humedad durante las 24 h del día. Los valores mostrados para cada hora corresponden al promedio de los datos obtenidos durante el periodo experimental.....	31
Figura 7. Actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) en suero sanguíneo de cerdos bajo condiciones de EC.....	33
Figura 8. Actividad enzimática de glutatión peroxisada (GPx) en suero sanguíneo de cerdos bajo condiciones de EC.....	34
Figura 9. Actividad enzimática de catalasa (CAT) en suero sanguíneo de cerdos bajo condiciones de EC.....	34
Figura 10. Actividad enzimática de glutatión (GSH) en suero sanguíneo de cerdos bajo condiciones de EC.....	35
Figura 11. Expresión relativa de los transportadores de aminoácidos B ⁰ y b ^{0,+} , en los segmentos de intestino delgado duodeno, yeyuno e íleon de cerdos alimentados con metionina extra como DL-Met o MHA bajo condiciones de estrés por calor.	40

ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos
EC	Estrés por calor
ZT	Zona Termoneutral
TA	Temperatura ambiente
HR	Humedad relativa
G:C	Relación ganancia de peso: consumo de alimento
ROS	Especies reactivas de oxígeno
CDA	Consumo diario de alimento
GDP	Ganancia diaria de peso
G:C	Relación ganancia de peso: consumo de alimento
Met	Metionina
MHA	Hidroxianálogo de metionina
Lis	Lisina
Cis	Cisteína
Tre	Treonina
SOD	Superóxido dismutasa
GPX	Glutación peroxidasa
CAT	Catalasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado
ATP	Adenosina trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
B ⁰	Transportador de AA neutros dependiente de sodio
b ^{0,+}	Transportador de AA catiónicos y neutros, independiente de sodio
RT	Transcripción reversa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativo
dNTP's	Desoxirribonucleótidos trifosfatados
kg	Kilogramo
μl	Microlitro
ml	Mililitro

RESUMEN

La exposición de cerdos a temperatura ambiente elevada provoca estrés por calor (EC), lo que puede afectar la función celular reduciendo la capacidad de digestión y absorción de nutrientes. Se realizó un experimento adicionando metionina a la dieta en forma de DL-metionina (DL-Met) e hidroxianálogo de metionina (MHA) para evaluar el efecto sobre los parámetros productivos, la actividad antioxidante, histomorfología intestinal y expresión de transportadores de aminoácidos en intestino delgado de cerdos expuestos a condiciones de estrés por calor. Se utilizaron 36 cerdos (27.4 ± 0.6 kg), distribuidos en tres tratamientos, una dieta testigo y dos dietas con 20% extra de metionina una como DL-Met y otra como MHA. Durante el experimento de 21 días, el alimento y agua se proporcionaron *ad libitum*, al día 18 se tomaron muestras de sangre y al día 21 los cerdos fueron sacrificados y se recolectaron muestras de mucosa intestinal de duodeno yeyuno e íleon. La temperatura ambiente fluctuó entre 24.1 a 34.6 °C. No hubo diferencias ($P > 0.05$) en el consumo de alimento entre tratamientos, sin embargo, la ganancia diaria de peso tendió a incrementar ($P < 0.10$) y se mejoró la relación ganancia/consumo ($P < 0.05$) en los cerdos que recibieron los tratamientos DL-Met y MHA. La actividad antioxidante de superóxido dismutasa y glutatión se incrementó ($P < 0.05$) con la adición de Met. La altura de vellosidades se incrementó en yeyuno e íleon ($P < 0.01$), la profundidad de las criptas disminuyó en duodeno y yeyuno ($P < 0.01$) y la relación altura de vellosidad/profundidad de cripta mejoró en duodeno yeyuno e íleon ($P < 0.01$). La expresión relativa del transportador B⁰ no fue diferente entre tratamientos ($P > 0.05$); la expresión del transportador b^{0,+} incrementó en los cerdos que recibieron la dieta con adición de extra de DL-Met en comparación los que recibieron la dieta con adición de MHA ($P < 0.05$). En conclusión, la adición de Met permite la recuperación de la ganancia diaria de peso y mejora la eficiencia alimenticia, incrementa la actividad antioxidante y contribuye a recuperar la histomorfología intestinal y además afecta la expresión del transportador b^{0,+} en yeyuno de cerdos expuesto a condiciones de estrés por calor.

Palabras clave: Metionina, Estrés por calor, Antioxidantes, Transportadores, Aminoácidos, Histomorfología

ABSTRACT

Exposing pigs to high ambient temperatures causes heat stress (HS), which can affect cell function, reducing the ability to digest and absorb nutrients. An experiment was carried out adding methionine to the diet in the form of DL-methionine (DL-Met) and methionine hydroxy analog (MHA) to evaluate the effect on production parameters, antioxidant activity, histomorphological characteristics and the expression of amino acid transporters in the small intestine of pigs exposed to heat stress conditions. Thirty-six pigs (27.4 ± 0.6 kg) were used, distributed in three treatments, a control diet and two diets with 20% extra methionine in the form of DL-Met and MHA. The experiment lasted 21 days, feed and water were provided ad libitum, on day 18 blood samples were taken and on day 21 the pigs were sacrificed and samples of intestinal mucosa from the duodenum, jejunum and ileum were collected. The room temperature was recorded, it fluctuated between 24.1 to 34.6 °C. There were no differences ($P>0.05$) in feed intake between treatments, however, daily weight gain tended to increase ($P<0.10$) and gain/feed ratio improved ($P<0.05$) in pigs receiving DL-Met and MHA treatments. The antioxidant activity of superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) increased ($P<0.05$) with the extra addition of Met. Villus height increased in jejunum and ileum ($P<0.01$), crypt depth decreased in duodenum and jejunum ($P<0.01$) and villus height/crypt depth ratio improved in duodenum, jejunum and ileum ($P<0.01$). The relative expression of transporter B⁰ was not different between treatments ($P>0.05$); the expression of transporter b^{0,+} increased in pigs that received the diet with extra addition of DL-Met compared to those that received the diet with extra addition of MHA ($P<0.05$). In conclusion, the extra addition of Met allows the recovery of daily weight gain and improves feed efficiency, increases antioxidant activity and contributes to the recovery of intestinal histomorphology, and also affects the expression of transporter b^{0,+} in the jejunum of pigs exposed to heat stress conditions.

Keywords: Methionine, Heat stress, Antioxidants, Transporters, Amino acids, Histomorphology

I. INTRODUCCIÓN

El calentamiento global, ha hecho cada día más evidente la aparición del calor extremo durante el verano, este problema ha afectado de forma importante a la producción ganadera en países como México y principalmente en la zona norte donde las temperaturas máximas fluctúan entre 38°C y 50°C (Schwartz y Randall, 2003), estas condiciones aumentan la susceptibilidad de animales como los cerdos al estrés por calor severo (Yu et al., 2010) influyendo de manera directa en la salud y en el crecimiento de los animales (Leon et al., 2005).

El estrés por calor es considerado un factor importante en la producción porcina, ya que es responsable de provocar alteraciones fisiológicas, metabólicas y de comportamiento en los animales (Huynh et al., 2005); bajo condiciones de estrés por calor se incrementan considerablemente las constantes fisiológicas de los animales como, la temperatura corporal, frecuencia respiratoria y frecuencia cardiaca (Lacetera et al., 2003; Patience et al., 2005; Pearce et al., 2014), razones por las cuales el animal modifica su metabolismo y el uso de nutrientes para mantener su homeostasis (Baumgard y Rhoads, 2013) y en consecuencia reduce el consumo de alimento. Además el flujo sanguíneo se redirecciona de los órganos internos a la periferia para favorecer la pérdida de calor (Collin et al., 2001; Renaudeau, 2016).

Por otra parte, el estrés por calor afecta el epitelio del tracto gastrointestinal de los cerdos, provocando daños en las vellosidades intestinales (Yu et al., 2010), así como en la mucosa del epitelio intestinal, sitio responsable del transporte y absorción de nutrientes (Liu et al., 2009). Es de gran importancia mantener la integridad del epitelio que recubre el tracto gastrointestinal, de manera que sus funciones de transporte y absorción de nutrientes no se vean afectadas (Leon et al., 2005).

Estudios previos sugieren que adicionar aminoácidos libres a la dieta de los cerdos superiores al nivel recomendado (NRC, 2012) pudiera reducir el impacto de los efectos del estrés por calor (Cervantes et al., 2016), creando modificaciones celulares y

moleculares que conllevan a una aclimatación ante condiciones de estrés por calor (Liu et al., 2018; Patience et al., 2005; Yu et al., 2010). Por ejemplo, metionina es un aminoácido esencial con funciones antioxidantes, que actúa para mitigar los efectos nocivos de las especies reactivas de oxígeno en las células (Levine et al., 1996). Además de participar en la síntesis de glutatión, tiene un efecto protector directo contra el estrés oxidativo (Levine et al., 2000; Swennen et al., 2011).

La suplementación de metionina como aminoácido libre se puede proporcionar como DL-Metionina o su hidroxianálogo (MHA) para optimizar el crecimiento de los cerdos (Martín-Venegas et al., 2006a). Además, al ser precursores de cisteína y glutatión (Martín-Venegas et al., 2006a; Métayer et al., 2008), actúan como antioxidante no enzimático, un mecanismo de defensa celular de cerdos frente a condiciones de estrés por calor (Espinosa et al., 2021).

La acción de la suplementación con MHA sobre la actividad de los componentes antioxidantes está relacionada con el sistema del glutatión (Willemsen et al., 2011). Sin embargo, el efecto de la suplementación con MHA sobre la acción de otras vías antioxidantes aún no está del todo claro (Gasparino et al., 2018). El MHA a diferencia de DL-Met tiene un grupo hidroxilo en el carbono alfa en lugar de un grupo amino, esta diferencia podría reflejar efectos en los mecanismos de absorción, transporte y metabolismo en los tejidos, ya que debe pasar una serie de transformaciones metabólicas para ser utilizada por el animal (Dibner, 2003; Martín-Venegas et al., 2006a).

En consecuencia, se considera que adicionar ambas fuentes de metionina en dietas para cerdos en crecimiento bajo condiciones de estrés por calor podría tener algún efecto significativo a nivel celular (Luo y Levine, 2009; Reddy et al., 1994). Por lo tanto, este trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la adición de dos fuentes de metionina, DL-metionina (DL-Met) y su hidroxianálogo (MHA) en dietas para cerdos en estrés por calor sobre, los parámetros productivos, la actividad antioxidante, la integridad del epitelio intestinal y la expresión de transportadores de aminoácidos.

II. HIPÓTESIS

La adición de DL-metionina (DL-Met) y del hidroxianálogo de metionina (MHA) a niveles superiores a los recomendados a dietas para cerdos en crecimiento bajo condiciones de estrés por calor, afecta el rendimiento productivo, la actividad antioxidante, la integridad del epitelio intestinal y la expresión de transportadores de aminoácidos.

III. OBJETIVOS

3.1 General

Evaluar el efecto de la suplementación extra de DL-Met y de MHA a dietas para cerdos en crecimiento en condiciones de estrés por calor, sobre los parámetros productivos, la actividad de enzimas antioxidantes, la integridad del epitelio intestinal y la expresión de transportadores de aminoácidos.

3.2 Específicos

Analizar las condiciones ambientales de temperatura, humedad relativa e índice de temperatura-humedad bajo las que se llevó a cabo el experimento.

Evaluar el efecto de la suplementación de metionina extra en la dieta (DL-Met y MHA) de cerdos bajo condiciones de estrés por calor sobre:

El consumo diario de alimento, ganancia diaria de peso y eficiencia alimenticia.

La actividad antioxidante de superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa y glutatión en suero sanguíneo.

Las características histomorfológicas de la mucosa en los tres segmentos (duodeno, yeyuno e íleon) del intestino delgado.

La expresión relativa de los transportadores de aminoácidos (B^0 y $b^{0,+}$) en el intestino delgado.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Estrés por calor en la producción porcina

La producción porcina hoy en día presenta grandes desafíos, debido a que son muchos los factores que influyen en su comportamiento de alimentación, incluidos el género, la raza, la temporada y factores estresantes (Cross et al., 2020). Además, condiciones ambientales como las ocurridas durante el verano cuando la temperatura ambiental supera su temperatura de confort, provocan una reducción en el consumo de alimento, y por tanto reducción en los parámetros productivos así como modificaciones en la fisiología de los cerdos (Collin et al., 2001).

Las altas temperaturas dificultan a los animales regular su temperatura interna para mantenerla dentro de límites ideales para su especie, y como resultado se produce el estrés por calor (EC) (Zhao et al., 2018). Este se define como una serie de alteraciones en la fisiología, metabolismo y comportamiento de animales expuestos a una alta temperatura ambiente (Horowitz y Robinson, 2007), así también a este estado se suman todos aquellos factores ambientales que afectan el estado normal de bienestar del animal (Rivier y Rivest, 1991). Para responder a los desafíos térmicos, los animales reducen la ingesta de alimento, y modifican muchas de sus actividades fisiológicas, las cuales repercuten en su eficiencia productiva, reproductiva, así como en su estado de salubridad (Lacetera et al., 2003).

A temperaturas mayores a los 25 °C, los mecanismos fisiológicos de adaptación de los animales incluyen la disipación de calor mediante el jadeo, incremento de la frecuencia respiratoria y cardiaca (Huynh et al., 2005; Le Bellego et al., 2002; Pearce et al., 2013), y redirección de la circulación sanguínea hacia la periferia, con la finalidad de eliminar calor por convección (Baumgard y Rhoads, 2013).

De acuerdo con Black et al., (1993), incrementos en la temperatura ambiente que sobrepasen la zona termoneutral (entre 15 y 20 °C) se asocian con una disminución del

nivel de ingesta voluntaria de alimentos, y reducen el rendimiento productivo (Cervantes et al., 2016). Tal reducción depende de la magnitud y la duración del estrés por calor (Renaudeau et al., 2008), aunque también influyen otros factores involucrados en la disponibilidad celular de nutrientes (Morales et al., 2014).

La reducción en el consumo voluntario de alimento (CVA) es el primer signo de en cerdos en crecimiento y finalización expuestos a EC (Huynh et al., 2005). La disminución de CVA se traduce en una menor disponibilidad de nutrientes para el animal, especialmente aminoácidos (AA). De acuerdo con Pearce et al., (2014), esta disminución oscila entre un 20% y un 40% en relación a los valores estimados del (NRC, 2012), y como consecuencia de ello, la velocidad de crecimiento se reduce (Baker, 2004).

La reducción drástica en la ingesta de alimento y nutrientes específicos como aminoácidos (AA), en animales bajo condiciones de EC podría ser corregida con su suplementación (p. ej., aminoácidos libres) en la dieta de animales bajo condiciones de estrés por calor (Morales et al., 2018).

4.2 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo resulta de una mayor producción de radicales libres o especies reactivas de oxígeno (ROS), y una disminución en la defensa antioxidante (Ganaie et al., 2013). La oxidación es esencial para que la mayoría de las células del cuerpo proporcionen energía para funciones vitales (Trevisan et al., 2001; Williams et al., 2004); durante el metabolismo aeróbico aproximadamente del 95 al 98% del oxígeno consumido se reduce a agua, el porcentaje restante se convierte en subproductos oxidativos como ROS, que pueden dañar el ADN de los genes (Ganaie et al., 2013).

El estrés por calor es una de las principales causas de estrés oxidativo en los animales durante el verano (Ganaie et al., 2013; Nisar et al., 2013), ya que bajo estas condiciones se provoca un incremento en la concentración de radicales (Bernabucci

et al., 2002; Lord-Fontaine y Averill-Bates, 2002) que provocan daños a nivel celular y mitocondrial (Balasaheb y Pal, 2015; Bernabucci et al., 2002) .

De acuerdo con Ganaie et al., (2013) la respuesta después de la exposición al calor y al EC, es similar al estrés oxidativo en cuanto a la producción de proteínas de choque térmico y enzimas antioxidantes, en comparación con genes expresados después de la exposición a agentes oxidantes.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), son moléculas reactivas y radicales libres derivadas del oxígeno molecular. Pueden existir de forma independiente con uno o más electrones desapareados (Handa et al., 2016; Montilla et al., 2014). La cadena respiratoria mitocondrial es el principal sitio de formación de ROS (Pudlarz et al., 2020). El estrés por calor agudo provoca un aumento en la concentración de ROS en las mitocondrias musculares; altas concentraciones de radicales libres y sistemas celulares de desintoxicación saturados de ROS pueden inducir daño celular a través de senescencia celular o muerte celular. La senescencia celular induce la autofagia y la detención del ciclo celular, mientras que la muerte celular se produce por necrosis o apoptosis (Romano et al., 2017).

Sin embargo, la célula posee sistemas de desintoxicación en el cual se activan antioxidantes enzimáticos endógenos, tales como superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) (Martínez et al., 2017), que son el principal recurso antioxidante de los diferentes tejidos de los animales y que su función es catalizar diferentes reacciones que impiden la peroxidación lipídica de las membranas celulares (Balasaheb y Pal, 2015).

También existen antioxidantes no enzimáticos que puede ser compuestos endógenos y exógenos, como glutatión, proteínas y eliminadores de bajo peso molecular (Pisoschi y Pop, 2015), los cuales pueden neutralizar el efecto oxidativo mediante la promoción de enzimas antioxidantes o procesando directamente la reacción en cadena oxidativa (He et al., 2017).

4.3 Importancia de la suplementación de aminoácidos

Los aminoácidos (AA) juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la función normal y el estado nutricional del organismo (Jobgen et al., 2006). Químicamente, los AA poseen en su estructura un grupo amino (-NH₂) y un grupo carboxilo (-COOH), unidos a una cadena lateral (-R) específica para cada AA (McDonald et al., 2010). Los AA son componentes de proteínas y materiales para la síntesis de varias moléculas bioactivas (Kamei et al., 2020). Los AA son las principales unidades estructurales de las proteínas, que se unen para formar cadenas de péptidos y proteínas (McDonald et al., 2010). Entre los más de 300 AA existentes en la naturaleza, únicamente 20 (α -AA) sirven como bloques de construcción de proteínas (Wu, 2009).

De acuerdo a las necesidades de AA en la dieta de los animales, los AA se clasifican en nutricionalmente esenciales y no esenciales (Lewis y Southern, 2001; Wu, 2009). Los AA esenciales son los que no pueden ser sintetizados por el organismo a un ritmo que coincida con las demandas de las funciones productivas como mantenimiento, crecimiento normal y reproducción (NRC, 2012), por lo tanto deben ser proporcionados en la dieta (Wu, 2009). Los AA considerados como esenciales son: lisina, histidina, leucina, isoleucina, valina, metionina, treonina, triptófano y fenilalanina, arginina es considerado condicionalmente esencial (Wu, 2009).

Los AA no esenciales son aquellos que el organismo puede sintetizar en cantidades suficientes y no tiene que consumirlos directamente en la dieta (Rezaei et al., 2013), sin embargo estos por lo general se adicionan ya que forman parte de las proteínas en los nutrientes (Rezaei et al., 2013; Wu et al., 2013). Los AA no esenciales son: alanina, asparagina, aspartato, cisteína, glicina, glutamato, glutamina, prolina, serina y tirosina (Wu, 2009).

La homeostasis, crecimiento y desarrollo del organismo se relacionan con el metabolismo normal de los AA, y un metabolismo anormal de los AA puede incluso causar la muerte (Orlando et al., 2008; Wu et al., 2004). Por lo tanto, el uso eficiente de los AA,

favorece la salud y el crecimiento en los animales. Los AA son transportados a través de la sangre y a varios tejidos donde se usan para una variedad de propósitos (Patience et al., 1995). El rol principal de los AA de la dieta es que estos puedan ser empleados para la síntesis de proteínas de los tejidos animales (Lewis y Southern, 2001).

4.4 Metionina, AA funcional

Metionina (Met) es un aminoácido esencial alifático que contiene azufre en su estructura y es considerado el tercer aminoácido limitante en las dietas para cerdos (Shoveller et al., 2010; Zhang et al., 2019). Entre los aminoácidos azufrados (SAA), metionina es el más valioso ya que es un donador de azufre para la formación de los otros dos aminoácidos azufrados, cisteína y cistina (Mastrototaro et al., 2016) que son fundamentales para que el intestino mantenga su función, incluida la digestión, la absorción y el metabolismo de los nutrientes (Zhang et al., 2019).

Metionina participa en procesos biológicos fundamentales, como el metabolismo de proteínas. Al ser componente de proteínas tisulares, sirve como sustrato para la síntesis de proteínas. Participa en reacciones de transmetilación, transulfuración y remetilación (Finkelstein, 1990; Riedijk et al., 2007) (Figura 1). Metionina se transmetila a homocisteína. Metionina se une al ATP, reacción que es catalizada por S-adenosilmetionina sintetasa o metionina adenosiltransferasa (MAT) (Ouyang et al., 2020) para formar S-adenosilmetionina (SAM) (Bauchart-Thevret et al., 2009; Ouyang et al., 2020).

SAM se considera como el principal reactivo donador de grupos metilo para la mayoría de las reacciones biológicas de metilación significativas que ocurren en todos los organismos vivos (Brosnan y Brosnan, 2006) y que son esenciales en la diferenciación y supervivencia celular mediante la regulación de vías metabólicas clave, incluida la metilación y la síntesis de poliaminas (Bauchart-Thevret et al., 2009; Mato et al., 2002; Ouyang et al., 2020).

La S-adenosilmetionina a través de transmetilación dona un grupo metilo a un aceptor, para formar S-adenosilhomocisteína (SAH) el cual es hidrolizado a homocisteína y adenosina (Lewis, 2003; Mastrototaro et al., 2016). La homocisteína a través de transulfuración puede ser catabolizado a cisteína, reacción regulada por las enzimas cistationina β -sintasa (CBS) y cistationina γ -liasa (Riedijk et al., 2007). La homocisteína también puede utilizarse para volver a sintetizar metionina a través de remetilación (Mastrototaro et al., 2016; Riedijk et al., 2007; Tesseraud et al., 2008).

Por lo anterior, la homocisteína es un punto de control regulador importante para la síntesis de metionina y cisteína (Riedijk et al., 2007). La cisteína producida se puede utilizar en la traducción de proteínas, es necesaria para la síntesis de mucina intestinal (Mastrototaro et al., 2016), además participa en la síntesis de taurina y en la síntesis de glutatión un importante antioxidante celular (Martínez et al., 2017; Mastrototaro et al., 2016; Rezzi et al., 2007). Metionina juega un papel clave en los procesos antioxidantes, eliminando las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Soares et al., 2017)

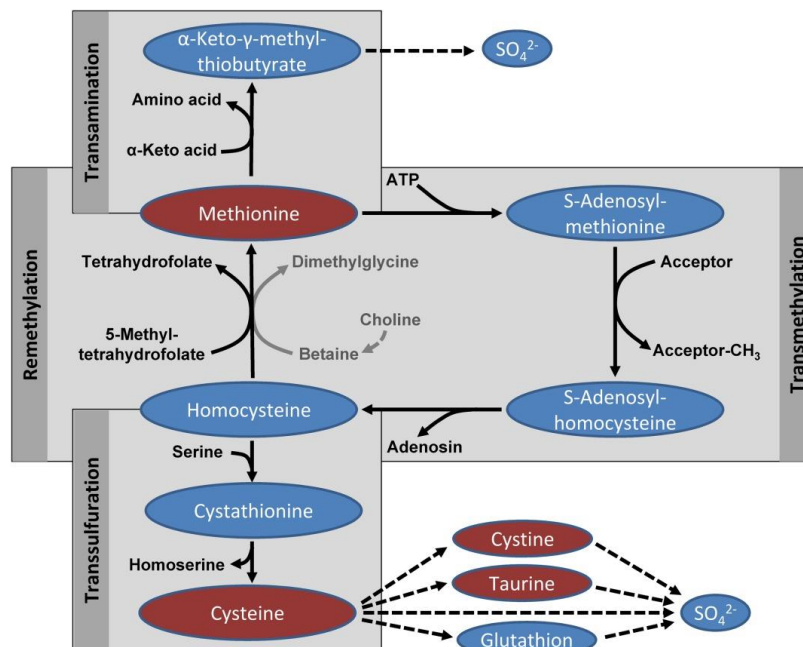


Figura 1. Vías del metabolismo de metionina a través de transmetilación, remetilación, transulfuración y transaminación (Adaptado de Mastrototaro et al., 2016).

El tracto gastrointestinal es un sitio importante del metabolismo de aminoácidos azufrados (SAA) (Burrin y Stoll, 2007; Chen et al., 2014). La metionina se metaboliza en aproximadamente un 20-30% durante la absorción (Fang et al., 2010; Riedijk et al., 2007). El 20% de la metionina ingerida de la dieta se transmetila principalmente a homocisteína y se transsulfura a cisteína (Bauchart-Thevret et al., 2009; Riedijk et al., 2007). Estudios han demostrado que la metionina utilizada por los tejidos gastrointestinales se metaboliza en un 31% en homocisteína y un 29% en proteína tisular (Riedijk et al., 2007).

Se ha evidenciado que la deficiencia de SAA provoca una menor cantidad de células caliciformes y una disminución en el contenido de glutatión en el intestino delgado (Bauchart-Thevret et al., 2009). En lechones, específicamente la deficiencia de Met y Cis reduce significativamente el crecimiento de la mucosa intestinal y la proliferación de células epiteliales intestinales, mientras que por otro lado aumenta el estrés oxidativo intestinal (Bauchart-Thevret et al., 2009). Considerando los efectos importantes de Met en la fisiología intestinal, un nivel adecuado de este AA en la dieta es imprescindible para mantener el crecimiento normal y las funciones básicas del intestino delgado (Wu, 2010).

La adición de metionina en la dieta generalmente es a través de fuentes sintéticas como DL-Metionina una mezcla 50:50 de isómeros d y l; (99 pura %), y que se considera 100% biodisponible para los cerdos (Wang et al., 2020) o como hidroxianálogo de metionina líquido, DL-2-hidroxi-4 (metiltio) butanoico (que contiene 88% de sustancia activa) (Martín-Venegas et al., 2006b; Métayer et al., 2008). Al igual que todos los α -hidroxiácidos líquidos, el hidroxianálogo de metionina forma ésteres intermoleculares que dan como resultado una mezcla en equilibrio dinámico de monómeros, dímeros, trímeros y oligómeros superiores (Koban y Koberstein, 2002; Lawson y Ivey, 1986; Martín-Venegas et al., 2006b).

En cuanto a la biodisponibilidad de ambas fuentes de Met, estudios en cerdos en crecimiento evaluaron la eficacia del hidroxianálogo de Met (MHA) en relación con DL-Met encontrándose una biodisponibilidad entre 63% y 78% (Roth y Kirchgessner, 1986).

Años más tarde en un trabajo realizado por (Jansman et al., 2003) encontraron que la bioeficacia de MHA era del 72.2% en comparación con DL-Met en cerdos en crecimiento. Otros estudios mostraron una biodisponibilidad para MHA del 65.7% en relación con DL-Met en cerdos en crecimiento (Shoveller et al., 2010). La biodisponibilidad más baja del MHA en cerdos en crecimiento, en comparación con DL-Met, puede deberse en parte a las formas poliméricas del MHA (Jansman et al., 2003; Shoveller et al., 2010).

El MHA en su estructura molecular tiene un grupo hidroxilo en el carbono alfa que sustituye al grupo amino de DL-Met (Shoveller et al., 2010). Esta diferencia podría resultar en diferentes mecanismos de absorción, transporte y metabolismo en los tejidos, pues debe pasar una serie de transformaciones metabólicas para ser utilizada por el animal (Dibner, 2003).

4.5 Anatomía y fisiología del intestino delgado

El intestino delgado es la porción del sistema digestivo con mayor responsabilidad en la absorción de nutrientes. Está compuesto por duodeno, yeyuno e íleon. En cerdos en crecimiento, el intestino delgado puede medir aproximadamente 16 a 21 m de largo, de los cuales del 4 a 5% es duodeno, 88 a 91% yeyuno y 4 a 5% íleon (Yen, 2000).

Duodeno es el primer segmento y el más corto, a este llegan los alimentos parcialmente digeridos del estómago y las secreciones pancreáticas que contienen enzimas digestivas. Yeyuno es la sección media del intestino; éste en su composición tiene pliegues circulares y vellosidades que le permiten la absorción de partículas pequeñas de nutrientes previamente digeridas por las enzimas de duodeno, así como las que se digieren por enzimas propias de este segmento. Íleon es el último segmento del intestino delgado también contiene vellosidades que se encargan de absorber vitamina B12, ácidos biliares y otros nutrientes que no llegan a absorberse en yeyuno (Helander y Fändriks, 2014; Kong et al., 2018).

La estructura transversal del intestino delgado consta de cuatro capas: mucosa, submucosa, capa muscular y adventicia (Figura 2). La mucosa intestinal está formada por mucosa, muscular, lamina propia y epitelio, posee células epiteliales que secretan un líquido protector como moco (Kong et al., 2018); su principal función es la participación en los procesos de digestión, absorción y transporte de nutrientes, mantiene los tejidos húmedos proveyéndole una barrera protectora al cuerpo contra la entrada de toxinas, macromoléculas y microorganismos (Johansson et al., 2013; Soraci et al., 2010).

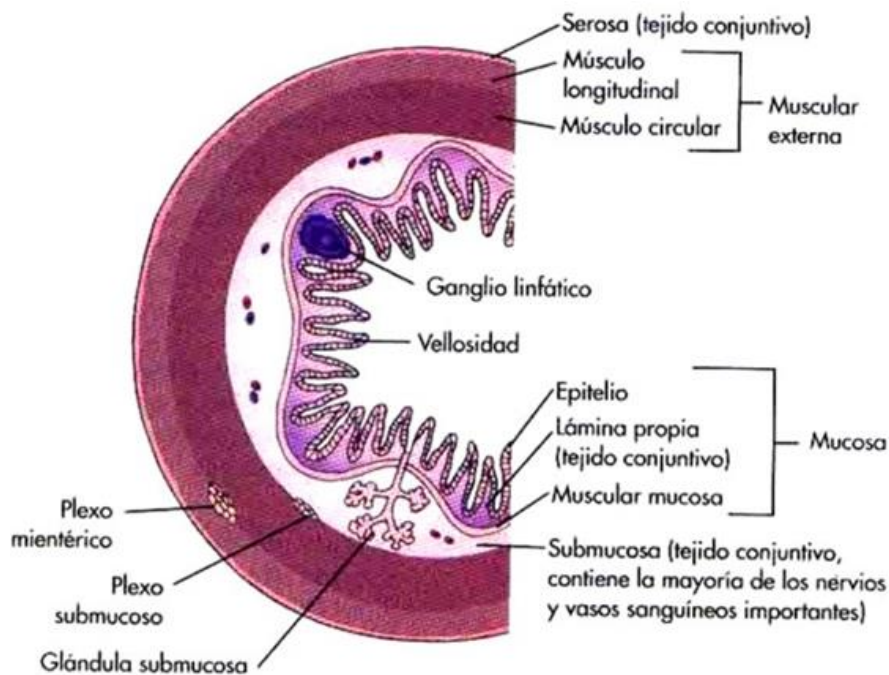


Figura 2. Ilustración representativa de la anatomía de la pared y epitelio del intestino delgado (Adaptado de Yen, 2000).

La submucosa, es una disposición de tejido conectivo; en los primeros centímetros (cm) del duodeno está conformada de glándulas submucosas intestinales denominadas glándulas de Brunner, éstas secretan fluido alcalino que se moviliza desde la submucosa a través de la mucosa muscular hacia las aberturas entre las células epiteliales en las criptas de las vellosidades (Yen, 2000). La submucosa es rica en colágeno relativamente delgada, sostiene la mucosa y la une a la capa muscular (Kong et al., 2018).

La capa muscular del intestino delgado está formada por dos capas de tejido muscular, consistente en una interna circular y otra externa cuyas células se orientan longitudinalmente. Principalmente cumple con la responsabilidad de contractilidad y control de la motilidad intestinal (Collins et al., 2020). La capa adventicia es la capa más externa, tiene un epitelio escamoso el cual forma el mesenterio de soporte que contiene el tejido conectivo, los vasos sanguíneos grandes y los nervios (Yen, 2000), es una membrana de tejido liso que secreta líquido seroso.

Las células epiteliales que recubren la superficie luminal del epitelio intestinal, son reemplazadas cada 4-5 días a través de procesos de renovación y migración (Kong et al., 2018). Existen varios tipos de células que están presentes en el epitelio intestinal, entre ellos: los enterocitos, las células de Paneth, las células caliciformes y las células neuroendocrinas (Gassler, 2017). Las células epiteliales se producen por células madre, que se ubican en las criptas, dan lugar a progenitores que se diferencian en tipos de células epiteliales maduras (excepto las células de Paneth) a medida que migran hacia el eje cripta-vellosidad (Clevers, 2013).

Los enterocitos son las principales células en el epitelio intestinal y las más abundantes; cumplen con funciones muy importantes en la absorción de nutrientes productos de la digestión, así como en la secreción de enzima e inmunoglobulinas (Kong et al., 2018). Las células caliciformes secretan moco, este lubrica el paso de los alimentos a través de los intestinos y protege la pared intestinal de las enzimas digestivas (Kim y Ho, 2010).

4.6 Digestión y absorción de aminoácidos

La digestión es el proceso en el que sustancias complejas provenientes de la dieta se convierten en formas simples que pueden ser absorbidas por el organismo (Justin y Amit, 2022). La digestión enzimática de las proteínas comienza en el estómago y termina en el intestino, en donde algunas enzimas como pepsina, tripsina y quimotripsina juegan un papel importante para la digestión (Krehbiel y Matthews, 2003). El estómago recibe y

almacena alimentos durante algunas horas mientras se van segregando ácidos y enzimas que ayudan a la correcta digestión (Justin y Amit, 2022). El ambiente ácido por acción del ácido clorhídrico (HCl) en el estómago hace que las proteínas se desnaturalicen y que estas puedan estar disponibles para la digestión proteolítica (Kong et al., 2018). La pepsina es la principal enzima proteolítica del estómago, su actividad consiste en romper la estructura terciaria y cuaternaria de la proteína formando fragmentos peptídicos; es decir, esta convierte las grandes proteínas en pequeños polipéptidos, con 10-50 AA los cuales ingresan a intestino delgado, para ser digeridos por la tripsina activada y la quimotripsina (Kong et al., 2018; Krehbiel y Matthews, 2003).

Los productos de la digestión del HCl y pepsina llegan a duodeno a través del esfínter pilórico (D'Mello, 2003). En duodeno continua la digestión llevada a cabo por proteasas intestinales y pancreáticas (Krehbiel y Matthews, 2003). En duodeno la digestión se realiza en un medio alcalino, debido a la presencia de sales biliares, jugos pancreáticos y algunas secreciones duodenales (Wu et al., 2013). Yeyuno e íleon son los segmentos donde ocurre la absorción de los productos de la digestión; yeyuno es el principal sitio de absorción de AA libres y pequeños péptidos (Wu et al., 2013).

El intestino delgado es capaz de absorber aminoácidos libres, dipéptidos y tripéptidos hacia el interior del enterocito. El 90% de la absorción corresponde a AA en forma libre y el 10% a di y tripéptidos. Éstos ingresan y salen de los enterocitos a través de transportadores. Los di- y tripéptidos se absorben en el enterocito por un transportador único PEPT1 acoplado con H^+ , que actúa como transportador hacia el interior del enterocito (Krehbiel y Matthews, 2003). Las enzimas dipeptidasas y tripeptidasas digieren a los dipéptidos y tripéptidos en la región apical del enterocito para obtener aminoácidos libres (D'Mello, 2003; Wu, 2013). Los aminoácidos absorbidos fluyen a la sangre portal a través de la membrana basal para ser distribuida a todos los órganos (Wu, 2009); el proceso general de absorción y transporte se resume en la Figura 3.

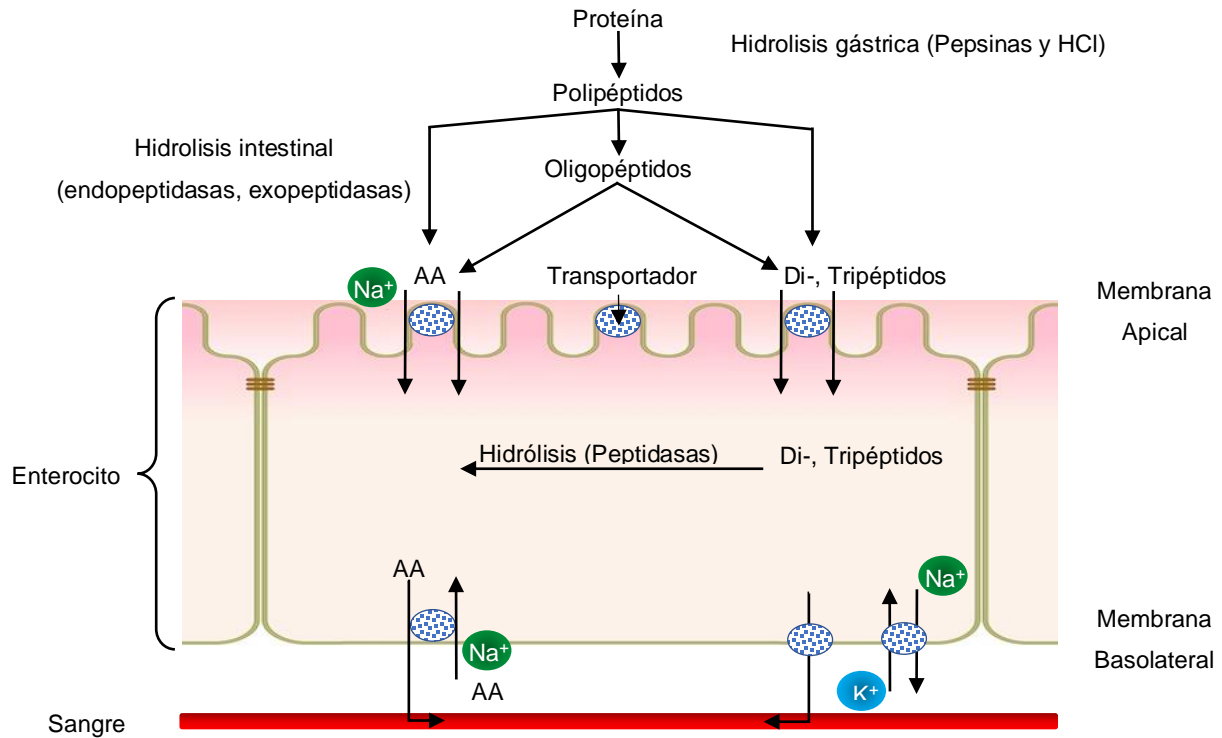


Figura 3. Mecanismo de absorción y transporte de aminoácidos y péptidos transmembrana por el enterocito (Adaptado de Krehbiel y Matthews, 2003).

4.7 Transporte de aminoácidos

El intestino delgado es el sitio principal de la absorción de aminoácidos y pequeños péptidos. Éstos son transportados a través del epitelio intestinal por medio de varios sistemas de transporte ubicados en la membrana apical y basolateral del enterocito. Los sistemas de transporte de aminoácidos se clasifican como dependientes (mayúsculas) e independientes (minúsculas) de Na⁺ (Mastrototaro et al., 2016). Además, a cada sistema se le adicionan los superíndices 0, +, -, y 0,+ para describir la naturaleza eléctrica de los aminoácidos reconocidos como sustrato para cada sistema (Bröer, 2008).

4.7.1 Sistemas de transporte

4.7.1.1 Sistema B^0

Este es el principal sistema de transporte de aminoácidos neutros ubicado en la membrana apical del enterocito (Bröer, 2008) y está caracterizado por ser de alta capacidad y dependiente de Na^+ (Palacín et al., 1998). Una ectopeptidasa conocida como enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) está asociada con B^0 . Esta carboxipeptidasa se localiza en la región apical del enterocito y es necesaria para el apropiado reclutamiento de B^0 a la membrana apical (Camargo et al., 2009; Ganapathy, 2012). Además, ACE2 hidroliza aminoácidos neutros a partir del carboxilo terminal de los péptidos presentes en el lumen del intestino y los aminoácidos liberados sirven como sustrato para B^0 (Bröer, 2008; Bröer y Gauthier-Coles, 2021).

4.7.1.2 Sistema $b^{0,+}$

Es el sistema de transporte de aminoácidos neutros y catiónicos con alta afinidad e independiente de Na^+ , el cual se expresa en la membrana apical del intestino (Ganapathy, 2012). Es el sistema principal para la absorción de aminoácidos catiónicos y cistina en intestino y riñón (Palacín et al., 1998). El sistema $b^{0,+}$ funciona como un heterodímero que consiste de dos proteínas; la subunidad pesada de este sistema de transporte se conoce como rBAT (relacionado al transportador de aminoácidos $b^{0,+}$), y no tiene funciones de transporte; la cadena ligera conocida como transportador de aminoácidos $b^{0,+}$ posee las funciones de transporte (Palacín et al., 2001). La función de rBAT es la formación de un heterodímero con $b^{0,+}$ AT durante la biogénesis vía enlace cruzado disulfuro y también facilitar el tráfico del heterodímero en la membrana del borde de cepillo (Bröer, 2008). Una característica de este sistema es que funciona a través del intercambio obligatorio de aminoácidos. Bajo condiciones fisiológicas, éste favorece la entrada de aminoácidos catiónicos y cistina al enterocito los cuales intercambia por aminoácidos neutros (Mastrototaro et al., 2016).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Lugar del experimento

El experimento se realizó en el campus Marín en la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma De Nuevo León (UANL), Nuevo León, México, durante la época más cálida del año, verano (julio - septiembre) de 2020, y tuvo una duración de 21 días. Los análisis de laboratorio (expresión de transportadores de aminoácidos y de actividad de enzimas antioxidantes) se llevaron a cabo en el laboratorio de Nutrigenómica del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), Baja California, México.

5.2 Animales y manejo

El experimento se realizó con 36 cerdos con un peso promedio inicial de 27.4 ± 0.6 kg, que fueron distribuidos en 3 grupos formados según peso corporal inicial, sexo y camada, y que fueron asignados aleatoriamente a los 3 tratamientos de dieta, se emplearon 12 repeticiones en total por tratamiento.

Los cerdos fueron alojados individualmente en corrales de 1.2 x 1.2 metros (m) dentro de una nave bajo techo, pero con paredes laterales superiores abiertas, por lo que los corrales tuvieron las típicas fluctuaciones de temperatura ambiente que ocurren en época de verano en la región. Cada corral estuvo equipado con un comedero de un solo orificio y un bebedero de boquilla para permitir el consumo *ad libitum* de alimento y agua durante los 21 días del experimento. La temperatura y la humedad relativa se midieron con la ayuda de dispositivos pequeños (higrotermógrafos) instalado dentro de los corrales, y configurados para registrar estas variables cada hora.

Diariamente se registró la cantidad de alimento ofrecido y rechazado. Los cerdos fueron pesados cada semana durante 21 días. Los datos registrados se utilizaron para el

cálculo de consumo diario de alimento (CDA), ganancia diaria de peso (GDP) y conversión alimenticia (CA).

5.3 Dietas y tratamientos experimentales

La dieta testigo se formuló con base en trigo molido y pasta de soya, y se utilizó lisina, treonina y valina para cubrir los requerimientos de AA establecidos (NRC, 2012) para cerdos en el rango de peso corporal de 25-50 kg (Cuadro 1). Todas las dietas contenían los mismos niveles de AA (NRC, 2012) excepto metionina. El nivel de metionina se eligió para superar la ingesta reducida de metionina debido a la reducción del 20 al 40% en la ingesta voluntaria de alimento de cerdos en estrés por calor.

Los cerdos se distribuyeron de forma aleatoria en las 3 dietas. Los tratamientos fueron:

- 1) Met100: cerdos bajo condiciones de estrés por calor, recibieron la dieta testigo, con el 100% de los requerimientos de Met;
- 2) Met120: cerdos bajo condiciones de estrés por calor, recibieron la dieta testigo más 20% extra de los requerimientos de Met;
- 3) MHA120: cerdos bajo condiciones de estrés por calor recibieron la dieta testigo más 20% extra de los requerimientos de Met en su forma análoga (MHA).

En el Cuadro 2 se presenta la composición de ingredientes de las dietas experimentales.

Cuadro 1. Composición de ingredientes de las dietas experimentales.

Ingredientes	Dietas experimentales		
	Met-100	Met-120	MHA-120
Trigo	80.08	80.08	80.08
Pasta de soya, 48%	16.00	16.00	16.00
L-Lisina * HCl	0.66	0.66	0.66
L-Treonina	0.20	0.20	0.20
DL-Metionina	0.040	0.095	0.040
Hidroxianálogo de metionina (MHA)**	-	-	0.085
L-Valina	0.05	0.05	0.05
Almidón de maíz	0.165	0.110	0.055
Carbonato de calcio	1.25	1.25	1.25
Ortofosfato	0.80	0.80	0.80
Sal iodada	0.35	0.35	0.35
Premezcla de Vit y Minerales ¹	0.40	0.40	0.40

*Dietas: Met 100, dieta testigo a base de trigo, soya, suministra 100% de requerimientos Met (NRC, 2012)

**MHA tiene 65% de biodisponibilidad en relación con DL-Met (Kim y Ho, 2010; Shoveller et al., 2010)

¹Suministrado por kg de dieta. Vitamina A, 4.800 IU; vitamina D3, 800 IU; vitamina E, 4.8 IU; vitamina K3, 1,6 mg, riboflavina, 4 mg; Ácido D-pantoténico, 7,2 mg; niacina, 16 mg, vitamina B12, 12.8 mg; Zn, 64 mg; Fe, 64 mg; Cu, 4 mg; Mn, 4 mg; I, 0.36 mg; Se, 0,13 mg.

5.4 Recolección de muestras

Se realizó colecta de muestras de sangre a las 1600 h del día 18 del experimento de seis cerdos de cada tratamiento. De cada cerdo se colectaron dos muestras de sangre mediante punción de la vena yugular, utilizando tubos BD Vacutainer de 6.0 ml. Las muestras colectadas se centrifugaron a 1,500 x g a 4°C durante 15 minutos y el suero se transfirió a criotubos de 2.0 ml, para su almacenamiento a -20 °C hasta su posterior análisis.

La alimentación se retiró del corral la noche del experimento previa al día de sacrificio. Se sacrificaron seis cerdos de cada tratamiento mediante aturdimiento con aturridor de émbolo retráctil y desangrado. Las canales fueron evisceradas y se recolectaron muestras de mucosa de los 3 segmentos intestinales duodeno, yeyuno e íleon, realizando un raspado con portaobjetos. Las muestras fueron colocadas en microtubos de 2 ml previamente identificados, e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. Todas las muestras obtenidas fueron transportadas al laboratorio y almacenadas a -80 °C para su posterior análisis de expresión génica. También se colectaron muestras de los 3 segmentos del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) y se almacenaron en frascos de 50 ml con solución buffer de formaldehído al 10% para el análisis histomorfológico según el procedimiento descrito por (Moeser et al., 2012).

5.5 Análisis de laboratorio

5.5.1 Análisis de actividad enzimática

Para el análisis de la actividad enzimática se utilizaron kits comerciales (Cayman Chemical, USA) de acuerdo con la metodología descrita por el fabricante. Los análisis de SOD y GPx, se realizaron con suero diluido en una relación 1:2, con el buffer de muestra, removiendo y descartando la capa blanca superior (de leucocitos); enseguida se realizó lisis de los eritrocitos, utilizando 4 ml de agua fría grado HPLC, se centrifugó a 10,000 g durante 15 min a 4°C y se recolectó el sobrenadante para su análisis.

El análisis de CAT se realizó de manera similar al procedimiento antes mencionado, la diferencia fue en la dilución del plasma en relación 1:5 y no se utilizó buffer. Para el análisis de GSH; las muestras fueron desproteinizadas con una solución saturada de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en una relación 1:1. Éstas se dejaron reposar en hielo durante 10 minutos y posteriormente se centrifugaron a 3500 g durante 15 minutos, se recolectó el sobrenadante y se diluyó nuevamente en agua HPLC a una relación 1:1.

5.5.1.1 Actividad de superóxido dismutasa

La determinación de la actividad enzimática de la enzima superóxido dismutasa se realizó utilizando el kit comercial (Superoxide Dismutase Assay Kit 706002, Cayman Chemical, Michigan, USA) y se siguió el protocolo propuesto por el fabricante. Se utilizó sal de tetrazolio para la detección de radicales superóxidos generados por la xantina oxidasa y la hipoxantina. Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para exhibir una dismutación del 50% del radical superóxido (Cayman Chemical, 2018).

5.5.1.2 Actividad de glutatión peroxidasa

La determinación de la actividad enzimática de glutatión peroxidasa se realizó utilizando el kit comercial (Glutathione Peroxidase Assay Kit 703102, Cayman Chemical, Michigan, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La actividad de GPx se estimó de forma indirecta mediante una reacción acoplada con glutatión reductasa (GR). El glutatión oxidado (GSSG), producido al reducir el hidroperóxido por GPx, se recicla a su estado reducido por GR y NADPH.

La oxidación de NADPH a NADP⁺ va acompañada de una disminución de la absorbancia a 340 nm. En condiciones en las que la actividad de GPx es limitante, la tasa de disminución en el A₃₄₀ es directamente proporcional a la actividad de GPx en la muestra. Una unidad de GPx se define como la cantidad de enzima que provocará la oxidación de 1.0 nmol de NADPH a NADP⁺ por minuto a 25 °C (Cayman Chemical, 2019).

5.5.1.3 Actividad de catalasa

La determinación de la actividad enzimática de catalasa, se realizó utilizando el kit comercial (Catalase Assay Kit 707002, Cayman Chemical, Michigan, USA), siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante. Se utilizó la función peroxidativa de CAT para la determinación de la actividad enzimática. El método se basa en la reacción de la enzima

con metanol en presencia de una concentración óptima de H_2O_2 . El formaldehído producido se mide colorimétricamente con 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1, 2, 4-triazol como cromógeno. Este cromógeno forma específicamente un heterociclo bicíclico con aldehídos, que tras la oxidación cambia de incoloro a un color púrpura. Una unidad de CAT se define como la cantidad de enzima que provocará la formación de 1,0 nmol de formaldehído por minuto a 25 ° C (Cayman Chemical, 2017).

5.5.1.4 Actividad de glutatión

La determinación de la actividad de glutatión se realizó utilizando el kit comercial (Glutathione Assay Kit 703002, Cayman Chemical, Michigan, USA), y se siguieron las instrucciones del fabricante. Esta técnica utiliza glutatión reductasa, para la cuantificación de GSH. El grupo sulfhidrilo de GSH reacciona con DTNB (5,5'-ditiobis- 2- (ácido nitrobenzoico), conocido como reactivo de Ellman, que se basa en la reacción de tioles con el reactivo de Ellman (DTNB) para producir una proteína tiol modificada (disulfuro mixto) y una molécula de 2-nitro ácido-5-tiobenzoico (TNB). El reactivo de Ellman sin reaccionar solo tiene un color débil, mientras que el anión TNB tiene un color amarillo intenso; lo cual se detecta y cuantifica usando un espectrofotómetro (Luo et al., 2011). La medida de la absorbancia a 412 nm (especificada por Ellman, 1959) proporciona una determinación cuantitativa de los grupos tiol; por cada molécula de tiol libre que reacciona, se produce una molécula de TNB (Luo et al., 2011; Riener et al., 2002).

El disulfuro mixto, GSTNB (entre GSH y TNB) que se produce, es reducido por la glutatión reductasa para reciclar el GSH y producir más TNB. La tasa de producción de TNB es directamente proporcional a la reacción de reciclaje que, a su vez, es directamente proporcional a la concentración de GSH en la muestra. GSH se oxida fácilmente a glutatión oxidado (GSSG). El GSSG se produce durante la reducción de hidroperóxidos por la glutatión peroxidasa. El GSSG se reduce a GSH por la glutatión reductasa y por cada mol de GSSG, se producen 2 μ M de GSH (Cayman Chemical, 2016).

5.6 Análisis histomorfológico

Las muestras de tejido intestinal previamente almacenadas en formaldehído al 10% se utilizaron para realizar el análisis histológico, de acuerdo a la metodología descrita por Moeser et al., (2012). En cada portaobjetos se montaron dos cortes transversales de intestino, los cuales fueron teñidos con hematoxilina y eosina. Los cortes de tejido fueron observados en un microscopio óptico de la marca Primo Star Zeiss (HBO, México). Se tomaron fotografías de los segmentos intestinales, asegurando la visualización de vellosidades intestinales y la profundidad de cripta. Este procedimiento se realizó en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UANL.

5.6.1 Medición de altura de vellosidades y profundidad de la cripta

La altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas de cada uno de los segmentos intestinales (duodeno, yeyuno e íleon) fue medida en las fotografías mencionadas anteriormente. Se utilizó el software Image J2 (Curtis et al., 2017). Éste permite utilizar una escala para calcular las mediciones de píxeles a unidades de longitud en este caso micrómetros. Se midieron al menos 10 vellosidades íntegras y uniformes y las dos criptas correspondientes de cada una de las vellosidades, por cada muestra de segmento intestinal.

La altura de vellosidad se midió desde el punto medio de la base de la vellosidad, trazando una línea recta hasta el ápice; la profundidad de la cripta se midió desde la base de la cripta hasta la base de la vellosidad más cercana. Los datos obtenidos fueron exportados a un documento Excel los cuales sirvieron para calcular la relación altura de vellosidad:profundidad de cripta (V:C), la cual se calculó dividiendo la altura de la vellosidad entre la profundidad de la cripta; posteriormente se realizó el análisis estadístico de los datos.

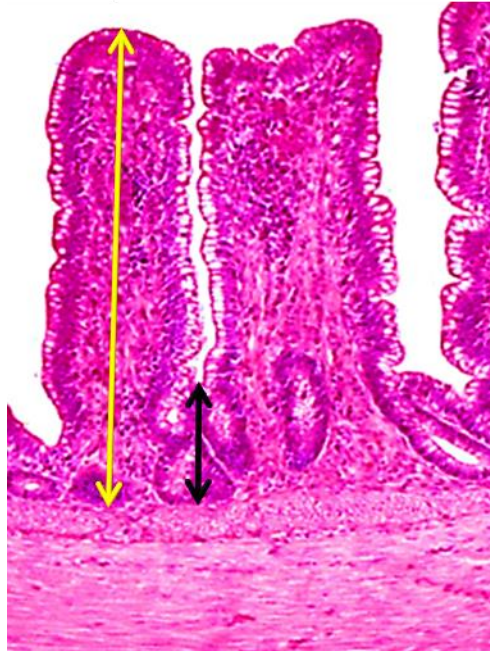


Figura 4. Ejemplo de medición de la altura de una vellosidad (flecha amarilla) y profundidad de cripta (flecha negra), de un corte histológico de intestino delgado (íleon) (Adaptado de Alshamy et al., 2018).

5.7 Extracción y purificación total de ARN

Para los análisis de expresión de transportadores de aminoácidos se realizó extracción de ARN total de las muestras de la mucosa de los tres segmentos del intestino delgado, utilizando el kit comercial (Direct-zol RNA Miniprep Plus Kit R2072, Zymo Research, Irvine, CA, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras de la mucosa intestinal previamente almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se colocaron en un mortero que contenía nitrógeno líquido y se pulverizaron. Aproximadamente 50 mg del tejido pulverizado se colocaron en un microtubo con 530 μl de Trizol Reagent (Invitrogen, Corp.). La muestra se incubó durante un minuto, posteriormente fue homogenizada y se centrifugó a 10,000 rpm durante 2 minutos, se procedió a recuperar el sobrenadante tratando de no tocar la pastilla formada en el fondo y se transfirió a un microtubo nuevo de 2 ml, inmediatamente se añadieron 500 μl de etanol al 100% y se mezcló por

inmersión, el líquido fue transferido a una columna con un microtubo de colección y se centrifugó durante 1 minuto a 10000 rpm.

Posteriormente, la columna fue colocada en un nuevo microtubo de colección y se añadió 400 µl de RNA Prewash (Zymo Research, CA, USA), se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto, se desechó el sobrenadante y se repitió este paso. A continuación, se agregaron 700 µl de RNA Wash Buffer (Zymo Research, CA, USA) a la columna y se centrifugó a 10,000 rpm por 2 minutos. La columna fue transferida a un microtubo libre de RNasa de 2 ml, el ARN purificado fue eluido con 30 µl de DNase/RNase-Free Water (Zymo Research, CA, USA) y se centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto. Se desechó la columna y se colocó una identificación en el microtubo, el RNA purificado se almacenó a -80 °C. Posteriormente se determinó la integridad del ARN total a través de electroforesis en gel de agarosa al 1%; se verificó que la relación de ARNr 28S:18S fuera alrededor de 2:1 (Sambrook y Russel, 2001).

5.8 Transcripción reversa

Aproximadamente 3 µl de ARN se trataron con 1 U de DNasa; (1 U/µl; Thermo Fisher Scientific) y 6 µl de buffer para transcripción reversa (RT 5x), se añadieron 20.5 µl de agua libre de nucleasas. La reacción fue incubada a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego durante 5 minutos a 70 °C para detener la reacción. Para iniciar la transcripción reversa se agregó 1 µl de hexanucleótidos (random hexamers, 50 ng/µl, Invitrogen) y 1 µl de solución de DNTPs (10 µM de cada uno, Invitrogen). La reacción se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, luego se incubó en hielo y se añadieron 2 µl de buffer de transcripción (RT 5x), 3 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl de inhibidor de ribonucleasa (40U/µl; RiboLock Inhibitor, Thermo Fisher Scientific). Se realizó una incubación por a 42 °C durante 2 minutos para estabilizarla y luego se agregó 1 µl de la enzima transcriptasa reversa (Revert Aid H Minus RT, Thermo Fisher Scientific). A continuación, se llevó a cabo la reacción de retrotranscripción a cabo a 42°C durante 50 minutos. Posteriormente se incubó a 70 °C durante 15 minutos para detener la reacción y luego se reposó en hielo. La reacción se almacenó a -20 °C. Las muestras de

cDNA fueron cuantificadas por espectrofotometría (Helios β , Thermo Electron Co.) y se diluyeron para una concentración final de 50 ng/ μ l.

5.9 PCR cuantitativa (qPCR)

Se diseñaron oligonucleótidos de acuerdo con las secuencias publicadas en el Genbank (Cuadro 2) que son específicos para el ARN mensajero de los transportadores de aminoácidos B⁰ y b^{0,+}, el gen de proteína ribosomal 4 (RPL4) fue utilizado como gen de referencia para normalizar las variaciones en el ARNm (Cuadro 2). La expresión de transportadores de AA en duodeno, yeyuno e íleon, se analizaron mediante ensayos de PCR cuantitativa (qPCR), utilizando el kit comercial Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (K0222 Thermo Fisher Scientific), las reacciones de qPCR se realizaron en un termociclador de tiempo real CFX96 Touch versión 3.0 (BioRad, Herefordshire, England).

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en microtubos de 200 μ l con volumen final de reacción de 25 μ l. Cada reacción contenía 8 μ l de agua libre de nucleasas, 12.5 μ l de SYBR Green Mix, 3 μ l de Oligo Mix (5 μ M de cada oligonucleótido nucleótido) y 1.5 μ l de ADNc (50 ng/ μ l). Todas las muestras se analizaron por duplicado, y en la misma corrida se analizaron tanto el gen blanco como el gen de referencia. En la primera columna del plato se colocaron tres muestras por duplicado de los siguientes blancos: 1) reacción sin DNA; 2) reacción con DNA, pero sin Oligo Mix; 3) reacción con DNA, pero sin SYBR Green Mix. El programa de reacción para los qPCR fue: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 minutos y 40 ciclos (desnaturalización a 95 °C por 15 segundos, alineación a 56 °C por 15 segundos, y extensión a 72 °C por 30 segundos).

Al finalizar cada ciclo, se midió la fluorescencia de las muestras y posteriormente se realizó una curva de desnaturalización de 65 °C a 95 °C, en la que se midió la fluorescencia cada 0.5°C.

El cálculo de la expresión relativa del ARNm de los transportadores de aminoácidos B⁰ y b^{0,+}, en duodeno, yeyuno e íleon se realizó de acuerdo con la ecuación (2- $\Delta\Delta$ Ct) descrita por (Livak y Schmittgen, 2001).

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados para análisis de PCR cuantitativo de ARNm derivados de transportadores de aminoácidos (B⁰, b^{0,+}) y RPL4.

ARNm	Oligonucleótido	Secuencia de oligonucleótido (5', 3')	Fragmento amplificado (pb)
B ⁰ , Transportador de aminoácidos neutros SLC6A19 (GenBank: DQ231579.1)			
	Sentido	5' TCTGTCCACAACAACACTGCCA 3'	163
	Antisentido	5' ACCCGTTGATAAGCGTCAGG 3'	
b ^{0,+} , Transportador de aminoácidos SLC7A9 (GenBank: NM_001110171.1)			
	Sentido	5' CCTGCCATCATCTTTACGG 3'	414
	Antisentido	5' GAGCTTGTTACTCTGGCGGT 3'	
RPL4, Proteína Ribosomal L4 (GenBank: DQ84576.1)			
	Sentido	5' TGAGCTCTATGGCACTTGGC 3'	221
	Antisentido	5' GAATGGTGTTTCGGCGCATT 3'	

5.10 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el paquete estadístico SAS, en función del diseño de bloques completos al azar. Se realizaron análisis de varianza y comparación de medias. Se construyeron tres contrastes no ortogonales para analizar la respuesta de los cerdos en EC a la suplementación de metionina como DL-Met o MHA, C1: Met100 vs Met120; C2: Met100 vs MHA120; C3: Met120 vs MHA120. Se consideró un nivel de significancia de $P \leq 0.01$ para diferencias altamente significativas; $P \leq 0.05$ para diferencias significativas, y tendencia $P \leq 0.10$.

VI. RESULTADOS

6.1. Temperatura ambiental y humedad relativa

Los valores de temperatura ambiental (TA) y humedad relativa (HR) registradas cada 10 minutos durante el periodo experimental se muestran en la Figura 5. Las temperaturas mínimas promedio fueron 24.10 °C, registradas a las 0730 h, y las máximas fueron 34.66 °C, registrada a las 1550 h. La temperatura ambiental promedio durante todo el experimento fue de 29.6 °C. La humedad relativa varió sustancialmente en dirección opuesta a la temperatura ambiente, los valores más altos fueron registrados durante las horas de la mañana hasta un 85.5% y valores más bajos durante las horas de la tarde hasta un 48%, con un promedio de 66.9%.

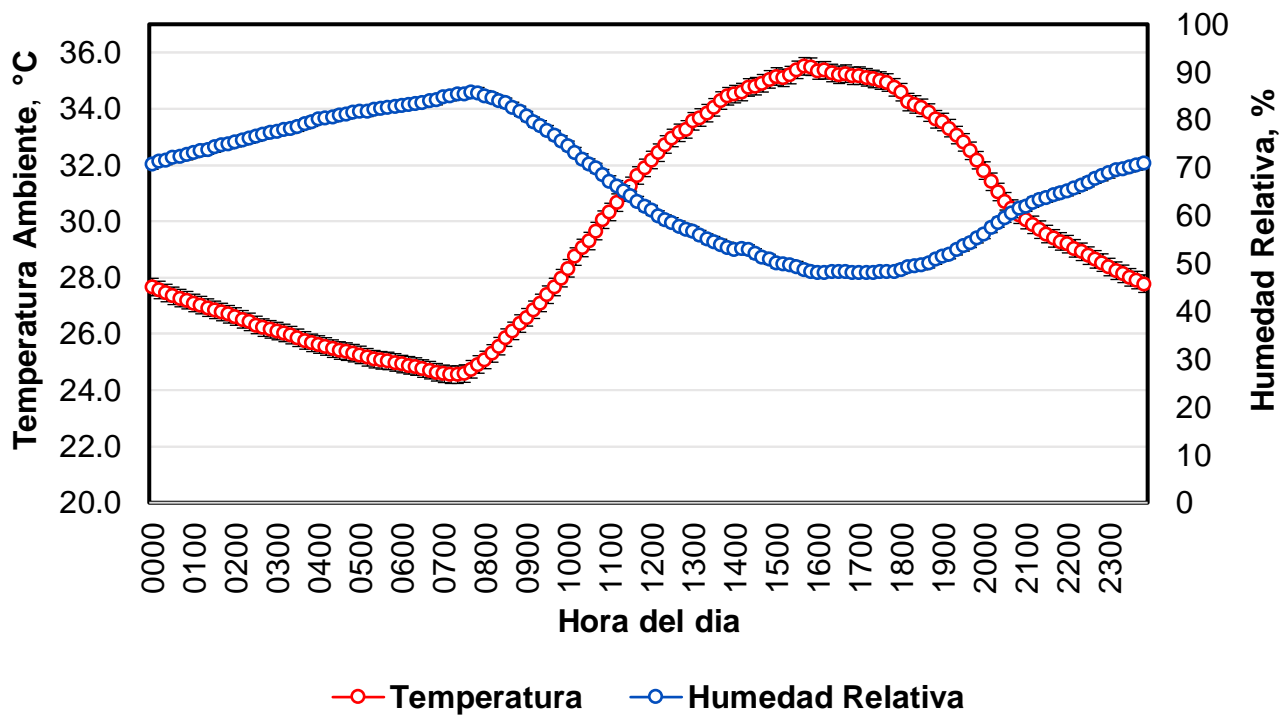


Figura 5. Temperatura ambiental (°C) y humedad relativa (%), valores registrados diariamente a intervalos de 10 minutos durante las 24 h del día con la ayuda de un higrómetro.

6.2 Índice de temperatura y humedad

El índice de temperatura y humedad (ITH) promedio por hora durante el periodo experimental fue de 78.9, con un valor máximo de 84.8 registrado alrededor de las 1550 h y un valor mínimo de 73.6 a las 0730 h del día. A continuación, se muestran los valores relativos obtenidos para el Índice Temperatura Humedad (ITH; Figura 6).

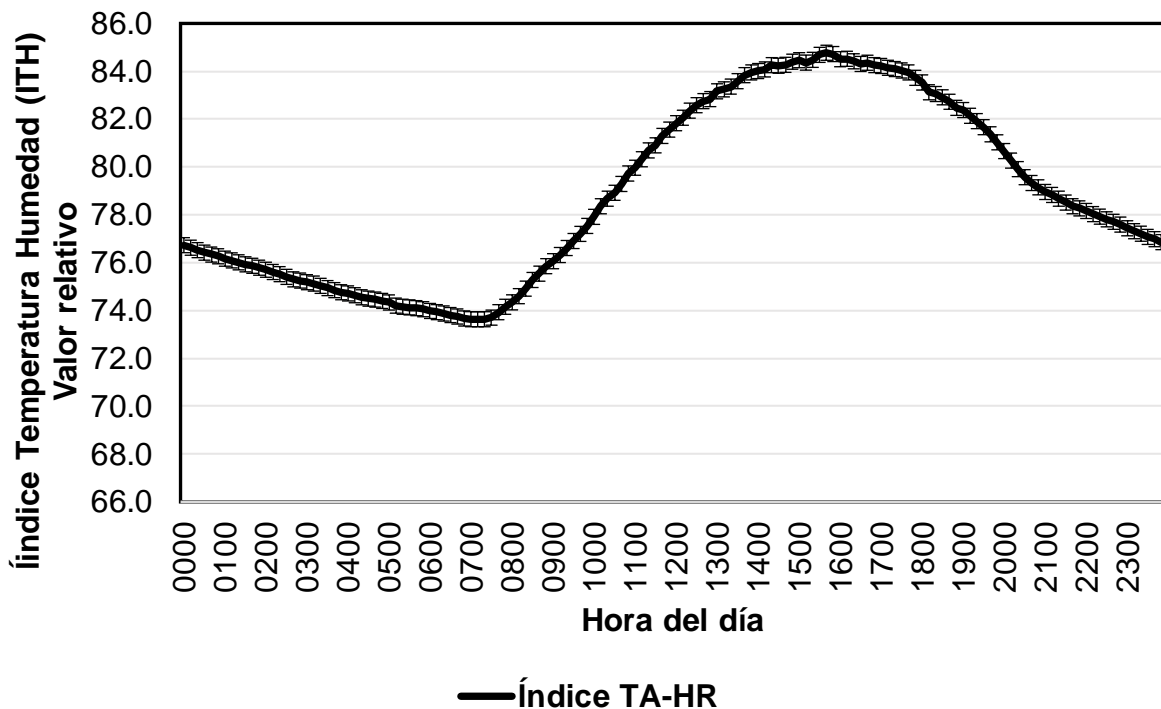


Figura 6. Variación del índice de temperatura y humedad durante las 24 h del día. Los valores mostrados para cada hora corresponden al promedio de los datos obtenidos durante el periodo experimental.

6.3. Parámetros productivos

En el Cuadro 3, se presentan los resultados de comportamiento productivo de los cerdos asignados a cada uno de los tres tratamientos. El peso vivo inicial de los cerdos fue similar ($26.72 \text{ kg} \pm 1 \text{ kg}$) en todos los tratamientos ($P > 0.05$). De igual forma no se observaron diferencias ($P > 0.05$) en el peso final de los cerdos ($45.21 \text{ kg} \pm 1 \text{ kg}$). El

consumo diario de alimento (CDA) no fue diferente en los cerdos distribuidos a los tres tratamientos, tampoco se observó efecto de la adición de metionina extra ni como DL-Met o MHA ($P>0.05$).

Se observó una tendencia a incrementar la ganancia diaria de peso (GDP) de los cerdos que fueron alimentados con los tratamientos que contenían metionina extra como DL-Met o MHA ($P<0.10$) en comparación al tratamiento testigo. No se encontraron diferencias en la GDP entre los cerdos que fueron alimentados con extra DL-Met y MHA ($P>0.10$). Para la relación ganancia-consumo (G:C) la suplementación extra de DL-Met y MHA en la dieta de los cerdos bajo condiciones de estrés por calor aumentó la eficiencia alimenticia ($P<0.05$) en comparación con el tratamiento testigo. No se observó diferencia en la relación G:C entre los cerdos suplementados con el extra de DL-Met y MHA ($P>0.10$).

Cuadro 3. Parámetros de comportamiento productivo de los cerdos bajo condiciones de EC alimentados con metionina extra como DL-Met o MHA

	Tratamiento ¹				Contrastes ² (Valores de P)		
	DL-Met 100	DL-Met 120	MHA 120	SEM	C1 ¹	C2 ¹	C3 ¹
Peso inicial (kg)	27.43	27.12	27.68	0.61			
Peso final (kg)	45.19	46.20	46.84	0.94	0.459	0.230	0.636
Consumo diario de alimento (kg/d)	1.883	1.876	1.878	0.05	0.912	0.932	0.980
Ganancia diaria de peso (kg/d)	0.846	0.909	0.912	0.03	0.100	0.100	0.941
Relación G:C	0.451	0.485	0.495	0.01	0.039	0.010	0.527

¹ Met100, dieta basal que contiene el 100% del requerimiento de Met (NRC, 2012); Met120, dieta basal más 20% adicional de DL-Met; MHA120, dieta basal más 20% equivalente de Met como MHA.

² Contrastes: C1, Met100 vs Met120; C2, Met100 vs MHA120; C3, Met120 vs MHA120

6.6 Actividad enzimática

6.6.1 Superóxido dismutasa

Los valores promedios de la actividad de SOD para los tratamientos testigo, DL-Met y MHA fueron 5.86, 6.73 y 6.79 U/ml respectivamente. La suplementación extra de DL-Met y de MHA aumentaron la actividad de SOD en comparación con el tratamiento testigo ($P < 0.05$), sin embargo, no difirió entre las fuentes DL-Met y MHA ($P > 0.05$) para los cerdos bajo condiciones de EC (Figura 7).

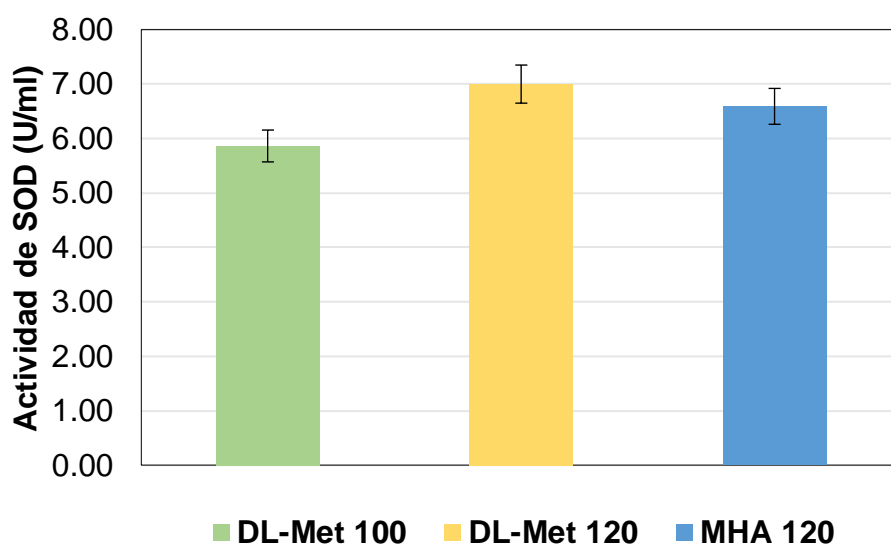


Figura 7. Actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD) en suero sanguíneo de cerdos bajo condiciones de EC.

6.6.2 Glutación peroxidasa

Los valores promedios de la actividad de GPx para los tratamientos testigo, DL-Met y MHA fueron 7.93, 8.79 y 7.03 nm/min/ml respectivamente; no se encontraron diferencias significativas por la suplementación extra de metionina como DL-Met o MHA ($P > 0.05$) para los cerdos bajo condiciones de EC (Figura 8).

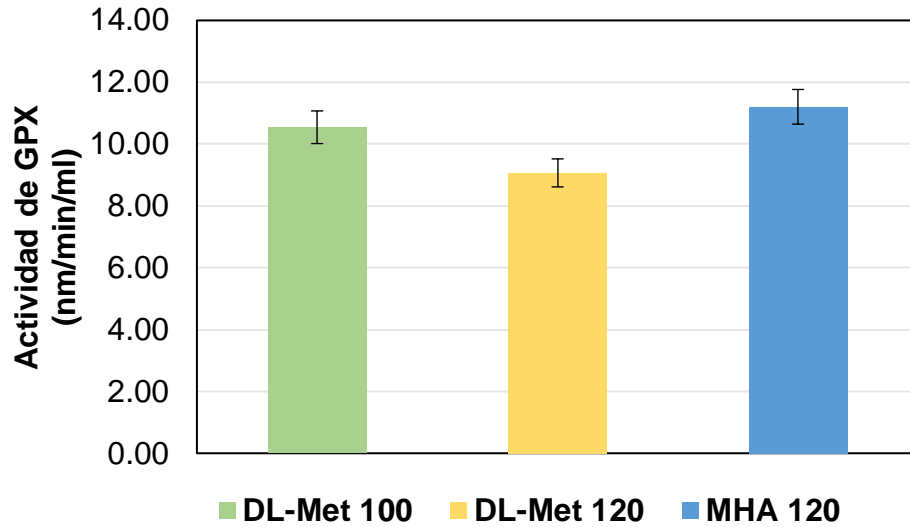


Figura 8. Actividad enzimática de glutatión peroxisada (GPx) en suero sanguíneo de cerdos bajo condiciones de EC.

6.6.3 Catalasa

Los valores promedios de la actividad de CAT para los tratamientos testigo, DL-Met y MHA fueron 208, 245 y 261 nm/min/ml respectivamente. La actividad de CAT no se vio afectada por la suplementación extra de metionina como DL-Met o MHA ($P > 0.05$) para los cerdos bajo condiciones de EC (Figura 9).

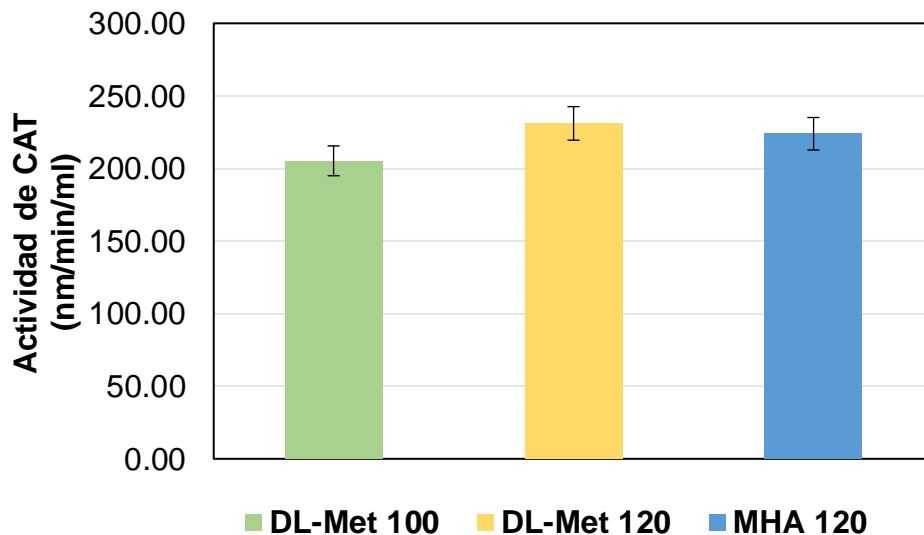


Figura 9. Actividad enzimática de catalasa (CAT) en suero sanguíneo de cerdos bajo condiciones de EC.

6.6.4 Glutación

Los valores promedios de la actividad de GSH para los tratamientos testigo, DL-Met y MHA fueron 6.88, 7.58 y 6.94 nm respectivamente. La suplementación extra de DL-Met incrementó la actividad de GSH ($P < 0.05$), sin embargo, suplementar el MHA no tuvo ningún efecto sobre la actividad de GSH ($P > 0.05$), para los cerdos bajo condiciones de EC (Figura 10).

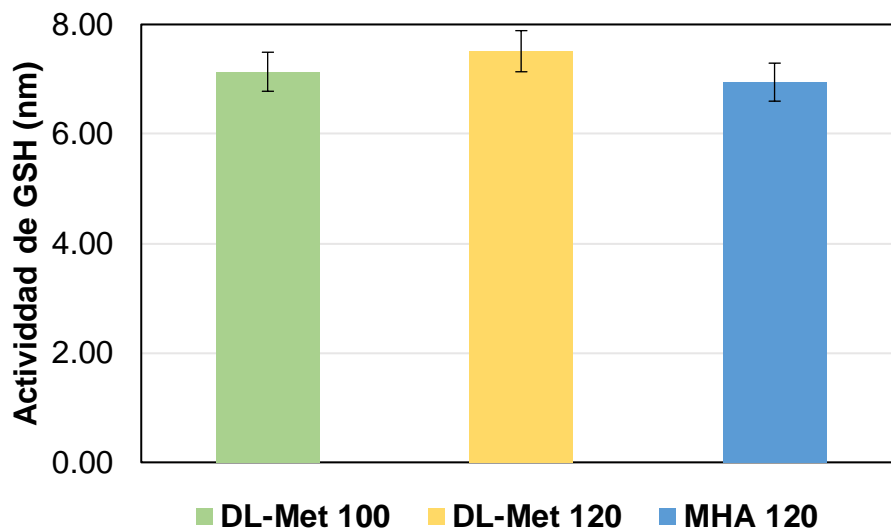


Figura 10. Actividad enzimática de glutación (GSH) en suero sanguíneo de cerdos bajo condiciones de EC.

A continuación, se muestra el resumen de los datos obtenidos para la actividad de las enzimas antioxidantes SOD, GPx, CAT, GHS (Cuadro 4).

Cuadro 4. Concentración de enzimas antioxidantes en suero sanguíneo de cerdos alimentados con metionina extra como DL-Met o MHA bajo condiciones de estrés por calor.

Enzimas	Tratamiento ¹				Contrastes ² (Valores de P)		
	Met100	Met120	MHA120	SEM	C1 ¹	C2 ¹	C3 ¹
SOD (U/ml)	5.86	6.73	6.79	0.31	0.046	0.037	0.892
GPx (nm/min/ml)	7.93	8.79	7.03	1.05	0.572	0.524	0.252
CAT (nm/min/ml)	208	245	261	31.4	0.397	0.220	0.719
GSH (nm)	6.88	7.58	6.94	0.17	0.005	0.779	0.010

¹ Met100, dieta basal que contiene el 100% del requerimiento de Met (NRC, 2012); Met120, dieta basal más 20% adicional de DL-Met; MHA120, dieta basal más 20% equivalente de Met como MHA.

² Contrastes: C1, Met100 vs Met120; C2, Met100 vs MHA120; C3, Met120 vs MHA120

6.4 Morfología intestinal

De acuerdo con los resultados obtenidos, la altura de las vellosidades, la profundidad de las criptas y la relación altura de vellosidad:profundidad de cripta fueron diferentes entre las diferentes secciones del intestino delgado, duodeno, yeyuno e ileon, así como entre los diferentes tratamientos (Cuadro 5).

En duodeno, la altura de vellosidad no fue diferente entre tratamientos ($P > 0.05$); sin embargo, la variable profundidad de cripta fue menor ($P < 0.01$) en los cerdos que recibieron 20% extra de DL-Met y MHA en comparación con el tratamiento testigo, con un promedio de 253 y 265 micras respectivamente. Con la adición de DL-Met y MHA se observó una mayor relación altura de vellosidad:profundidad de cripta en comparación con el tratamiento testigo ($P < 0.01$), con un promedio de 2.48 y 2.38 respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en los parámetros de altura de vellosidad y

profundidad de cripta en duodenos de los cerdos suplementados con de DL-Met y MHA ($P>0.05$).

En yeyuno la altura de las vellosidades fue mayor en los cerdos suplementados con DL-Met y MHA en comparación con el tratamiento testigo ($P<0.01$), con un promedio de 728 y 702 micras respectivamente. La profundidad de las criptas fue menor en los cerdos suplementados con DL-Met y MHA en comparación con el tratamiento testigo ($P<0.01$), con un promedio de 223 y 227 micras respectivamente. Se pudo observar una mayor relación de altura de vellosidad:profundidad de cripta con los tratamientos DL-Met y MHA comparados con el tratamiento testigo ($P<0.01$), con valores promedios de 3.35 y 3.18 respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre los cerdos suplementados con de DL-Met y MHA ($P>0.05$).

En íleon la altura de vellosidad fue mayor con la adición de DL-Met y MHA en comparación con el tratamiento testigo ($P<0.01$), con un promedio de 533 y 509 micras respectivamente. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos para la profundidad de cripta ($P>0.05$). La relación altura de vellosidad:profundidad de cripta fue mayor con la adición de DL-Met y MHA en comparación con el tratamiento testigo ($P<0.01$), con valores promedio de 2.35 y 2.45 respectivamente; no se encontraron diferencias significativas entre los cerdos suplementados con el extra de DL-Met y MHA ($P>0.05$).

Cuadro 5. Histomorfología de duodeno, yeyuno e íleon de cerdos expuestos a condiciones de estrés por calor alimentados con metionina extra como DL-Met o MHA.

Segmento (μm)	Tratamiento ¹			SEM	Contrastes ² (Valores de P)		
	Met 100	Met 120	MHA 120		C1	C2	C3
Duodeno							
Altura de vellosidad	604	607	607	10	0.822	0.813	0.990
Profundidad de cripta	314	253	265	9	<0.001	<0.001	0.364
AV:PC	1.98	2.48	2.38	0.06	<0.001	<0.001	0.231
Yeyuno							
Altura de vellosidad	635	728	702	12	<0.001	<0.001	0.117
Profundidad de cripta	279	223	227	7	<0.001	<0.001	0.600
AV:PC	2.34	3.35	3.18	0.08	<0.001	<0.001	0.115
Íleon							
Altura de vellosidad	444	533	509	9	<0.001	<0.001	0.063
Profundidad de cripta	234	236	244	17	0.915	0.667	0.747
AV:PC	1.98	2.35	2.45	0.06	<0.001	<0.001	0.271

¹ Met100, dieta basal que contiene el 100% del requerimiento de Met (NRC, 2012); Met120, dieta basal más 20% adicional de DL-Met; MHA120, dieta basal más 20% equivalente de Met como MHA.

² Contrastes: C1, Met100 vs Met120; C2, Met100 vs MHA120; C3, Met120 vs MHA120

6.5 Expresión de transportadores de aminoácidos

En la Figura 11 se presenta la expresión relativa del ARNm de los transportadores de aminoácidos neutros B⁰ (A) y b^{0,+} (B) en duodeno, yeyuno e íleon de los cerdos alimentados con metionina extra expuestos a condiciones de estrés por calor. Además, en el Cuadro 6 se presentan los resultados del análisis estadístico de Δ Ct para la expresión de cada transportador corregido por el Ct del gen de referencia (RPL4), en relación con el tratamiento testigo de acuerdo con la metodología de Livak y Smitgen (2001).

La suplementación extra de metionina como DL-Met o MHA no modificó la expresión relativa del transportador B⁰ en duodeno, yeyuno e íleon ($P > 0.05$). La expresión relativa del transportador b^{0,+} en duodeno, yeyuno e íleon no se vio afectada por la suplementación extra de metionina como DL-Met o MHA en comparación con el tratamiento testigo. Sin embargo, la adición extra de metionina como DL-Met provocó un mayor expresión del transportador b^{0,+} en yeyuno en comparación con la dieta enriquecida con MHA ($P < 0.05$).

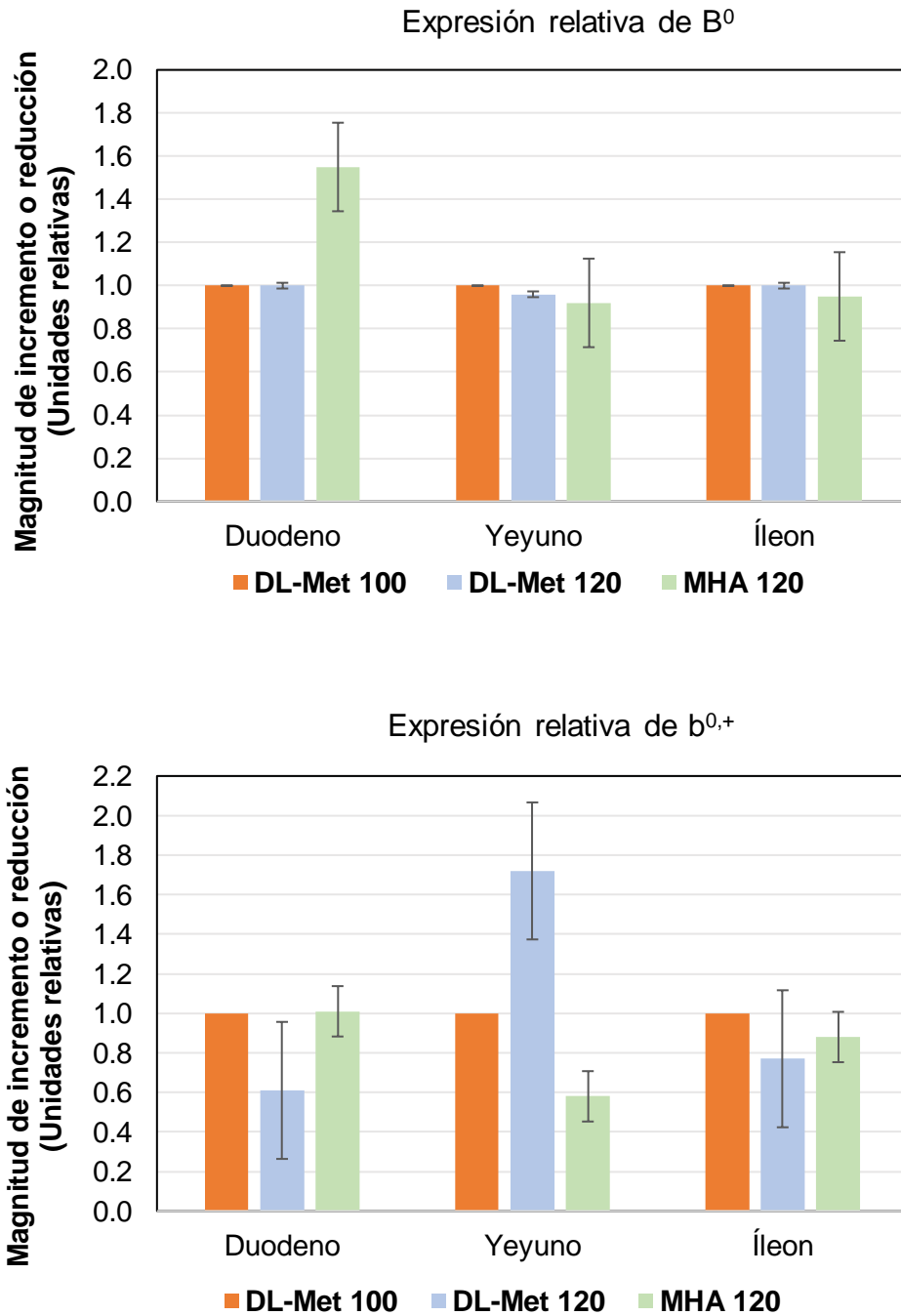


Figura 11. Expresión relativa de los transportadores de aminoácidos B⁰ y b^{0,+}, en los segmentos de intestino delgado duodeno, yeyuno e íleon de cerdos alimentados con metionina extra como DL-Met o MHA bajo condiciones de estrés por calor.

Cuadro 6. Análisis del ΔCt de la expresión del ARNm de los transportadores de aminoácidos B⁰ y b^{0,+} en intestino delgado de cerdos bajo condiciones de estrés por calor alimentados con metionina extra como DL-Met o MHA.

Item	Tratamiento ¹			SEM	Contrastes ² (Valores de P)		
	Met100	Met120	MHA120		C1	C2	C3
Duodeno							
B ⁰	4.26	4.26	3.63	0.39	0.999	0.267	0.267
b ^{0,+}	6.89	7.61	6.88	0.32	0.131	0.976	0.124
Yeyuno							
B ⁰	4.64	4.70	4.75	0.26	0.868	0.762	0.891
b ^{0,+}	6.44	5.66	7.24	0.44	0.238	0.231	0.028
Íleon							
B ⁰	2.88	2.88	2.95	0.13	0.997	0.709	0.706
b ^{0,+}	5.11	5.49	5.30	0.24	0.292	0.586	0.598

¹ Met100, dieta basal que contiene el 100% del requerimiento de Met (NRC, 2012); Met120, dieta basal más 20% adicional de DL-Met; MHA120, dieta basal más 20% equivalente de Met como MHA.

² Contrastes: C1, Met100 vs Met120; C2, Met100 vs MHA120; C3, Met120 vs MHA120

VII. DISCUSIÓN

Más de un 50% de la producción porcina en el mundo es llevada a cabo en regiones tropicales o subtropicales. Esto resulta ser un problema frecuente en los sistemas de producción, sobre todo porque en regiones extremadamente cálidas durante el verano se afecta la salud y producción de los animales (Waltz et al., 2014). En México la mayor parte de la producción de cerdos se realiza en regiones donde, durante la época de verano, la temperatura ambiental se incrementa notablemente generando estrés por calor (Bobadilla et al., 2010).

La temperatura ambiente (TA) y humedad relativa (HR) elevadas, contribuyen al estrés por calor en los animales. Cada especie animal responde diferente al estrés por calor (Pearce et al., 2013), dado que existe una diferencia en la zona termoneutral (ZT) de diferentes especies animal. De acuerdo con Huynh et al., (2005) la temperatura de confort de cerdos en crecimiento es de 18 °C a 21 °C; cerdos expuestos a temperatura ambiente superior manifiestan signos de estrés por calor (Pearce et al., 2012, 2013).

Durante el periodo experimental de este trabajo, los cerdos fueron alojados en condiciones en que la TA fluctuó entre los 24 y 34 °C y la HR entre 48 y 85%. Se observó que durante 9 horas al día (1100 h a 2000 h) los cerdos estuvieron expuestos a temperaturas superiores a 30 °C y HR superior a 50%. Estas condiciones fueron superiores a las condiciones de confort recomendadas para cerdos en crecimiento. Así que de acuerdo con Collin et al., (2001), los cerdos en este experimento debieron padecer de estrés por calor.

El índice de temperatura-humedad (ITH) combina los efectos de la temperatura ambiente y la humedad relativa, es un número calculado el cual se utiliza para indicar la sensación térmica en grados Fahrenheit (Xin y Harmon, 1998). De acuerdo con Hahn et al., (2009) se consideran 3 zonas de ITH, de alerta 75-78, peligro 79-83 y emergencia ≥ 84 . Considerando que los valores de ITH de este trabajo oscilaron entre 73.6 y 84.8

indica que los cerdos estuvieron expuestos durante el día a condiciones de alerta, peligro y emergencia.

Es bien conocido que cuando los animales están expuestos a condiciones ambientales que exceden su zona termoneutral, la eficiencia productiva se ve comprometida porque la jerarquía de utilización de nutrientes se prioriza para mantener la temperatura corporal y, en consecuencia, se resta importancia a la productividad (Mayorga et al., 2018). Este efecto resulta muy marcado en etapas de crecimiento y finalización en comparación con cerdos más jóvenes (Baker, 2004; Collin et al., 2001; St-Pierre et al., 2003).

Diversos estudios demuestran que una de las principales causas de atraso en el crecimiento de cerdos que son expuestos a condiciones de EC, es la reducción en el consumo de alimento. Según Collin et al., (2001), se puede alcanzar una reducción del 40% o más dependiendo del tiempo y el grado de exposición a calor. Otros autores Baumgard y Rhoads, (2013); Pearce et al., (2013) demuestran que la reducción en el consumo de alimento puede ser entre un 47% a 50%. Sin embargo, debido a que todos los cerdos de este experimento estuvieron bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad, no fue posible observar diferencia en el consumo de alimento.

En cambio, Morales et al., (2014) sí habían reportado una disminución de un 11.4% en la ganancia de peso de cerdos expuestos a EC comparados con cerdos que habían sido alimentados en condiciones termoneutrales. Otros trabajos realizados por Le Bellego et al., (2002) con cerdos en crecimiento y finalización bajo condiciones de EC evidenciaron una reducción entre un 10% y 16 % en la GDP. En consecuencia, Morales et al., (2018; 2019) destacaron que cubrir los requerimientos de AA indicados en el NRC puede no ser suficiente para satisfacer las necesidades de mantenimiento y producción de cerdos en condiciones de EC; por tanto, Cervantes et al., (2016) propusieron que suplementar las dietas con AA en forma libre podría contribuir a mejorar los parámetros productivos de cerdos en crecimiento que son expuestos a condiciones de EC.

En contraste, en el presente trabajo se observó que con la adición extra de Met en forma de DL-Met y MHA, la GDP de los cerdos tendió a incrementar un 7%; en consecuencia la relación ganancia:consumo (G:C) también mejoró para los cerdos que recibieron los tratamientos con el extra de Met. De forma similar, estudios realizados por Chen et al., (2014); Kaewtapee et al., (2010), encontraron que la suplementación de DL-Met mejoró la relación G:C en lechones al destete. Cabe destacar que las dietas ofrecidas además de la adición extra de Met fueron formuladas con un 20% extra de AA en forma libre, Lis, Tre y Val, siendo estos considerados como primero, segundo y quinto AA limitante en las dietas para cerdos respectivamente (NRC, 2012). En coincidencia con Morales et al., (2018; 2019) es probable que la suplementación con estos AA limitantes haya favorecido su absorción en el tracto gastrointestinal y disponibilidad en tejidos corporales.

Se ha demostrado que además de afectar los parámetros productivos, el EC incrementa las concentraciones de radicales libres en estado estacionario, lo que resulta en daño oxidativo celular y mitocondrial (Slimen et al., 2016). De manera natural, los procesos biológicos pueden conducir a reacciones de reducción-oxidación que generan especies reactivas de oxígeno (ROS) potencialmente dañinas, como peróxidos y radicales libres (Lowe, 2014).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se derivan del metabolismo del oxígeno como subproductos de la respiración. En consecuencia, se desencadena el estrés oxidativo causando un desequilibrio entre los compuestos prooxidantes y antioxidantes que pueden causar daños irreversibles a las biomoléculas y provocar una disfunción celular (Finkel y Holbrook, 2000; Gonsette, 2008; Slimen et al., 2014). Sin embargo, el organismo cuenta con una maquinaria antioxidante compuesta por sistemas no enzimáticos y enzimas endógenas (Soares et al., 2017). El papel fisiológico de los antioxidantes es prevenir el daño a los componentes celulares que surgen como consecuencia de las reacciones químicas que involucran a los radicales libres (Young y Woodside, 2001). Las enzimas endógenas que participan en estos procesos son superóxido dismutasa (SOD) que cataliza la dismutación de los radicales superóxido a

peróxido de hidrógeno, el cual puede ser degradado por otras dos enzimas endógenas, catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPx) (Bó et al., 2015; Finkel y Holbrook, 2000; Lowe, 2014). Entre los antioxidantes no enzimáticos se destaca el glutatión (GSH), un tripéptido (γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina), que ayuda a reducir el peróxido de hidrógeno a través de la transferencia de electrones para GPx (Lu, 2009).

En el presente trabajo, se midió la actividad antioxidante de SOD, GPx, CAT y GSH y se encontró que la actividad de SOD se incrementó en un 14% y 15% con la adición extra de DL-Met y MHA respectivamente, en comparación con el tratamiento sin adición extra de Met. SOD actúa como primera línea de defensa contra los radicales libres catalizando la conversión de superóxido a peróxido de hidrógeno para convertirlo en agua y oxígeno molecular (Wang et al., 2018). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que la actividad de SOD se ve comprometida durante condiciones de estrés por calor prolongado, dando como resultado el agotamiento y la alteración de su actividad, en consecuencia se incrementa el estrés oxidativo (Akbarian et al., 2016; Slimen et al., 2014; Xiong et al., 2020). En un trabajo realizado por Wu et al., (2012) se informó que la deficiencia de Met reducía la actividad SOD en pollos de engorde; sin embargo niveles más altos de Met en la dieta aumentaban la actividad de SOD en suero (Jankowski et al., 2017; Zduńczyk et al., 2017). En otro trabajo realizado por Castellano et al., (2015) en cerdos en crecimiento se observó un aumento de la actividad de SOD en hígado con la adición de Met. Estos estudios coinciden con los resultados encontrados en el presente trabajo en donde el incremento en la actividad de SOD es un indicativo de mayor dismutación de radicales libres originados en las mitocondrias, por lo que se especula que la adición de Met extra en la dieta podría ayudar a fortalecer el sistema antioxidante mejorando la actividad de SOD.

Las enzimas GPx y CAT funcionan en conjunto para reducir los niveles de peróxido de hidrógeno en la célula. La GPx se encuentra en el citoplasma y las mitocondrias, mientras que CAT se encuentra principalmente en los peroxisomas donde la producción de peróxido de hidrógeno puede ser alta debido a la β -oxidación (Baud et al., 2004; Birben et al., 2012; Ighodaro y Akinloye, 2018). Sin embargo, en el presente trabajo la

actividad de GPx y CAT no se vio afectada con la adición extra de Met ni de su hidroxianálogo.

Metionina de forma libre o unido a proteínas, puede metabolizarse de forma rápida e interactuar con varias especies reactivas de oxígeno, siendo los residuos de Met fácilmente oxidados a derivados de sulfóxido de metionina (Met-O). Afortunadamente existen mecanismos que pueden reparar fácilmente estas oxidaciones por la acción del sistema metionina sulfóxido reductasa (Msrs: MsrA, MsrB), proteínas que catalizan la reducción de Met-O en Met (Levine et al., 2000; Luo y Levine, 2009; Moskovitz et al., 2001). La conversión cíclica de MetO a Met en la célula produce un efecto depurador de ROS. Considerando que los residuos de metionina constituyen un importante mecanismo de defensa antioxidante (Levine et al., 1996), cada ciclo de oxidación y reducción de metionina destruirá un equivalente de ROS, lo que podría representar un sistema natural de eliminación de ROS (Métayer et al., 2008). Nuestros resultados podrían indicar que Met pudo contrarrestar el estrés oxidativo e intervenir indirectamente en la reducción de la actividad de estas enzimas. En coincidencia con Ognik y Krauze, (2016) en un trabajo realizado en aves, estos autores indicaron que un incremento en la actividad de SOD acompañado de niveles estables de GPx y CAT es una manifestación de la mejora o estabilidad del estado antioxidante en sangre. También Zduńczyk et al., (2017) realizaron un trabajo en pavos jóvenes adicionando diferentes niveles de DL-Met y MHA, y encontraron que la actividad de SOD mejoró y no se observaron cambios en la actividad de GPx y CAT; ellos sugirieron que el nivel más alto de Met en la dieta tuvo una influencia beneficiosa en el estado antioxidante de los pavos.

Met puede mantener la homeostasis redox celular a través de la síntesis de cisteína (Cis) (Yu et al., 2020). Aproximadamente el 20% de la ingesta dietética de Met se transmetila a homocisteína y se transulfura a cisteína (Bauchart-Thevret et al., 2009). Cis es un aminoácido semiesencial que desempeña un papel importante en la homeostasis celular al ser precursor de Glutación reducido (GSH) (Yin et al., 2016a). El GSH es un tiol antioxidante muy abundante a nivel celular, que puede eliminar las especies reactivas de oxígeno protegiendo a las células del estrés oxidativo (Chen, et al.,

2013a; Yin, et al., 2016b). A pesar de que Cis se sintetiza en varios tejidos, se considera que es un factor limitante para la síntesis de GSH (Rasch et al., 2020).

En el presente trabajo se observó que la actividad de GSH se incrementó en un 10% con el nivel extra de DL-Met en la dieta en comparación con el tratamiento sin Met extra. Probablemente este resultado se deba a que la adición de Met favoreció la conversión de Met a Cis lo que pudo estimular una mayor síntesis de GSH. Los hallazgos de este trabajo son consistentes con los resultados de otros trabajos como el de Pérez, (2021) que encontró que al adicionar un 20% extra de Met en la dieta de cerdos en crecimiento que estaban en EC la actividad de GSH tendió a ser mayor en suero sanguíneo. Espinosa et al. (2021) también evidenciaron un aumento de la concentración total de GSH en tejido hepático de lechones destetados alimentados con una dieta suplementada con 0.108 % de Met cuando se comparaba con cerdos alimentados con una dieta basal. Otros trabajos realizados en aves concluyeron que el aumento de los niveles de Met en la dieta contribuyen a un aumento en las concentraciones de GSH (Chen et al., 2013b; Németh et al., 2004). Además, Wang et al., (2019) concluyeron que el incremento de la actividad de GSH en suero, hígado e intestino estaba influenciado por el nivel más alto de Met en la dieta de pollos de engorde.

Con base en nuestros resultados, especulamos que el estrés por calor causó una disminución en la capacidad antioxidante y alteró el equilibrio entre el estado oxidativo y antioxidante. Sin embargo, probablemente adicionar Met extra en la dieta pudo ayudar a restaurar el equilibrio, lo que indica que Met puede tener un papel protector contra el estrés oxidativo inducido por el EC y podría fortalecer el sistema antioxidante al mejorar o favorecer la actividad de SOD, GPx, CAT y GSH.

El tracto gastrointestinal (TGI) de los mamíferos en general es muy sensible a cargas de calor (Kregel, 2002; Ortega y Szabó, 2021). Se ha documentado que cuando los cerdos se exponen a altas temperaturas se eleva el flujo sanguíneo y se redistribuye a los órganos periféricos en un intento por disipar el calor (Pearce et al., 2014). En consecuencia se reduce el flujo sanguíneo a los órganos internos (Ooue et al., 2007), lo

que provoca daños en el epitelio intestinal por deficiencia de nutrientes y oxígeno (Liu et al., 2009). El EC ocasiona cambios en la integridad y la funcionalidad del intestino delgado afectando negativamente su morfología e histología (Cui y Gu, 2015; Ortega y Szabó, 2021), esperando una reducción en la altura de las vellosidades y mayor profundidad de las criptas (Pearce et al., 2014). De hecho, varios trabajos realizados por Pearce et al., (2013); Yu et al., (2010) han evidenciado que exponer cerdos constantemente al EC, disminuye el área de absorción de nutrientes en el intestino ya que se disminuye la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas, lo que causa una disminución en la proliferación y diferenciación celular.

En este trabajo se observó mayor altura de las vellosidades en yeyuno e íleon, y la profundidad de las criptas mejoró en duodeno y yeyuno cuando se adicionó DL-Met y MHA extra en la dieta. La relación entre la altura de vellosidades y la profundidad de las criptas, que se considera un criterio útil para estimar la capacidad digestiva y la integridad del epitelio intestinal (Micanor, 2019; Montagne et al., 2003), también mejoró en los tres segmentos intestinales con la adición extra de DL-Met y MHA. Estos resultados podrían indicar que la presencia de DL-Met y MHA propició una mayor actividad en el epitelio intestinal para mantener la proliferación y diferenciación de los enterocitos, lo cual podría asociarse con una mejora en la capacidad de digestión y absorción de nutrientes para mantener la proliferación y división celular (Upadhaya et al., 2020). En concordancia con estos resultados, un valor más alto en la relación altura de vellosidad/profundidad de cripta generalmente indica que el área de absorción es mayor, y que se reclutan menos células epiteliales intestinales para la renovación celular, por lo que más enterocitos pueden estar disponibles para la digestión y absorción de nutrientes (Qin et al., 2019).

Trabajos recientes realizados por Morales et al., (2019; 2020), demuestran aumento en la altura de las vellosidades y en la relación altura de las vellosidades:profundidad de las criptas. Estos trabajos sugieren que suplementar las dietas de cerdos en EC con AA libres podría reducir la producción de calor por digestión y contribuir a evitar un daño adicional en el epitelio intestinal. En este sentido, la adición de Met en la dieta en forma libre, pudo ayudar a reducir los posibles daños ocasionados

en el epitelio intestinal inducidos por el EC. La respuesta a metionina a nivel celular se reflejó en la mayor síntesis y actividad de GSH, mismo que tiene un papel importante en la función antioxidante del epitelio intestinal (Su et al., 2018), y que es un determinante crítico en la proliferación y diferenciación de las células epiteliales mediante la regulación del estado redox (Wu et al., 2017).

Por lo anterior, es importante que la histomorfología del intestino delgado sea saludable para que la utilización y absorción de nutrientes sea eficiente (Liao y Nyachoti, 2017). Ortega y Szabó (2021) mencionan que vellosidades más largas son un indicador de que el número de células absorbentes incrementa y en consecuencia se incrementa la abundancia de transportadores de AA en las membranas celulares, de los cuales depende la disponibilidad de AA (Mastrototaro et al., 2016). Sin embargo Cervantes et al., (2016) y Morales et al., (2014) han evidenciado que el EC afecta la expresión de genes que codifica para transportadores de AA en diferentes tejidos, como intestino, hígado y músculo. Metionina en forma libre es transportado por el transportador B^0 dependiente de Na^+ , que transporta AA neutros, y por el transportador $b^{0,+}$ que, independiente de Na^+ , transporta AA neutros y catiónicos (Mastrototaro et al., 2016; Zhang et al., 2017). El sistema B^0 es el principal transportador de AA neutro en el intestino delgado (Bröer, 2008; Zhang et al., 2017) y preferentemente transporta Leu, Ile, Val y Met (Reimer et al., 2000).

En el presente trabajo la expresión relativa del transportador B^0 fue similar en todos los tratamientos en los tres segmentos intestinales. De acuerdo con Zhang et al., (2017) la expresión de genes que codifican transportadores para Met es compleja, ya que puede depender del equilibrio y la disponibilidad de otros aminoácidos. Cabe mencionar que la composición de las tres dietas ofrecidas en este experimento contenía un 20% extra de Lis, Tre y Val. Probablemente pudo haber ocurrido una competencia por el transportador entre Met y Val que son AA neutros y que además son el tercer y quinto AA limitante respectivamente en dietas para cerdos, esto pudo evitar alteraciones en la expresión del transportador B^0 .

La expresión relativa del transportador $b^{0,+}$ tampoco se vio afectada por la adición extra de Met en la dieta; puesto que, se sabe que los AA compiten para su absorción a nivel celular, en este caso también la entrada de AA neutros puede afectar la absorción de AA catiónicos (Bröer, 2008). Por otra parte, en algunos estudios como el de Morales et al. (2014), se reportó que la expresión de $b^{0,+}$ disminuyó cuando los cerdos eran expuesto a temperatura ambiente de 43 a 45 °C. Adicionalmente, Cervantes et al., (2016) reportaron que la expresión de este transportador dependía de la intensidad y duración de la exposición al calor ya que cuando los cerdos fueron expuestos a temperatura ambiente de 34 a 37 °C no se afectó la expresión de $b^{0,+}$. Este último resultado coincide con los resultados del presente trabajo, en que la temperatura ambiente máxima fue de 34.6 °C, y sin embargo, no se observó efecto sobre la expresión del transportador en ninguno de los tres segmentos intestinales cuando se adicionó Met extra; únicamente cuando se compararon ambas fuentes DL-Met y MHA, la expresión relativa de $b^{0,+}$ se incrementó con la adición de DL-Met en yeyuno; este resulta puede estar relacionado con la biodisponibilidad de ambas fuentes en términos de estimular la absorción de AA en el intestino delgado; ya que de acuerdo con Shoveller et al., (2010), la biodisponibilidad de MHA para cerdos en crecimiento es considerablemente menor que la de DL-Met, sin embargo se requieren más estudios acerca de la adición de DL-Met y su análogo MHA a dietas para cerdos en crecimiento que son expuesto a condiciones de estrés por calor.

VIII. CONCLUSIONES

Adicionar metionina a niveles 20% superiores al recomendado, a dietas para cerdos en crecimiento bajo condiciones de estrés por calor, ayuda a recuperar la ganancia diaria de peso y la eficiencia alimenticia, incrementa la actividad antioxidante de superóxido dismutasa y glutatión. Además, favorece la recuperación de las características histológicas del epitelio en intestino delgado, sin afectar la expresión relativa de los transportadores de AA en epitelio intestinal.

IX. LITERATURA CITADA

- Akbarian, A., Michiels, J., Degroote, J., Majdeddin, M., Golian, A., y De Smet, S. (2016). Association between heat stress and oxidative stress in poultry; mitochondrial dysfunction and dietary interventions with phytochemicals. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 7, 37. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0097-5>
- Alshamy, Z., Richardson, K. C., Hünigen, H., Hafez, H. M., Plendl, J., y Al Masri, S. (2018). Comparison of the gastrointestinal tract of a dual-purpose to a broiler chicken line: A qualitative and quantitative macroscopic and microscopic study. *PloS One*, 13(10), e0204921. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204921>
- Baker, J. E. (2004). Effective environmental temperature. *Journal of Swine Health and Production*, 12, 140-143.
- Balasaheb, N. S., y Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986-28006. <https://doi.org/10.1039/C4RA13315C>
- Bauchart-Thevret, C., Stoll, B., Chacko, S., y Burrin, D. G. (2009). Sulfur amino acid deficiency upregulates intestinal methionine cycle activity and suppresses epithelial growth in neonatal pigs. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 296(6), E1239-E1250. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.91021.2008>
- Baud, O., Greene, A. E., Li, J., Wang, H., Volpe, J. J., y Rosenberg, P. A. (2004). Glutathione peroxidase-catalase cooperativity is required for resistance to hydrogen peroxide by mature rat oligodendrocytes. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(7), 1531-1540. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3989-03.2004>

- Baumgard, L. H., y Rhoads, R. P. (2013). Effects of Heat Stress on Postabsorptive Metabolism and Energetics. *Annual Review of Animal Biosciences*, 1(1), 311-337. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-031412-103644>
- Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N., y Nardone, A. (2002). Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *Journal of Dairy Science*, 85(9), 2173-2179. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74296-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74296-3)
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., y Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9-19. <https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>
- Black, J. L., Mullan, B. P., Lorsch, M. L., y Giles, L. R. (1993). *Lactation in the sow during heat stress.* 35. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030162269390188N>
- Bó, C., Martini, D., Porrini, M., Klimis-Zacas, D., y Riso, P. (2015). Berries and oxidative stress markers: An overview of human intervention studies. *Food & Function*, 6(9), 2890-2917. <https://doi.org/10.1039/c5fo00657k>
- Bobadilla, E. E., Espinoza Ortega, A., y Martínez Castañeda, F. E. (2010). Dinámica de la producción porcina en México de 1980 a 2008. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 1(3), 251-268.
- Bröer, S. (2008). Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiological Reviews*, 88(1), 249-286. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2006>
- Bröer, S., y Gauthier-Coles, G. (2021). Amino Acid Homeostasis in Mammalian Cells with a Focus on Amino Acid Transport. *The Journal of Nutrition*, nxab342. <https://doi.org/10.1093/jn/nxab342>

- Brosnan, J. T., y Brosnan, M. E. (2006). The Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview. *The Journal of Nutrition*, 136(6), 1636S-1640S. <https://doi.org/10.1093/jn/136.6.1636S>
- Burrin, D. G., y Stoll, B. (2007). Emerging aspects of gut sulfur amino acid metabolism. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 10(1), 63-68. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3280115d36>
- Camargo, S. M. R., Singer, D., Makrides, V., Huggel, K., Pos, K. M., Wagner, C. A., Kuba, K., Danilczyk, U., Skovby, F., Kleta, R., Penninger, J. M., y Verrey, F. (2009). Tissue-specific amino acid transporter partners ACE2 and collectrin differentially interact with hartnup mutations. *Gastroenterology*, 136(3), 872-882. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.055>
- Castellano, R., Perruchot, M.-H., Conde-Aguilera, J. A., van Milgen, J., Collin, A., Tesseraud, S., Mercier, Y., y Gondret, F. (2015). A Methionine Deficient Diet Enhances Adipose Tissue Lipid Metabolism and Alters Anti-Oxidant Pathways in Young Growing Pigs. *PloS One*, 10(7), e0130514. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130514>
- Cayman Chemical. (2016). *Glutathione Assay Kit (GSH Assay Kit) | Cayman Chemical*. <https://www.caymanchem.com/product/703002/glutathione-assay-kit>
- Cayman Chemical. (2017). *Catalase Assay Kit (CAT) | Cayman Chemical*. <https://www.caymanchem.com/product/707002/catalase-assay-kit>
- Cayman Chemical. (2018). *Superoxide Dismutase Assay Kit (SOD Assay Kit) | Cayman Chemical*. <https://www.caymanchem.com/product/706002/superoxide-dismutase-assay-kit>

- Cayman Chemical. (2019). *Glutathione Peroxidase Assay Kit (GPX Assay Kit) | Cayman Chemical*. <https://www.caymanchem.com/product/703102/glutathione-peroxidase-assay-kit>
- Cervantes, M., Cota, M., Arce, N., Castillo, G., Avelar, E., Espinoza, S., y Morales, A. (2016). Effect of heat stress on performance and expression of selected amino acid and glucose transporters, HSP90, leptin and ghrelin in growing pigs. *Journal of Thermal Biology*, 59, 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2016.04.014>
- Chen, Y., Dong, H., Thompson, D. C., Shertzer, H. G., Nebert, D. W., y Vasiliou, V. (2013a). Glutathione defense mechanism in liver injury: Insights from animal models. *Food and Chemical Toxicology*, 60, 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.008>
- Chen, Y., Chen, X., Zhang, H., y Zhou, Y. M. (2013b). Effects of dietary concentrations of methionine on growth performance and oxidative status of broiler chickens with different hatching weight. *British Poultry Science*, 54(4), 531-537. <https://doi.org/10.1080/00071668.2013.809402>
- Chen, Y., Li, D., Dai, Z., Piao, X., Wu, Z., Wang, B., Zhu, Y., y Zeng, Z. (2014). L-methionine supplementation maintains the integrity and barrier function of the small-intestinal mucosa in post-weaning piglets. *Amino Acids*, 46(4), 1131-1142. <https://doi.org/10.1007/s00726-014-1675-5>
- Clevers, H. (2013). The Intestinal Crypt, A Prototype Stem Cell Compartment. *Cell*, 154(2), 274-284. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.004>
- Collin, A., Milgent, J. van, y Dividich, J. L. (2001). Modelling the effect of high, constant temperature on food intake in young growing pigs. *Animal Science*, 72(3), 519-527. <https://doi.org/10.1017/S1357729800052048>

- Collins, J. T., Nguyen, A., y Badireddy, M. (2020). *Anatomy, Abdomen and Pelvis, Small Intestin*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459366>
- Cross, A. J., Brown-Brandl, T. M., Keel, B. N., Cassady, J. P., y Rohrer, G. A. (2020). Feeding behavior of grow-finish swine and the impacts of heat stress. *Translational Animal Science*, 4(2), 986-992. <https://doi.org/10.1093/tas/txaa023>
- Cui, Y., y Gu, X. (2015). Proteomic changes of the porcine small intestine in response to chronic heat stress. *Journal of Molecular Endocrinology*, 55(3), 277-293. <https://doi.org/10.1530/JME-15-0161>
- Curtis, Schindelin, J., Hiner, M. C., DeZonia, B. E., Walter, A. E., Arena, E. T., y Eliceiri, K. W. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 529. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>
- Dibner, J. J. (2003). Review of the metabolism of 2-hydroxy-4-(methylthio) butanoic acid*. *World's Poultry Science Journal*, 59(1), 99-110. <https://doi.org/10.1079/WPS20030006>
- D'Mello, J. P. F. (Ed.). (2003). *Amino acids in animal nutrition* (2nd ed). CABI Pub.
- Ellman, G. L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82(1), 70-77. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
- Espinosa, C. D., Mathai, J. K., Blavi, L., Liu, Y., Htoo, J. K., Caroline Gonzalez-Vega, J., y Stein, H. H. (2021). Effects of supplemental d-methionine in comparison to l-methionine on nitrogen retention, gut morphology, antioxidant status, and mRNA abundance of amino acid transporters in weanling pigs. *Journal of Animal Science*, 99(9), skab248. <https://doi.org/10.1093/jas/skab248>
- Fang, Z., Yao, K., Zhang, X., Zhao, S., Sun, Z., Tian, G., Yu, B., Lin, Y., Zhu, B., Jia, G., Zhang, K., Chen, D., y Wu, D. (2010). Nutrition and health relevant regulation of

- intestinal sulfur amino acid metabolism. *Amino Acids*, 39(3), 633-640.
<https://doi.org/10.1007/s00726-010-0502-x>
- Finkel, T., y Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408(6809), 239-247. <https://doi.org/10.1038/35041687>
- Finkelstein, J. D. (1990). Methionine metabolism in mammals. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 1(5), 228-237. [https://doi.org/10.1016/0955-2863\(90\)90070-2](https://doi.org/10.1016/0955-2863(90)90070-2)
- Ganaie, A. H., Ghasura, R. S., Mir, N. A., Bumla, N. A., Sankar, G., y Wani, S. A. (2013). Biochemical and Physiological Changes during Thermal Stress in Bovines: A Review. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 3(3), 423-430.
- Ganapathy, V. (2012). Chapter 59—Protein Digestion and Absorption. En L. R. Johnson, F. K. Ghishan, J. D. Kaunitz, J. L. Merchant, H. M. Said, y J. D. Wood (Eds.), *Physiology of the Gastrointestinal Tract (Fifth Edition)* (pp. 1595-1623). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382026-6.00059-2>
- Gasparino, E., Del Vesco, A. P., Khatlab, A. S., Zancanela, V., Grieser, D. O., y Silva, S. C. C. (2018). Effects of methionine hydroxy analogue supplementation on the expression of antioxidant-related genes of acute heat stress-exposed broilers. *Animal*, 12(5), 931-939. <https://doi.org/10.1017/S1751731117002439>
- Gassler, N. (2017). Paneth cells in intestinal physiology and pathophysiology. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 8(4), 150-160.
<https://doi.org/10.4291/wjgp.v8.i4.150>
- Gonsette, R. E. (2008). Neurodegeneration in multiple sclerosis: The role of oxidative stress and excitotoxicity. *Journal of the Neurological Sciences*, 274(1-2), 48-53.
<https://doi.org/10.1016/j.jns.2008.06.029>

- Hahn, G., Gaughan, J., Mader, T., y Eigenberg, R. (2009). Chapter 5: Thermal Indices and Their Applications for Livestock Environments. *Livestock Energetics and Thermal Environmental Management*. <https://doi.org/10.13031/2013.28298>
- Handa, N., Bhardwaj, R., Kaur, H., Poonam, Kapoor, D., Rattan, A., Kaur, S., Thukral, A. K., Kaur, S., Arora, S., y Kapoor, N. (2016). Chapter 7 - Selenium: An Antioxidative Protectant in Plants Under Stress. En P. Ahmad (Ed.), *Plant Metal Interaction* (pp. 179-207). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803158-2.00007-2>
- He, L., He, T., Farrar, S., Ji, L., Liu, T., y Ma, X. (2017). Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *44*(2), 532-553. <https://doi.org/10.1159/000485089>
- Helander, H. F., y Fändriks, L. (2014). Surface area of the digestive tract—Revisited. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, *49*(6), 681-689. <https://doi.org/10.3109/00365521.2014.898326>
- Horowitz, M., y Robinson, S. D. M. (2007). Heat shock proteins and the heat shock response during hyperthermia and its modulation by altered physiological conditions. En H. S. Sharma (Ed.), *Progress in Brain Research* (Vol. 162, pp. 433-446). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)62021-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)62021-9)
- Huynh, T. T. T., Aarnink, A. J. A., Verstegen, M. W. A., Gerrits, W. J. J., Heetkamp, M. J. W., Kemp, B., y Canh, T. T. (2005). Effects of increasing temperatures on physiological changes in pigs at different relative humidities. *Journal of Animal Science*, *83*(6), 1385-1396. <https://doi.org/10.2527/2005.8361385x>
- Ighodaro, O. M., y Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, *54*(4), 287-293. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>

- Jankowski, J., Ognik, K., Kubińska, M., Czech, A., Juśkiewicz, J., y Zduńczyk, Z. (2017). The effect of DL-, L-isomers and DL-hydroxy analog administered at 2 levels as dietary sources of methionine on the metabolic and antioxidant parameters and growth performance of turkeys. *Poultry Science*, 96(9), 3229-3238. <https://doi.org/10.3382/ps/pex099>
- Jansman, A., Kan, C., y Wiebenga, J. (2003). Comparison of the biological efficacy of DL-methionine and hydroxy4-methylthiobutanoic acid (HMB) in pigs and poultry. WUR. CVB – documentatierapport Nr. 29, The Netherlands
- Jobgen, W. S., Fried, S. K., Fu, W. J., Meininger, C. J., y Wu, G. (2006). Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(9), 571-588. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.12.001>
- Johansson, M. E. V., Sjövall, H., y Hansson, G. C. (2013). The gastrointestinal mucus system in health and disease. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 10(6), 352-361. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2013.35>
- Justin, P., y Amit, D. (2022). Physiology, Digestion. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544242/>
- Kaewtapee, C., Krutthai, N., Poosuwan, K., Poeikhampha, T., Koonawootrittriron, S., y Bunchasak, C. (2010). Effects of adding liquid DL-methionine hydroxy analogue-free acid to drinking water on growth performance and small intestinal morphology of nursery pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94(3), 395-404. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2009.00920.x>
- Kamei, Y., Hatazawa, Y., Uchitomi, R., Yoshimura, R., y Miura, S. (2020). Regulation of Skeletal Muscle Function by Amino Acids. *Nutrients*, 12(1), 261. <https://doi.org/10.3390/nu12010261>

- Kim, Y. S., y Ho, S. B. (2010). Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: Recent insights and progress. *Current Gastroenterology Reports*, 12(5), 319-330. <https://doi.org/10.1007/s11894-010-0131-2>
- Koban, H. G., y Koberstein, E. (2002, mayo 1). *Kinetics of hydrolysis of dimeric and trimeric methionine hydroxy analog free acid under physiological conditions of pH and temperature* (world). ACS Publications; American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/jf00122a052>
- Kong, S., Zhang, Y. H., y Zhang, W. (2018). Regulation of Intestinal Epithelial Cells Properties and Functions by Amino Acids. *BioMed Research International*, 2018, 2819154. <https://doi.org/10.1155/2018/2819154>
- Kregel, K. C. (2002). Heat shock proteins: Modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, 92(5), 2177-2186. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.01267.2001>
- Krehbiel, C. R., y Matthews, J. C. (2003). *Amino acids in animal nutrition* (J. P. F. D'Mello, Ed.; 2nd ed). CABI Pub.
- Lacetera, N., Bernabucci, U., Ronchi, B., y Nardone, A. (2003). Physiological and productive consequences of heat stress. The case of dairy ruminants. *EAAP Technical Series, No. 7*, Pág. 45-60.
- Lawson, C. Q., y Ivey, F. J. (1986). Hydrolysis of 2-Hydroxy-4-(Methylthio)Butanoic Acid Dimer in Two Model Systems. *Poultry Science*, 65(9), 1749-1753. <https://doi.org/10.3382/ps.0651749>
- Le Bellego, L., van Milgen, J., y Noblet, J. (2002). Effect of high temperature and low-protein diets on the performance of growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science*, 80(3), 691-701. <https://doi.org/10.2527/2002.803691x>

- Leon, L. R., DuBose, D. A., y Mason, C. W. (2005). Heat stress induces a biphasic thermoregulatory response in mice. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 288(1), R197-R204. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00046.2004>
- Levine, R. L., Moskovitz, J., y Stadtman, E. R. (2000). Oxidation of Methionine in Proteins: Roles in Antioxidant Defense and Cellular Regulation. *IUBMB Life*, 50(4-5), 301-307. <https://doi.org/10.1080/713803735>
- Levine, R. L., Mosoni, L., Berlett, B. S., y Stadtman, E. R. (1996). Methionine residues as endogenous antioxidants in proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(26), 15036-15040.
- Lewis, A. J. (Ed.). (2003). Methionine-cystine relationships in pig nutrition. En *Amino acids in animal nutrition* (Ed. JPF D'Mello, pp. 143-155). CABI Publishing.
- Lewis, A. J., y Southern, L. L. (2001). *Swine Nutrition* (2nd ed.). CRC Press.
- Liao, S. F., y Nyachoti, M. (2017). Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Animal Nutrition*, 3(4), 331-343. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.06.007>
- Liu, F., de Ruyter, E. M., Athorn, R. Z., Brewster, C. J., Henman, D. J., Morrison, R. S., Smits, R. J., Cottrell, J. J., y Dunshea, F. R. (2018). Effects of L-citrulline supplementation on heat stress physiology, lactation performance and subsequent reproductive performance of sows in summer. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103(1), 251-257. <https://doi.org/10.1111/jpn.13028>
- Liu, F., Yin, J., Du, M., Yan, P., Xu, J., Zhu, X., y Yu, J. (2009). Heat-stress-induced damage to porcine small intestinal epithelium associated with downregulation of epithelial growth factor signaling. *Journal of Animal Science*, 87(6), 1941-1949. <https://doi.org/10.2527/jas.2008-1624>

- Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lord-Fontaine, S., y Averill-Bates, D. A. (2002). Heat shock inactivates cellular antioxidant defenses against hydrogen peroxide: Protection by glucose. *Free Radical Biology & Medicine*, 32(8), 752-765. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)00769-4](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)00769-4)
- Lowe, F. (2014). Biomarkers of Oxidative Stress. En I. Laher (Ed.), *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants* (pp. 65-87). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30018-9_4
- Lu, S. C. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Molecular aspects of medicine*, 30(1-2), 42-59. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.005>
- Luo, S., y Levine, R. L. (2009). Methionine in proteins defends against oxidative stress. *The FASEB Journal*, 23(2), 464-472. <https://doi.org/10.1096/fj.08-118414>
- Luo, Y., Matejic, T., Ng, C.-K., Nunnally, B., Porter, T., Raso, S., Rouse, J., Shang, T., y Steckert, J. (2011). 8—Characterization and Analysis of Biopharmaceutical Proteins. En S. Ahuja y S. Scypinski (Eds.), *Separation Science and Technology* (Vol. 10, pp. 283-359). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375680-0.00008-5>
- Martínez, Y., Li, X., Liu, G., Bin, P., Yan, W., Más, D., Valdivié, M., Hu, C.-A. A., Ren, W., y Yin, Y. (2017). The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases. *Amino Acids*, 49(12), 2091-2098. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2494-2>
- Martín-Venegas, R., Geraert, P. A., y Ferrer, R. (2006). Conversion of the Methionine Hydroxy Analogue dl-2-Hydroxy-(4-Methylthio) Butanoic Acid to Sulfur-Containing

- Amino Acids in the Chicken Small Intestine. *Poultry Science*, 85(11), 1932-1938.
<https://doi.org/10.1093/ps/85.11.1932>
- Martín-Venegas, R., Soriano-García, J. F., Vinardell, M. P., Geraert, P. A., y Ferrer, R. (2006). Oligomers Are Not the Limiting Factor in the Absorption of DL-2-Hydroxy-4-(methylthio)butanoic Acid in the Chicken Small Intestine¹. *Poultry Science*, 85(1), 56-63. <https://doi.org/10.1093/ps/85.1.56>
- Mastrototaro, L., Sponder, G., Saremi, B., y Aschenbach, J. R. (2016). Gastrointestinal methionine shuttle: Priority handling of precious goods. *IUBMB Life*, 68(12), 924-934. <https://doi.org/10.1002/iub.1571>
- Mato, J. M., Corrales, F. J., Lu, S. C., y Avila, M. A. (2002). S-Adenosylmethionine: A control switch that regulates liver function. *The FASEB Journal*, 16(1), 15-26. <https://doi.org/10.1096/fj.01-0401rev>
- Mayorga, E. J., Renaudeau, D., Ramirez, B. C., Ross, J. W., y Baumgard, L. H. (2018). Heat stress adaptations in pigs. *Animal Frontiers: The Review Magazine of Animal Agriculture*, 9(1), 54-61. <https://doi.org/10.1093/af/vfy035>
- McDonald, P., Edwards, R., Greenhalgh, J., Morgan, C., Sinclair, L., y Wilkinson, R. (2010). *Animal Nutrition* (Seventh Edition). Pearson.
- Métayer, S., Seiliez, I., Collin, A., Duchêne, S., Mercier, Y., Geraert, P.-A., y Tesseraud, S. (2008). Mechanisms through which sulfur amino acids control protein metabolism and oxidative status. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 19(4), 207-215. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2007.05.006>
- Micanor, D. (2019). *Adición de metionina e hidroxianálogo de metionina a dieta para cerdos en estrés por calor: Comportamiento productivo y características del epitelio de intestino delgado* [Tesis de Maestría]. Universidad Autónoma de Baja California.

- Moeser, A. J., Borst, L. B., Overman, B. L., y Pittman, J. S. (2012). Defects in small intestinal epithelial barrier function and morphology associated with peri-weaning failure to thrive syndrome (PFTS) in swine. *Research in Veterinary Science*, 93(2), 975-982. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.01.003>
- Montagne, L., Pluske, J. R., y Hampson, D. J. (2003). A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health in young non-ruminant animals. *Animal Feed Science and Technology*, 108(1), 95-117. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00163-9](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00163-9)
- Montilla, S. I. R., Johnson, T. P., Pearce, S. C., Gardan-Salmon, D., Gabler, N. K., Ross, J. W., Rhoads, R. P., Baumgard, L. H., Lonergan, S. M., y Selsby, J. T. (2014). Heat stress causes oxidative stress but not inflammatory signaling in porcine skeletal muscle. *Temperature (Austin, Tex.)*, 1(1), 42-50. <https://doi.org/10.4161/temp.28844>
- Morales, A., Chávez, M., Vásquez, N., Camacho, L., Avelar, E., Arce, N., Htoo, J. K., y Cervantes, M. (2019). Extra dietary protein-bound or free amino acids differently affect the serum concentrations of free amino acids in heat-stressed pigs. *Journal of Animal Science*, 97(4), 1734-1744. <https://doi.org/10.1093/jas/skz037>
- Morales, A., Chávez, M., Vásquez, N., Htoo, J. K., Buenabad, L., Espinoza, S., y Cervantes, M. (2018). Increased dietary protein or free amino acids supply for heat stress pigs: Effect on performance and carcass traits. *Journal of Animal Science*, 96(4), 1419-1429. <https://doi.org/10.1093/jas/sky044>
- Morales, A., Gómez, T., Villalobos, Y. D., Bernal, H., Htoo, J. K., González-Vega, J. C., Espinoza, S., Yáñez, J., y Cervantes, M. (2020). Dietary protein-bound or free amino acids differently affect intestinal morphology, gene expression of amino acid

- transporters, and serum amino acids of pigs exposed to heat stress. *Journal of Animal Science*, 98(3). <https://doi.org/10.1093/jas/skaa056>
- Morales, Grageola, F., García, H., Arce, N., Araiza, B., Yáñez, J., y Cervantes, M. (2014). Performance, serum amino acid concentrations and expression of selected genes in pair-fed growing pigs exposed to high ambient temperatures. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 98(5), 928-935. <https://doi.org/10.1111/jpn.12161>
- Moskovitz, J., Bar-Noy, S., Williams, W. M., Requena, J., Berlett, B. S., y Stadtman, E. R. (2001). Methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a regulator of antioxidant defense and lifespan in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), 12920-12925. <https://doi.org/10.1073/pnas.231472998>
- Németh, K., Mézes, M., Gaál, T., Bartos, A., Balogh, K., y Husvéth, F. (2004). Effect of supplementation with methionine and different fat sources on the glutathione redox system of growing chickens. *Acta Veterinaria Hungarica*, 52(3), 369-378. <https://doi.org/10.1556/AVet.52.2004.3.12>
- Nisar, N. A., Sultana, M., Waiz, H. A., Para, P. A., y Dar, S. A. (2013). Oxidative Stress—Threat to Animal Health and Production -. *International Journal of Livestock Research*, 3(2), 76-83.
- NRC. (2012). *Nutrient Requirements of Swine: Eleventh Revised Edition: Vol. Eleventh Revised Edition*. National Academies Press.
- Ognik, K., y Krauze, M. (2016). The potential for using enzymatic assays to assess the health of turkeys. *World's Poultry Science Journal*, 72(3), 535-550. <https://doi.org/10.1017/S0043933916000246>
- Ooue, A., Ichinose-Kuwahara, T., Shamsuddin, A. K. M., Inoue, Y., Nishiyasu, T., Koga, S., y Kondo, N. (2007). Changes in blood flow in a conduit artery and superficial

- vein of the upper arm during passive heating in humans. *European Journal of Applied Physiology*, 101(1), 97-103. <https://doi.org/10.1007/s00421-007-0478-8>
- Orlando, G. F., Wolf, G., y Engelmann, M. (2008). Role of neuronal nitric oxide synthase in the regulation of the neuroendocrine stress response in rodents: Insights from mutant mice. *Amino Acids*, 35(1), 17-27. <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0630-0>
- Ortega, A. D. S. V., y Szabó, C. (2021). Adverse Effects of Heat Stress on the Intestinal Integrity and Function of Pigs and the Mitigation Capacity of Dietary Antioxidants: A Review. *Animals*, 11(4), 1135. <https://doi.org/10.3390/ani11041135>
- Ouyang, Y., Wu, Q., Li, J., Sun, S., y Sun, S. (2020). S-adenosylmethionine: A metabolite critical to the regulation of autophagy. *Cell Proliferation*, 53(11), e12891. <https://doi.org/10.1111/cpr.12891>
- Palacín, M., Estévez, R., Bertran, J., y Zorzano, A. (1998). Molecular biology of mammalian plasma membrane amino acid transporters. *Physiological Reviews*, 78(4), 969-1054. <https://doi.org/10.1152/physrev.1998.78.4.969>
- Palacín, M., Fernaández, E., Chillarón, J., y Zorzano, A. (2001). The amino acid transport system bo,+ and cystinuria. *Molecular Membrane Biology*, 18(1), 21-26. <https://doi.org/10.1080/09687680010028771>
- Patience, J. F., Thraker, P. A., y de Lange, C. F. M. (1995). *Swine Nutrition Guide* (2da ed.). <https://epdf.pub/swine-nutrition-guide-2nd-edition.html>
- Patience, J. F., Umboh, J. F., Chaplin, R. K., y Nyachoti, C. M. (2005). Nutritional and physiological responses of growing pigs exposed to a diurnal pattern of heat stress. *Livestock Production Science*, 96(2), 205-214. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2005.01.012>

- Pearce, S. C., Gabler, N. K., Ross, J. W., Escobar, J., Patience, J. F., Rhoads, R. P., y Baumgard, L. H. (2013). The effects of heat stress and plane of nutrition on metabolism in growing pigs. *Journal of Animal Science*, *91*(5), 2108-2118. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5738>
- Pearce, S. C., Mani, V., Boddicker, R. L., Johnson, J. S., Weber, T. E., Ross, J. W., Baumgard, L. H., y Gabler, N. K. (2012). Heat stress reduces barrier function and alters intestinal metabolism in growing pigs. *Journal of Animal Science*, *90 Suppl 4*, 257-259. <https://doi.org/10.2527/jas.52339>
- Pearce, S. C., Sanz-Fernandez, M. V., Hollis, J. H., Baumgard, L. H., y Gabler, N. K. (2014). Short-term exposure to heat stress attenuates appetite and intestinal integrity in growing pigs. *Journal of Animal Science*, *92*(12), 5444-5454. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8407>
- Pérez, B. (2021). *Adición de metionina a dietas para cerdos en estrés por calor: Efecto en la actividad antioxidante e integridad del epitelio intestinal* [Tesis de Maestría]. Universidad Autónoma de Baja California.
- Pisoschi, A. M., y Pop, A. (2015). The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *97*, 55-74. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>
- Pudlarz, A. M., Czechowska, E., S Karbownik, M., Ranoszek-Soliwoda, K., Tomaszewska, E., Celichowski, G., Grobelny, J., Chabielska, E., Gromotowicz-Popławska, A., y Szemraj, J. (2020). The effect of immobilized antioxidant enzymes on the oxidative stress in UV-irradiated rat skin. *Nanomedicine (London, England)*, *15*(1), 23-39. <https://doi.org/10.2217/nnm-2019-0166>
- Qin, L., Ji, W., Wang, J., Li, B., Hu, J., y Wu, X. (2019). Effects of dietary supplementation with yeast glycoprotein on growth performance, intestinal mucosal morphology,

- immune response and colonic microbiota in weaned piglets. *Food & Function*, 10(5), 2359-2371. <https://doi.org/10.1039/C8FO02327A>
- Rasch, I., Görs, S., Tuchscherer, A., Viergutz, T., Metges, C. C., y Kuhla, B. (2020). Substitution of Dietary Sulfur Amino Acids by dl-2-Hydroxy-4-Methylthiobutyric Acid Reduces Fractional Glutathione Synthesis in Weaned Piglets. *The Journal of Nutrition*, 150(4), 722-729. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz272>
- Reddy, V. Y., Desorchers, P. E., Pizzo, S. V., Gonias, S. L., Sahakian, J. A., Levine, R. L., y Weiss, S. J. (1994). Oxidative dissociation of human alpha 2-macroglobulin tetramers into dysfunctional dimers. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(6), 4683-4691.
- Reimer, R. J., Chaudhry, F. A., Gray, A. T., y Edwards, R. H. (2000). Amino acid transport system A resembles system N in sequence but differs in mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(14), 7715-7720. <https://doi.org/10.1073/pnas.140152797>
- Renaudeau, C. (2016). *Estrés por calor en porcino*. https://www.3tres3.com/articulos/estres-por-calor-en-porcino_36427/
- Renaudeau, D., Kerdoncuff, M., Anaïs, C., y Gourdine, J. L. (2008). Effect of temperature level on thermal acclimation in Large White growing pigs. *animal*, 2(11), 1619-1626. <https://doi.org/10.1017/S1751731108002814>
- Rezaei, R., Wang, W., Wu, Z., Dai, Z., Wang, J., y Wu, G. (2013). Biochemical and physiological bases for utilization of dietary amino acids by young Pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4(1), 7. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-7>
- Rezzi, S., Ramadan, Z., Fay, L. B., y Kochhar, S. (2007). Nutritional Metabonomics: Applications and Perspectives. *Journal of Proteome Research*, 6(2), 513-525. <https://doi.org/10.1021/pr060522z>

- Riedijk, M. A., Stoll, B., Chacko, S., Schierbeek, H., Sunehag, A. L., Goudoever, J. B. van, y Burrin, D. G. (2007). Methionine transmethylation and transsulfuration in the piglet gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(9), 3408-3413. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607965104>
- Riener, C. K., Kada, G., y Gruber, H. J. (2002). Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373(4-5), 266-276. <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1347-2>
- Rivier, C., y Rivest, S. (1991). Effect of Stress on the Activity of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis: Peripheral and Central Mechanisms. *Biology of Reproduction*, 45(4), 523-532. <https://doi.org/10.1095/biolreprod45.4.523>
- Romano, A., Serviddio, G., Calcagnini, S., Villani, R., Giudetti, A. M., Cassano, T., y Gaetani, S. (2017). Linking lipid peroxidation and neuropsychiatric disorders: Focus on 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radical Biology and Medicine*, 111, 281-293. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.046>
- Roth, F. X., y Kirchgessner, M. (1986). Relative Biological Efficiency of Methionine Hydroxy Analogue—Free Acid for Growing Pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 55(1-5), 93-100. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.1986.tb00705.x>
- Sambrook, J., y Russel, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3°). Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schwartz, P., y Randall, D. (2003). *An Abrupt Climate Change Scenario and its Implications for United States National Security*. CALIFORNIA INST OF TECH PASADENA JET PROPULSION LAB. <https://apps.dtic.mil/sti/citations/ADA469325>

- Shoveller, A. K., Moehn, S., Rademacher, M., Htoo, J. K., y Ball, R. O. (2010). Methionine-hydroxy analogue was found to be significantly less bioavailable compared to dl-methionine for protein deposition in growing pigs. *Animal*, *4*(1), 61-66. <https://doi.org/10.1017/S1751731109990917>
- Slimen, Najar, T., Ghram, A., y Abdrrabba, M. (2016). Heat stress effects on livestock: Molecular, cellular and metabolic aspects, a review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *100*(3), 401-412. <https://doi.org/10.1111/jpn.12379>
- Slimen, Najar, T., Ghram, A., Dabbebi, H., Ben Mrad, M., y Abdrabbah, M. (2014). Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *International Journal of Hyperthermia: The Official Journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group*, *30*(7), 513-523. <https://doi.org/10.3109/02656736.2014.971446>
- Soares, M. S. P., Oliveira, P. S., Debom, G. N., da Silveira Mattos, B., Polachini, C. R., Baldissarelli, J., Morsch, V. M., Schetinger, M. R. C., Tavares, R. G., Stefanello, F. M., y Spanevello, R. M. (2017). Chronic administration of methionine and/or methionine sulfoxide alters oxidative stress parameters and ALA-D activity in liver and kidney of young rats. *Amino Acids*, *49*(1), 129-138. <https://doi.org/10.1007/s00726-016-2340-y>
- Soraci, A. L., Amanto, F., Harkes, R., Pérez, D. S., Martínez, G., Diéguez, S. N., y Tapia, M. O. (2010). Uso estratégico de aditivos: Impacto sobre el equilibrio y salud gastrointestinal del lechón. *Analecta Veterinaria*, *30*, n.º 1. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/11241>
- St-Pierre, N. R., Cobanov, B., y Schnitkey, G. (2003). Economic Losses from Heat Stress by US Livestock Industries¹. *Journal of Dairy Science*, *86*, E52-E77. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)74040-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)74040-5)

- Su, W., Zhang, H., Ying, Z., Li, Y., Zhou, L., Wang, F., Zhang, L., y Wang, T. (2018). Effects of dietary L-methionine supplementation on intestinal integrity and oxidative status in intrauterine growth-retarded weanling piglets. *European Journal of Nutrition*, 57(8), 2735-2745. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1539-3>
- Swennen, Q., Geraert, P.-A., Mercier, Y., Everaert, N., Stinckens, A., Willemsen, H., Li, Y., Decuypere, E., y Buyse, J. (2011). Effects of dietary protein content and 2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid or dl-methionine supplementation on performance and oxidative status of broiler chickens. *British Journal of Nutrition*, 106(12), 1845-1854. <https://doi.org/10.1017/S0007114511002558>
- Tesseraud, S., Coustard, S. M., Collin, A., y Seiliez, I. (2008). Role of sulfur amino acids in controlling nutrient metabolism and cell functions: Implications for nutrition. *British Journal of Nutrition*, 101(8), 1132-1139. <https://doi.org/10.1017/S0007114508159025>
- Trevisan, M., Browne, R., Ram, M., Muti, P., Freudenheim, J., Carosella, A. M., y Armstrong, D. (2001). Correlates of markers of oxidative status in the general population. *American Journal of Epidemiology*, 154(4), 348-356. <https://doi.org/10.1093/aje/154.4.348>
- Upadhaya, S. D., Jiao, Y., Kim, Y. M., Lee, K. Y., y Kim, I. H. (2020). Coated sodium butyrate supplementation to a reduced nutrient diet enhanced the performance and positively impacted villus height and faecal and digesta bacterial composition in weaner pigs. *Animal Feed Science and Technology*, 265, 114534. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114534>
- Waltz, X., Baillot, M., Connes, P., Bocage, B., y Renaudeau, D. (2014). Effects of hydration level and heat stress on thermoregulatory responses, hematological and

- blood rheological properties in growing pigs. *PloS One*, 9(7), e102537. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102537>
- Wang, M. Q., Huyen, L. T. T., Lee, J. W., Ramos, S. H., Htoo, J. K., Kinh, L. V., y Lindemann, M. D. (2020). Bioavailability of the calcium salt of dl-methionine hydroxy analog compared with dl-methionine for nitrogen retention and the preference of nursery pigs for diets based on the 2 forms of methionine. *Journal of Animal Science*, 98(12), skaa349. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa349>
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., y Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *The Journal of Cell Biology*, 217(6), 1915-1928. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708007>
- Wang, Y., Yin, X., Yin, D., Lei, Z., Mahmood, T., y Yuan, J. (2019). Antioxidant response and bioavailability of methionine hydroxy analog relative to DL-methionine in broiler chickens. *Animal Nutrition*, 5(3), 241-247. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2019.06.007>
- Willemsen, H., Swennen, Q., Everaert, N., Geraert, P.-A., Mercier, Y., Stinckens, A., Decuyper, E., y Buyse, J. (2011). Effects of dietary supplementation of methionine and its hydroxy analog dl-2-hydroxy-4-methylthiobutanoic acid on growth performance, plasma hormone levels, and the redox status of broiler chickens exposed to high temperatures. *Poultry Science*, 90(10), 2311-2320. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01353>
- Williams, C. A., Kronfeldt, D. S., Hess, T. M., Saker, K. E., Waldron, J. N., Crandell, K. M., Hoffman, R. M., y Harris, P. A. (2004). Antioxidant supplementation and subsequent oxidative stress of horses during an 80-km endurance race. *Journal of Animal Science*, 82(2), 588-594. <https://doi.org/10.2527/2004.822588x>

- Wu, B., Cui, H., Peng, X., Fang, J., Cui, W., y Liu, X. (2012). Effect of Methionine Deficiency on the Thymus and the Subsets and Proliferation of Peripheral Blood T-Cell, and Serum IL-2 Contents in Broilers. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(6), 1009-1019. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(12\)60093-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(12)60093-8)
- Wu, G. (2009). Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids*, 37(1), 1-17. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0>
- Wu, G. (2010). Functional Amino Acids in Growth, Reproduction, and Health. *Advances in Nutrition*, 1(1), 31-37. <https://doi.org/10.3945/an.110.1008>
- Wu, G. (2013). *Amino Acids: Biochemistry and Nutrition* (2da ed.). CRC Press.
- Wu, G., Knabe, D. A., y Kim, S. W. (2004). Arginine Nutrition in Neonatal Pigs. *The Journal of Nutrition*, 134(10), 2783S-2790S. <https://doi.org/10.1093/jn/134.10.2783S>
- Wu, G., Wu, Z., Dai, Z., Yang, Y., Wang, W., Liu, C., Wang, B., Wang, J., y Yin, Y. (2013). Dietary requirements of «nutritionally non-essential amino acids» by animals and humans. *Amino Acids*, 44(4), 1107-1113. <https://doi.org/10.1007/s00726-012-1444-2>
- Wu, P., Tang, L., Jiang, W., Hu, K., Liu, Y., Jiang, J., Kuang, S., Tang, L., Tang, W., Zhang, Y., Zhou, X., y Feng, L. (2017). The relationship between dietary methionine and growth, digestion, absorption, and antioxidant status in intestinal and hepatopancreatic tissues of sub-adult grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8, 63. <https://doi.org/10.1186/s40104-017-0194-0>
- Xin, H., y Harmon, J. (1998). *Livestock Industry Facilities and Environment: Heat Stress Indices for Livestock*.
- Xiong, Y., Yin, Q., Li, J., y He, S. (2020). Oxidative Stress and Endoplasmic Reticulum Stress Are Involved in the Protective Effect of Alpha Lipoic Acid Against Heat

- Damage in Chicken Testes. *Animals: an Open Access Journal from MDPI*, 10(3), 384. <https://doi.org/10.3390/ani10030384>
- Yen, J.-T. (2000). Anatomy of the Digestive System and Nutritional Physiology. En A. Lewis y L. Lee Southern (Eds.), *Swine Nutrition, Second Edition*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420041842.ch3>
- Yin, J., Ren, W., Yang, G., Duan, J., Huang, X., Fang, R., Li, C., Li, T., Yin, Y., Hou, Y., Kim, S. W., y Wu, G. (2016a). L-Cysteine metabolism and its nutritional implications. *Molecular Nutrition & Food Research*, 60(1), 134-146. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500031>
- Yin, J., Li, T., y Yin, Y. (2016b). Methionine And Antioxidant Potential. *Journal of Antioxidant Activity*, 1(2), 17-22. <https://doi.org/10.14302/ISSN.2471-2140.JAA-16-1378>
- Young, I. S., y Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*, 54(3), 176-186. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.3.176>
- Yu, J., Yin, P., Liu, F., Cheng, G., Guo, K., Lu, A., Zhu, X., Luan, W., y Xu, J. (2010). Effect of heat stress on the porcine small intestine: A morphological and gene expression study. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 156(1), 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.01.008>
- Yu, M., Chen, H., Liu, P., Yang, M., Zou, L., y Xiao, D. (2020). Antioxidant Function and Metabolomics Study in Mice after Dietary Supplementation with Methionine. *BioMed Research International*, 2020, e9494528. <https://doi.org/10.1155/2020/9494528>
- Zduńczyk, Z., Jankowski, J., Kubińska, M., Ognik, K., Czech, A., y Juśkiewicz, J. (2017). The effect of different dietary levels of dl-methionine and dl-methionine hydroxy

- analogue on the antioxidant and immune status of young turkeys. *Archives of Animal Nutrition*, 71(5), 347-361. <https://doi.org/10.1080/1745039X.2017.1352328>
- Zhang, H., Li, Y., Chen, Y., Ying, Z., Su, W., Zhang, T., Dong, Y., Htoo, J. K., Zhang, L., y Wang, T. (2019). Effects of dietary methionine supplementation on growth performance, intestinal morphology, antioxidant capacity and immune function in intra-uterine growth-retarded suckling piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103(3), 868-881. <https://doi.org/10.1111/jpn.13084>
- Zhang, S., Saremi, B., Gilbert, E. R., y Wong, E. A. (2017). Physiological and biochemical aspects of methionine isomers and a methionine analogue in broilers. *Poultry Science*, 96(2), 425-439. <https://doi.org/10.3382/ps/pew253>
- Zhao, L., McMillan, R. P., Xie, G., Giridhar, S. G. L. W., Baumgard, L. H., El-Kadi, S., Selsby, J., Ross, J., Gabler, N., Hulver, M. W., y Rhoads, R. P. (2018). Heat stress decreases metabolic flexibility in skeletal muscle of growing pigs. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 315(6), R1096-R1106. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00404.2017>