

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS



**ADICIÓN DE METIONINA E HIDROXIANÁLOGO DE METIONINA A
DIETAS PARA CERDOS EN ESTRÉS POR CALOR:
COMPORTAMIENTO PRODUCTIVO Y CARACTERÍSTICAS DEL
EPITELIO DE INTESTINO DELGADO**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

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

PRESENTA:

DAVIDSON MICANOR

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ADRIANA MORALES TREJO

La presente tesis titulada "Adición de metionina e hidroxianálogo de metionina a dietas para cerdos en estrés por calor: comportamiento productivo y características del epitelio de intestino delgado" fue realizada por C. Davidson Micanor, y 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

PRESIDENTE /



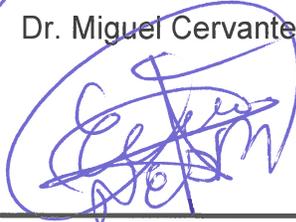
DIRECTORA DE TESIS Dra. Adriana Morales Trejo

SINODAL



Dr. Miguel Cervantes Ramírez

SINODAL



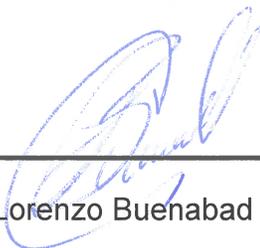
Dr. Ernesto Avelar Lozano

SINODAL



Dra. Reyna Lucero Camacho Morales

SINODAL



Dr. Lorenzo Buenabad Carrasco

POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, que me permites sonreír ante todos mis logros que son resultado de su ayuda. Este trabajo de tesis ha sido una gran bendición en todo sentido y te lo agradezco padre y no cesan mis ganas de decir que es gracias a ti que esta meta está cumplida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por el apoyo económico brindado para la realización de mis estudios de posgrado.

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) y al Instituto de Ciencias Agrícolas (ICA) por apoyarme para realizar mis estudios de maestría.

A la **Dra. Adriana Morales Trejo**, por su dirección, asesoría, confianza observaciones, sugerencias y facilidades prestadas del presente trabajo de investigación, durante mi estancia en el ICA-UABC.

Al **Dr. Miguel Cervantes Ramírez** por su valiosa aportación para realizar este trabajo.

A los otros integrantes del Cuerpo Académico de Nutrición Animal (**CANA**).

A todos los profesores y los trabajadores del Instituto de Ciencias Agrícolas por haber permitido mi estancia favorable y satisfactoria.

DEDICATORIA

A **DIOS**, por el éxito y la satisfacción de este trabajo de tesis, quien me regala la sabiduría e inteligencia para enfrentar los retos y los obstáculos que se me presentan constantemente para alcanzar el éxito.

A la memoria de mis padres Dieusonne Micanor y Mimose Jean Louis, quienes me cuidan desde mi infancia y que me ayudan económicamente, mi sincero agradecimiento por haberme depositado su confianza en mí e impartido sus sabios consejos.

A mis hermanas, Modena Micanor, Shelove Micanor, Jesula Micanor, Anneflor Micanor, Minerve Micanor por compartir momentos significativos conmigo y por siempre estar dispuesto a escucharme y ayudarme en cualquier momento.

A mi querida esposa Sarah Cathrine Vincent mi segunda madre por ser un punto de apoyo incondicional en los momentos más difíciles de mi vida, por haber confiado en mí y apoyarme para cumplir esta meta. Gracias amor.

A mi hijo, Kevin Mateo Micanor Vincent, quien adoro con todo mi corazón porque él es una de las razones de mis sacrificios de hoy en día.

A todos mis amigos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

COMITÉ PARTICULAR.....	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
DEDICATORIA.....	4
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	5
ÍNDICE DE CUADROS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	13
I. INTRODUCCION.....	14
II. MARCO TEORICO.....	16
2.1. Efecto del estrés por calor y la producción porcina en México.....	16
2.2. Temperatura de confort y estrés por calor.....	17
2.3. Efectos del estrés por calor en el consumo voluntario de alimento.....	18
2.4. Efectos del estrés por calor en las constantes fisiológicas de los cerdos.....	18
2.5. Efectos del estrés por calor a nivel intestinal.....	19
2.6. Histología del intestino delgado.....	20
2.6.1. Capa mucosa.....	21
2.6.2. Capa submucosa.....	21
2.6.3. Capa muscular.....	22
2.6.4. Capa serosa.....	23

2.7. Efectos del estrés por calor en la morfología intestinal.....	24
2.8. Estrés oxidativo.....	24
2.9. Aspectos generales de los aminoácidos.....	25
2.10. Metionina como aminoácidos funcional y sus funciones específicos.....	27
III. JUSTIFICACIÓN.....	30
IV. HIPÓTESIS.....	31
V. OBJETIVOS.....	32
5.1. Objetivo general.....	32
5.1.1. Objetivos específicos.....	32
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
6.1. Localización.....	33
6.2. Selección de animales.....	33
6.3. Dietas e ingredientes.....	33
6.4. Procedimientos experimentales.....	35
6.5. Sacrificio y recolección de muestras intestinales.....	36
6.6. Preparación de muestras para observación histológicas del epitelio intestinal.....	36
6.7. Análisis estadístico.....	38
VII. RESULTADOS.....	39
7.1. Variables ambientales.....	39
7.2. Variables fisiológicas.....	40
7.3. Comportamiento productivo.....	42
7.4. Histología intestinal de los cerdos.....	43
VIII. DISCUSIÓN.....	47

IX. CONCLUSIÓN.....52

X. LITERATURA CITADA.....53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de los aminoácidos esenciales y no esenciales.....	27
Cuadro 2. Composición de las dietas experimentales (%).....	34
Cuadro 3. Variables de comportamiento productivo ganancia diaria de peso (GDP), consumo diario de alimento (CDA) y eficiencia alimenticia de los cerdos expuestos a EC y alimentados con las dietas testigo, DL-Met y MHA-FA.....	42
Cuadro 4. Características histología del epitelio de intestino delgado de los cerdos en crecimiento en EC alimentados con las dietas testigo, DL-Met o MHA-FA.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Histología del intestino delgado de cerdo: Capa mucosa, capa submucosa, capa muscular y capa serosa.....	23
Figura 2. Sitios histológicos y localización del intestino delgado empleado para análisis morfométricos.....	37
Figura 3. Temperatura ambiente ($^{\circ}$ C) y humedad relativa (%) en la sala.....	39
Figura 4. Índice de temperatura y humedad (ITH).....	40
Figura 5. Temperatura intestinal de los cerdos alimentados con la dieta testigo durante cuatros días durante el período experimental.....	41
Figura 6. Frecuencia respiratoria de los cerdos.....	41
Figura 7. Características histológicas de vellosidades intestinales en cada una de las secciones de intestino delgado de cerdos en estrés por calor, alimentados con la dieta Testigo, DL-Met, o MHA-FA.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

AA.- Aminoácidos

b^{0,+}. - Transportador de AA catiónicos y neutros independiente de sodio

CAT-1.- Transportador de aminoácidos catiónicos

CDA.- Consumo de alimento

COOH.- Grupo carboxilo

CVA.- Consumo voluntario de alimento

E: A.- Eficiencia alimenticia

EC.- Estrés por calor

FR.- Frecuencia respiratorio

GDP.- Ganancia diaria de peso

GLUT 4.- Transportador de glucosa tipo 4

HSP-90.- Proteína de choque térmico

HR.- Humedad relativa

ITH.- Índice de temperatura y humedad

Lis. - Lisina

Met. - Metionina

MHA-FA: Methionine hydroxy analog-free acid

NH₂. - Grupo amino

SAH.- S-adenosilhomocisteína

SAM.- S-adenosilmetionina

SGLT1.- Cotransportador de glucosa y sodio

TA.- Temperatura ambiente

TC.- Temperatura corporal

Thr.- Threonina

TI.- Temperatura intestinal

RESUMEN

La temperatura ambiental (TA) elevada provoca estrés por calor (EC) en los animales. A consecuencia del EC se observan cambios en la digestión y absorción de nutrientes, y daño al epitelio del intestino delgado. Metionina podría mejorar en las características y función del epitelio intestinal de cerdos en EC. Se evaluó el efecto de suplementar con DL-metionina e hidroxianálogo de metionina (MHA-FA) las dietas para cerdos en EC sobre su comportamiento productivo, constantes fisiológicas e histología del epitelio intestinal. El experimento de 21d se realizó en verano en Mexicali. Se utilizaron 30 cerdos, distribuidos en 3 tratamientos; T1: Dieta testigo; T2, Dieta testigo adicionada con 0.20% de DL-Metionina; T3, Dieta testigo adicionada con 0.40% MHA-FA. El alimento y agua se ofrecieron *ad libitum*. Se midió la temperatura intestinal (TI) y frecuencia respiratoria (FR) de los cerdos. Al final del experimento se analizó la histología de epitelio intestinal. La TA y humedad relativa fluctuaron de 28-35 °C y 34-82%, respectivamente. La TI de los cerdos fluctuó de 39.7-40.8 °C y su FR de 33-95 pulsos/min. La ganancia de peso se incrementó con la adición de MHA-FA ($P=0.001$) y mostró una tendencia con DL-metionina ($P=0.090$); no se modificó el consumo de alimento; pero mejoró la eficiencia de los cerdos con DL-metionina y MHA-FA ($P<0.05$). DL-metionina y MHA-FA incrementaron la altura de vellosidades (AV) y la profundidad de criptas (PC) de los cerdos ($P\leq 0.05$), y la relación AV: PC no fueron afectada ($P>0.10$). Suplementar con DL-metionina y MHA-FA mejora el comportamiento productivo de cerdos en EC, así como la integridad de su epitelio de intestino delgado.

Palabras clave: cerdos, estrés por calor, hidroxianálogo de metionina, aminoácidos

ABSTRACT

High ambient temperature (AT) causes heat stress (HS) in animals. As a result, HS is associated to damage in intestinal epithelia affecting digestion, absorption and nutrients availability. Methionine could improve the characteristics and function of the intestinal epithelium of pigs in HS. The effect of feeding pigs with diets supplemented with DL-methionine and hydroxy analogue methionine (MHA-FA) on productive performance, physiological constants and histology of the intestinal epithelium was evaluated. A 21 d experiment was conducted during summer in Mexicali. 30 pigs were distributed into 3 treatments; T1: control diet; T2, control diet added with 0.20% DL-Methionine; T3, control diet added with 0.40% MHA-FA. Food and water were offered *ad libitum*. Intestinal temperature (IT) and respiratory rate (RR) of pigs were recorded. At the end of the experiment pigs were slaughtered and samples small intestine were collected for histological analysis. The AT and relative humidity fluctuated from 28-35 °C and 34-82% respectively. The IT of the pigs fluctuated from 39.7-40.8 °C and RR from 33-95 breaths/min. Average daily weight gain increased with the addition of MHA-FA ($P=0.001$) and trended to increase with DL-methionine ($P=0.090$); feed intake was not modified; but food efficiency was improved in pigs supplemented with DL-methionine and MHA-FA ($P<0.05$). DL-methionine and MHA-FA increased villus height (VH) and crypt depth (CD; $P\leq 0.05$), but the VH:CD ratio was not affected ($P>0.10$). Supplementing diets with DL-methionine and MHA-FA improves productive performance of HS pigs, as well as integrity of small intestine epithelium.

Keywords: Pigs, heat stress, methionine hydroxy analog, aminoacids

I. INTRODUCCIÓN

La producción porcina se realiza principalmente en regiones donde la temperatura ambiente (TA) durante el verano es superior a la temperatura de confort de los animales (18 a 24 °C), esta condición causa un desequilibrio entre la producción de calor metabólico dentro del organismo del animal y su disipación hacia el entorno, generando estrés por calor (EC); (Das *et al.*, 2016). Dependiendo de su intensidad, el EC provoca un incremento en la frecuencia cardíaca y la tasa respiratoria de los animales, además de afectar negativamente su salud y producción (Hanh *et al.*, 1999). El primer signo de EC en la producción porcina es la reducción en el consumo de alimento, lo que se traduce en una menor disponibilidad de nutrientes para un adecuado desarrollo y producción (Le Bellego *et al.*, 2002). En estas condiciones se reduce también el consumo de aminoácidos (AA), lo que se traduce en una menor disponibilidad de éstos para la síntesis de proteína corporal. Para compensar este problema se pueden formular dietas con mayor concentración de nutrientes (Das *et al.*, 2016). La adición de AA libres para cubrir las necesidades de los cerdos pudiera reducir el impacto del EC y mantener una producción eficiente (Cervantes *et al.*, 2016). Adicionalmente, se ha observado que el EC provoca alteraciones en el epitelio intestinal, principalmente relacionadas con una reducción en la altura de vellosidades y profundidad de criptas respectivamente (Yu *et al.*, 2010; Cui y Gu, 2015). Estos cambios influyen negativamente sobre la digestión y absorción de nutrientes (Liu *et al.*, 2009).

Por otra parte, el EC también se caracteriza por una acumulación de radicales libres a nivel celular, lo que puede provocar daño a membranas y muerte celular, siendo el epitelio intestinal especialmente sensible a ello (Venereo-Gutiérrez, 2002).

Considerando que metionina es un AA esencial, con funciones antioxidantes (Reddy *et al.*, 1994; Luo y Levine, 2009), la suplementación de metionina a cerdos en crecimiento podría disminuir el daño a nivel celular que causa el EC, y contribuir a la protección de la integridad y funcionalidad de la mucosa intestinal en beneficio de la salud del animal

Por tal razón se evaluó el efecto de la adición de metionina sobre el comportamiento productivo, temperatura corporal y frecuencia respiratoria y características histológicas del epitelio de intestino delgado en cerdos en crecimiento en condiciones de EC

II. MARCO TEORICO

2.1 El estrés por calor y la producción porcina en México

La producción porcina en México ocupa el tercer lugar en importancia por su aportación a la producción total de cárnicos, y equivale a 1,400 millones toneladas de carne de cerdo (SAGARPA, 2017). En México, durante la última década, la producción porcina ha presentado un continuo crecimiento y la perspectiva de mantener esta tendencia en los próximos años es favorable, aunque hay ciertos factores como medidas sanitarias, y factores ambientales que debe estar bajo control para una producción más eficiente.

Debido a que en México la mayor producción de cerdos se lleva a cabo en zonas donde durante la época de verano la temperatura ambiental se incrementa notablemente lo cual genera estrés por calor (EC) en los animales (Bobadilla-Soto *et al.*, 2010). La industria porcina global es afectada severamente por el EC; en Estados Unidos se pierden más de \$ 300 millones de dólares anuales por ese problema (St-Pierre *et al.*, 2003), por lo que las pérdidas mundiales podrían ser de miles de millones). Parte de la pérdida económica debida al EC se relaciona con una reducción en el consumo y eficiencia alimenticia, así como a un posible aumento de la mortalidad, crecimiento subóptimo, uso ineficaz de nutrientes, disminución del valor de la canal, y problemas en el procesamiento de la canal (Baumgard y Rhoads, 2013).

La reducción en el valor de la canal se debe principalmente a que los cerdos criados bajo condiciones de EC reducen su masa muscular y aumentan su porcentaje de grasa de corporal.

El hecho de que los cerdos criados en condiciones de EC hayan reducido la masa muscular y aumentado el tejido adiposo se ha documentado con frecuencia durante los últimos años (Collin *et al.*, 2001). Aparte de los efectos directos sobre el animal, los efectos perjudiciales del cambio climático se observarán en una menor disponibilidad y calidad de los alimentos y en el aumento de la susceptibilidad a parásitos y enfermedades transmitidas por vectores (Baumgard *et al.*, 2013). Por consiguiente, el EC podría convertirse en uno de los problemas más costosos y ciertamente uno de los principales obstáculos para los poricultores (Baumgard *et al.*, 2013).

2.2 Temperatura de confort y estrés por calor

La temperatura de confort es aquella en la que el animal no tiene que hacer ningún esfuerzo para mantener su temperatura corporal dentro de un rango normal para su especie, sin afectar su metabolismo, ni sus actividades diarias. En cerdos la temperatura de confort fluctúa entre 19 a 29 °C dependiendo de la etapa de crecimiento (Quiniou *et al.*, 2000). Cuando la temperatura ambiente (TA) está por encima de este rango, dependiendo de la duración del mismo, los animales se incomodan para llevar a cabo sus actividades normales, ya que reciben una carga de calor superior a su capacidad de disipación; en consecuencia generan una serie de respuestas conductuales y fisiológicas para contrarrestar el efecto (Patience *et al.*, 2005).

2.3 Efectos del EC en el consumo de alimento

La reducción en el consumo voluntario de alimento (CVA) es el primer signo del EC observado en cerdos en crecimiento y finalización (Renaudeau *et al.*, 2008). Los cerdos en EC pueden reducir su CVA entre un 20% y un 40% en relación a los valores estimados del NRC (2012), lo cual reduce su velocidad de crecimiento (Pearce *et al.*, 2013; Pearce *et al.*, 2014), además, es bien conocido que el hecho de consumir el alimento y el proceso de digestión-absorción-metabolismo de los nutrientes genera calor adicional, esta reducción del CVA es una adaptación que permite a los cerdos producir menos calor debido al efecto térmico de alimentación (Noblet *et al.*, 1993).

2.4 Efectos del EC en las constantes fisiológicas de los cerdos

El aumento de la temperatura ambiental provoca modificaciones importantes en las constantes fisiológicas de los animales, tales como incremento en su frecuencia respiratoria, ritmo cardíaco, flujo de sangre periférica y temperatura corporal (Huynh *et al.*, 2005; Wilson y Crandall, 2012; Pearce, 2013; Morales *et al.*, 2016a). La TC en cerdos en condiciones de temperatura ambiental elevada se ha medido en recto (Pearce *et al.*, 2014), superficie de la piel (Yu *et al.*, 2010), subcutánea (Morales *et al.*, 2016a), óptica (Morales *et al.*, 2016b) y en órganos internos (Morales *et al.*, 2015; 2016b); y podría considerarse como un buen indicador de que el animal se encuentra en EC (Wilson y Crandall, 2012).

En general, los cerdos pueden disipar calor para mantener su TC dentro de rangos normales mediante varios mecanismos, por ejemplo, la transferencia de calor de órganos internos hacia la superficie redirigiendo la circulación sanguínea hacia la periferia (Huynh *et al.*, 2005), o mediante el incremento en la frecuencia respiratoria (Pearce *et al.*, 2013; 2014). Sin embargo, la reducción del flujo sanguíneo hacia órganos internos reduce el suministro de nutrientes y oxígeno a los mismos, específicamente hacia el tracto gastrointestinal, lo que podría contribuir a alterar su integridad y fisiología (Pearce *et al.*, 2014). Todos los cambios mencionados están dirigidos a disipar y reducir el calor producido dentro del cuerpo (Bernabucci *et al.*, 2010).

2.5 Efecto del EC a nivel intestinal

En cerdos en crecimiento, el intestino delgado mide aproximadamente 16 a 21 m de largo, de los cuales 5% es duodeno, 90% de yeyuno y 5% de íleon (Yen, 2001). El duodeno es el lugar donde la digesta del estómago se mezcla con las secreciones del intestino, del hígado y el páncreas (Lewis y Southern, 2000). El yeyuno es el más largo y comprende un gran número de asas. El íleon puede ser identificado a partir de yeyuno por sus capas musculares ligeramente más gruesas y la unión con el intestino grueso (Lewis y Southern, 2000).

Se ha reportado que el EC reduce la altura de vellosidades de intestino delgado dentro de los primeros 3 días de exposición a TA elevada en yeyuno (Liu *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010); aunque aparentemente a partir de 6 días de exposición al EC puede darse un proceso de recuperación en estos parámetros (Liu *et al.*, 2009).

Por otra parte, se ha observado que en EC se incrementan las pérdidas endógenas de arginina y treonina (Morales *et al.*, 2016b), aminoácidos asociados a la proliferación y salud de los entéroцитos (Sonna *et al.*, 2002); y se modifican los parámetros de digestibilidad ileal aparente y estandarizada de aminoácidos (Morales *et al.*, 2016c).

A nivel celular la absorción de nutrientes se lleva a cabo mediante varios sistemas de proteínas transportadoras, que varían en capacidad, especificidad y sustratos (Bröer, 2008). Estas proteínas reconocen a los nutrientes, los ligan y transportan de la luz intestinal al interior de la célula o viceversa. Se ha documentado que el EC afecta la expresión de algunos de los transportadores de aminoácidos como $b^{0,+}$ y CAT-1 en intestino, tejido hepático y muscular (Morales *et al.*, 2014); además, se ha comprobado su efecto negativo en el transporte y metabolismo de glucosa (Pearce *et al.*, 2012).

2.6 Histología del intestino delgado

La pared intestinal está formada por cuatro capas o tunicas concéntricas que son: mucosa, submucosa, muscular y serosa (Mowat y Viney, 1997).

2.6.1 Capa mucosa

La mucosa intestinal es la parte más interna del intestino. Esta capa participa en los procesos de digestión y absorción de nutrientes y provee la barrera fisicoquímica, metabólica e inmunológica contra la entrada de toxinas, macromoléculas y microorganismos al organismo (Soraci *et al.*, 2010). La mucosa conforma el revestimiento interno del intestino delgado, y presenta una serie de pliegues o vellosidades intestinales que forman proyecciones de la mucosa, en dirección al lumen del intestino delgado. Posee una lámina epitelial, una lámina propia y una muscular; y entre ellas existen pequeñas aperturas de glándulas tubulares simples denominadas criptas (Junquera y Carneiro, 2011). Esta lámina penetra en el centro de las vellosidades intestinales, donde las células musculares lisas se encargan del movimiento rítmico de estas para la absorción de nutrientes (Junqueira y Carneiro, 2006).

2.6.2 Capa submucosa

La capa submucosa está conformada por tejido conectivo moderadamente denso e irregular (donde abundan las fibras elásticas y puede aparecer el tejido adiposo), sirviendo de soporte a la red arterial, venosa y linfática que la recorre, así como al plexo nervioso submucosa, interno o de Meissner (Gasquez y Blanco, 2004).

En la porción anterior del intestino delgado se observan glándulas tubuloalveolares simples ramificadas, cuyos conductos excretores desembocan en el fondo de las criptas o entre las vellosidades (Gasquez y Blanco, 2004; Leeson *et al.*, 1990).

Estas son llamadas glándulas de Brunner o duodenales, debido a que en los mamíferos domésticos siempre están presentes en el duodeno, pero su límite posterior varía ampliamente (Gasquez y Blanco, 2004). Su secreción viscosa y alcalina (pH 8.1 – 9.3) protege la mucosa del contenido gástrico y provee un medio adecuado para la actividad de las enzimas pancreáticas al neutralizar el pH del quimo (Junqueira y Carneiro, 2006). Se ha demostrado que las glándulas de Brunner contienen urogastrona, péptido que inhibe la secreción del ácido clorhídrico en el estómago y también estimula la proliferación del epitelio, y por ende la renovación rápida de las células del epitelio dentro de las criptas intestinales (Leeson, *et al.*, 1990). La submucosa también contiene folículos linfoides aislados, cuyo número aumenta caudalmente donde forman agregados linfoides ubicados en el lado opuesto de la inserción mesentérica (Placas de Peyer). Su desarrollo depende de la especie y desempeñan una función defensiva importante (Gasquez y Blanco, 2004).

2.6.3 Capa muscular

La capa muscular o *muscularis propria*, se encuentra formada por dos bandas de fibras musculares lisas, la circular interna y la longitudinal externa, estando unidas por un estrato conectivo rico en fibras elásticas donde se sitúa el plexo nervioso mientérico, externo, principalmente responsable de la contractilidad y control de la motilidad intestinal (Gasquez y Blanco, 2004; Junqueira y Carneiro, 2006).

2.6.4 Capa serosa

La capa serosa es la capa más externa, está constituida por una delgada capa de tejido recubierta en su superficie libre por una capa de células planas o mesotelio que se corresponde con la hoja visceral del peritoneo y es completa, excepto en el borde mesentérico, donde los vasos y nervios abordan la piel intestinal (Leeson *et al.*, 1990).

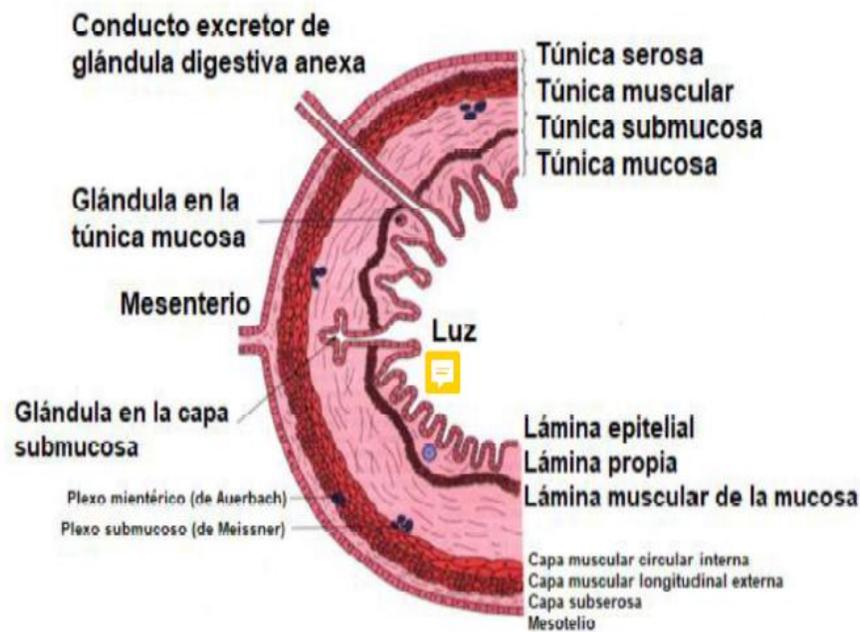


Figura 1. Histología normal del intestino delgado de cerdo: capa mucosa, submucosa, muscular y serosa (tomado de DiFiore, 2005).

2.7 Efecto del estrés por calor en la morfología intestinal

El intestino delgado es el órgano tubular del aparato digestivo que transporta el bolo alimenticio desde el estómago hacia el intestino grueso y es el principal sitio en donde se realiza la absorción de nutrientes (Chen *et al.*, 2008). Para que el proceso de absorción se realice de forma óptima, es necesario que el intestino y las vellosidades intestinales estén libres de factores estresantes que puede retrasar o dificultar su función (Duo *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2002). La mucosa del intestino delgado se constituye de dos estructuras principales: vellosidades y criptas. El EC se puede provocar una disminución en altura de las vellosidades y profundidad de las criptas, estas alteraciones incluyen pérdida de integridad, cambio de forma y color de las vellosidades intestinales (Nabuurrs *et al.*, 1993; Van beerschreurs, 1998), lo que afecta la digestión y absorción de nutrientes (Liu *et al.*, 2009). Los daños mencionados pueden asociarse con estrés oxidativo o acumulación de radicales libres al interior de las células epiteliales y de otros estratos del intestino.

2.8 Estrés oxidativo

Los radicales libres son moléculas que tienen un electrón desapareada en su orbital más externo que le confiere una capacidad de reacción muy elevada, por lo que son capaces de actuar en los sistemas biológicos produciendo cambios en la composición química y estructura celular (Romero *et al.*, 1998). En cualquier proceso metabólico se producen radicales libres o especies reactivas de oxígeno (Huerta-Jiménez *et al.*, 2005).

Se ha reportado que la exposición al calor por tiempos prolongados incrementa la producción de radicales libres de oxígeno e inducen el estrés oxidativo lo que puede generar toxicidad (Bernabucci *et al.*, 2002). Sin embargo el organismo animal siempre trata de regular y mantener en balance la producción de radicales libres mediante sistemas de defensa antioxidante (Martínez *et al.*, 2003). Cuando la cantidad de oxígeno es excesiva, el proceso oxidativo provoca un incremento drástico en los niveles de radicales libres, por lo que los antioxidantes naturales del organismo son insuficientes para neutralizar los productos de la oxidación (Venereo-Gutiérrez, 2002). La acumulación de radicales libres puede llevar a la muerte celular y predisposición a enfermedades (Venereo-Gutiérrez, 2002). Cuando incrementa la concentración de radicales dentro del organismo, se considera que el animal se encuentra en estrés oxidativo (Huerta-Jiménez *et al.*, 2005). Se ha planteado que suplementar con antioxidantes podría ayudar a reducir este problema.

Metionina es un aminoácido que se ha reconocido como parte de los sistemas antioxidantes en la célula (Luo y Levine, 2009), como se verá adelante proporcionarlo en la dieta de cerdos en EC podría ayudar a aminorar el estrés oxidativo.

2.9 Aspectos generales de los aminoácidos

Los aminoácidos (AA) son los componentes básicos de las proteínas, químicamente están compuestos por un grupo amino (-NH₂), un grupo carboxilo (-COOH) unidos a una cadena lateral específica para cada AA. Las proteínas son polímeros de AA donde el grupo carboxilo de un AA está unido al grupo amino de otro AA mediante enlaces covalentes, denominado enlaces peptídicos (Van Milgen y Dourmad, 2015).

Las proteínas poseen diferentes funciones biológicas, por ejemplo: hormonas, enzimas, estructurales, de transporte, etc. (Wu, 2010).

En general, las proteínas están formadas de 20 AA distintos que han sido clasificados en esenciales y no esenciales (Cuadro 1). Los AA no esenciales son aquellos que el organismo puede sintetizar y no tienen que consumirlo directamente en su dieta, en cambio los AA esenciales son aquellos que no puede sintetizar o no puede sintetizarlo en las cantidades necesarias y debe ser incluido en la dieta (Wu, 2009).

Algunos AA no esenciales que no pueden ser sintetizados en forma suficiente durante ciertas etapas de desarrollo de los organismos se consideran como AA esenciales condicionales, tal es el caso de arginina durante la etapa de destete (Rezaei *et al.*, 2013).

Cuadro 1. Clasificación de los aminoácidos esenciales y no esenciales (Mahan y Shields, 1950; Mertz *et al.*, 1952)

Esenciales	No esenciales
Arginina	Alanina
Histidina	Asparagina
Isoleucina	Acido aspártico
Leucina	Cisteína
Lisina	Acido glutámico
Metionina	Glutamina
Phenillanina	Glicina
Treonina	Prolina
Triptófano	Serina
Valina	Tirosina

2.10 Metionina como aminoácido funcional y sus funciones específicas

Las dietas a base de cereales (maíz, sorgo, trigo) y pasta de soya son deficitarias en metionina, por lo tanto, la suplementación en forma libre en la alimentación animal se ha venido realizando de forma rutinaria (Cromwell 2004; Dilger y Baker 2007). Además de su aporte nutricional, es muy importante para el metabolismo y salud intestinal de los animales.

Metionina es un aminoácido neutro, azufrado, esencial para los mamíferos, importante para las reacciones de metilación y la formación de poliaminas (Finkelstein, 1990; Martín-Venegas *et al.*, 2006).

Además de su importancia como constituyente de las proteínas, es también una fuente de azufre, un mineral esencial, que inactiva rápidamente los radicales libres producidos en el cuerpo, se le reconoce una función antioxidante (Luo y Levine, 2009). Es abundante en la superficie de proteínas ligadas a ácidos nucleicos mitocondriales, las cuales son expuestas a flujos altos de oxidantes (Bender *et al.* 2007). Tiende a tener una mayor tasa de metabolismo de primer paso en el intestino que algunos otros AA esenciales (Stoll *et al.*, 1998). Estas funciones son importantes para el desarrollo y el estado de salud del animal, ya sea como AA libre o como parte de las proteínas. Metionina se puede combinar con el ATP por la acción de la metionina adenosil transferasa para formar S-adenosilmetionina (SAM). Este metabolito dona un grupo metilo por la acción de las metil transferasas generando S-adenosilhomocisteína (SAH) en el proceso. A continuación, la SAH se hidroliza por la homocisteína adenosil hidrolasa liberando adenosina y homocisteína en el proceso. La homocisteína es el metabolito que se combinará con la serina para acabar generando cisteína, uno de los componentes del glutatión el principal antioxidante de la célula (Rao *et al*, 1990). Así pues, cuando se incrementa la concentración de metionina en las dietas pueden elevarse los niveles antioxidantes celular.

El análogo de metionina es un nuevo producto biotecnológico que está disponible en el mercado, contiene 12% de agua y 88% de disponibilidad en comparación con DL-metionina con 99% de disponibilidad por el animal (Binder y Lemme 2007).

Químicamente, a diferencia de metionina, MHA-FA tiene un grupo hidroxilo en el carbono alfa que sustituye al grupo amino de la metionina. 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; Martín-Venegas *et al.*, 2006; Martín-Venegas *et al.*, 2007). La adición de dietas con DL-metionina y su análogo podrían ayudar a aliviar los efectos negativos del EC en los cerdos y mantener la recuperación de las características histológicas de las vellosidades intestinales.

III. JUSTIFICACION

En regiones con climas cálidos o muy cálidos los animales padecen de EC. Este problema afecta negativamente su producción por lo que es necesario buscar alternativas para mantener una producción segura y estable de acuerdo con la creciente demanda de productos de origen animal.

Una consecuencia del EC es el retraso en la tasa de crecimiento de los animales asociada a un bajo consumo de alimento y daño del epitelio intestinal lo que causa reducción en su capacidad de digerir y absorber los nutrientes del alimento. Además, en animales en EC se ha observado un incremento en la concentración de los radicales libres a nivel celular que bien podría eliminarse con la adición de antioxidantes en la dieta.

El análogo de metionina, un nuevo producto biotecnológico que está en el mercado aparentemente puede cubrir el mismo función que DL-metionina, se propone este estudio para evaluar el efecto de la suplementación de ambos productos en forma libre en dietas para cerdos en crecimiento sobre su comportamiento productivo y las características histológicas del epitelio intestinal de cerdos en crecimiento criadas bajo condiciones de EC.

IV. HIPOTESIS

La adición de metionina libre en forma de DL-metionina o del hidroxianálogo de metionina a dietas para cerdos en crecimiento bajo condiciones de estrés por calor puede contribuir a mejorar su comportamiento productivo y características histológicas del epitelio de intestino delgado.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Estudiar el efecto de la suplementación con metionina y del hidroxianálogo de metionina a dieta de cerdos en crecimiento bajo condiciones de estrés por calor sobre su comportamiento productivo y características histológicas del epitelio de intestino delgado.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar el comportamiento productivo (ganancia diaria de peso, consumo de alimento y eficiencia productiva) de cerdos en EC suplementados con DL-metionina y el hidroxianálogo de metionina.
- Analizar el efecto de suplementar con DL-metionina y el hidroxianálogo de metionina en la frecuencia respiratoria y temperatura corporal de los cerdos en EC.
- Estudiar el efecto de suplementar con DL-metionina y el hidroxianálogo en las características histológicas del intestino delgado de los cerdos en EC.

VI. MATERIALES Y METODOS

6.1 Localización

El experimento se realizó en el Laboratorio de Metabolismo y Fisiología de Cerdos ubicado en el Instituto de Ciencias Agrícolas (ICA) de la Universidad Autónoma de Baja California (UABC), durante los meses de agosto y septiembre de 2018. En esta época de verano se registran las temperaturas más cálidas del año en Mexicali, BC., con variaciones diurnas de 25 a 50 °C

6.2 Selección de animales

Se utilizaron 30 cerdos (15 machos castrados y 15 hembras) cruzados (Landrace x Duroc x Yorkshire), con un peso promedio de 23 ± 1 kg provenientes de la granja experimental de la ICA-UABC. Los cerdos se alojaron en corraletas individuales de 0.6 X 1.2 m y fueron distribuidos aleatoriamente a tres tratamientos de acuerdo con su peso inicial, sexo, edad y camada. El experimento se llevó a cabo en dos periodos de 21 días cada uno. En el primer periodo se emplearon 6 cerdos por tratamiento y en el segundo periodo 4 cerdos por tratamiento.

6.3 Dietas e ingredientes

Se utilizaron tres dietas experimentales; el tratamiento 1, **Testigo** consistió en una dieta formulada con 86.4% de trigo, 10% de soya, aminoácidos libres (L-Lis-HCl 0.56; L-Thr 0.17; DL-Met 0.06; L-Trp 0.01%), vitaminas y minerales para cubrir el requerimiento de los cerdos (NRC, 2012); para el tratamiento 2, **DL-Met**, la dieta testigo fue adicionada

0.20% de DL-Metionina; y para el tratamiento 3, **MHA-FA**, la dieta testigo fue adicionada 0.40% con un análogo de metionina (MHA-FA, DL-methionine hydroxy analog-free acid). Debido a su concentración, el 0.40% de MHA-FA fue equivalente al 0.20 % de metionina. La composición de las dietas se presenta en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Composición de las dietas experimentales (%)

Ingrediente	Testigo	DL-Met	MHA-FA
Trigo	86.40	86.20	86.00
Pasta de soya	10.00	10.00	10.00
L-Lisina.HCL	0.56	0.56	0.56
L-Treonina	0.17	0.17	0.17
DL-Metionina	0.06	0.26	0.06
Hidroxianálogo de metionina (MHA-FA)			0.40
L-Triptófano	0.01	0.01	0.01
Carbonato de calcio	1.40	1.40	1.40
Ortofosfato	0.65	0.65	0.65
Sal ionizado	0.35	0.35	0.35
Premezcla de vitaminas y minerales*	0.40	0.40	0.40
Total	100	100	100

* Suministra por kg de dieta: Vit. A, 4,800 UI; Vit. D3, 800 UI; Vit. E, 4.8 UI; Vit. K3, 1.6 mg; riboflavina, 4 mg; Acido D- pantoténico, 7.2 mg; niacina, 16 mg; Vit. B12, 12.8 mg; Zn, 64 mg; Fe, 64 mg; Cu, 4 mg; Mn, 4 mg; I, 0.36 mg; Se, 0.13 mg. Nutrionix, S.A., Hermosillo, México.

6.4 Procedimientos experimentales

Antes de iniciar cada período del experimento los cerdos se mantuvieron en adaptación durante cinco días, durante esta etapa fueron colocados dentro de corraletas individuales de piso elevado 0.6 X 1.2 m, equipadas con comedero tipo tolva y bebedero automático de chupón. Durante el resto del experimento el agua y alimento se ofrecieron *ad libitum*.

Al inicio de cada período los cerdos fueron pesados, identificados y asignado a un tratamiento. Los comederos fueron pesados y se registró diariamente el alimento servido a cada cerdo, así como el alimento desperdiciado y rechazado; el peso de los cerdos se registró cada semana utilizando una báscula electrónica. Con estos datos se estimó el consumo de alimento, ganancia de peso y conversión alimenticia de cada cerdo. Se midió la frecuencia respiratoria (número de expansiones del tórax) de todos los animales a las 0700 h y a las 1600 h durante los días 13 y 15 del experimento con un cronómetro. Se emplearon otros cuatro 4 cerdos adaptados con una cánula ileal, a través de la cual se introdujo un termógrafo (Thermotracker BT) programado para medir su temperatura intestinal cada 15 minutos, estos cerdos recibieron la dieta testigo. La sala en donde se alojó a los cerdos estaba expuesta a las variaciones naturales de la temperatura ambiental de la época de verano, por lo que se consideró que estuvieron expuestos de forma natural a EC. Dentro de la sala se instaló un higrotermógrafo (Thermotracker Higro) programado para registrar la temperatura ambiental y humedad relativa cada 15 minutos.

Los resultados de humedad y temperatura ambiental se emplearon para estimar el índice temperatura-humedad (ITH) de acuerdo con la fórmula reportada por NWSCR (1976): $ITH \text{ cerdo} = [(1.8 \cdot T) + 32] - (0.55 \cdot (HR/100)) \cdot (((1.8 \cdot T) + 32) - 58)$

6.5 Sacrificio y recolección de muestras intestinales

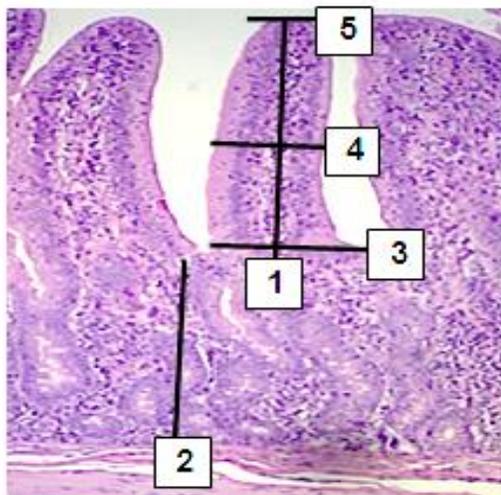
El día 21 de cada período del experimento se procedió al sacrificio de los cerdos en el taller de carnes del ICA-UABC. El sacrificio inició a las 0815 horas de la mañana, alternando un cerdo por tratamiento. Los cerdos fueron previamente insensibilizados mediante descarga eléctrica, y luego desangrados. Se recolectaron muestras de aproximadamente 5 cm de cada segmento de intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon), las cuales fueron colocadas en fenol al 10% con buffer de fosfato de sodio. Estas muestras se emplearon para analizar las características del epitelio intestinal mediante las técnicas histológicas.

6.6 Preparación de muestras para observación de histología de epitelio intestinal

La morfología intestinal fue analizada empleando el método descrito por Moeser *et al.*, (2012). Los cortes macroscópicos de las muestras de duodeno, yeyuno e íleon conservadas en formol, fueron incluidos en parafina, seccionados a 3 μm de espesor y tenidos con HE (Driscoll y Ryan, 1978). En cada portaobjetos se montaron dos cortes transversales. El procesamiento de estas muestras y preparación de laminillas se llevó a cabo en la Universidad Autónoma de Nuevo León.

En los cortes histológicos de intestino delgado se midió el promedio de la altura y ancho de las vellosidades, así como la profundidad y ancho de las criptas adyacentes.

La observación del tejido se realizó empleando un microscopio óptico (Primo Star Zeiss, HBO50, México). Mediante el uso de una cámara fotográfica adaptada marca Canon se tomaron fotografías de varias secciones de los diferentes segmentos intestinales, de tal manera que se garantizara la observación completa de las vellosidades intestinales. A partir de esas imágenes se realizaron las mediciones correspondientes de cada muestra. Se utilizó el Software Image J2 (Curtis *et al.*, 2017), mismo que permite estimar la medida de un área histológica que se encuentra en pixeles y transformarla a unidades de longitud (micrómetros, en este caso).



1. Altura de vellosidad
2. Profundidad de Criptas
3. Ancho vellosidad basal
4. Ancho vellosidad medio
5. Ancho vellosidad apical

Figura 2. Sitios histológicos y localización del intestino delgado empleado para análisis morfométricos (De Conto *et al.*, 2010).

Las variables morfométricas de las vellosidades intestinales que se midieron en cada corte histológico fueron realizadas de acuerdo a lo descrito por (Marion *et al.*, 2002):

- 1) Altura: una vez que se estableció la base de la vellosidad, desde su punto medio se trazó una línea hasta el ápice.
- 2) Ancho de vellosidad: con una línea se unieron los bordes apicales de las células epiteliales de lados opuestos, ubicadas aproximadamente en la mitad de la vellosidad.
- 3) Profundidad y ancho de las criptas intestinales.

6.7 Análisis Estadístico

Se realizó análisis de varianza bajo un diseño experimental de bloques completos al azar, utilizando el procedimiento GLM del programa SAS. Se construyeron 3 contrastes para determinar los siguientes efectos: C1, efecto de la dieta testigo con la dieta suplementada con DL-Metionina (Testigo vs DL-Met), C2: efecto de la dieta testigo con la dieta suplementada con el análogo de metionina (Testigo vs MHA-FA), C3: efecto de la dieta suplementada con DL-Metionina con el análogo de metionina (DL-Met vs MHA-FA).

VII. RESULTADOS

7.1. Variables ambientales

La temperatura ambiente promedio durante del estudio fue 33 °C; con 28.2 °C de temperatura mínima y 35 °C, la temperatura máxima. Alrededor de las 0700h se registró la temperatura más baja; la temperatura comenzaba a incrementarse a partir de las 0900h; y la máxima ocurría alrededor de las 1600h, momento en que se observó que afectaba más a los animales; durante la noche la temperatura descendía paulatinamente. La mayor humedad relativa, 82%, se registraba en las mañanas y a partir de las 1000h comenzaba a descender hasta la 1600h, cuando se observó menor humedad ambiental 34%, como se muestra en la Figura 3.

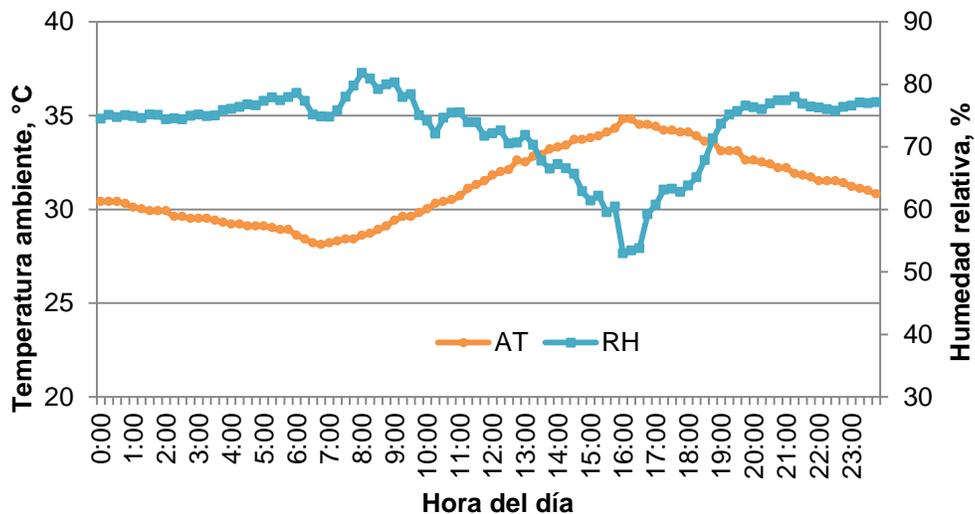


Figura 3. Temperatura ambiente (° C) y humedad relativa (%) en la sala

Diariamente, el índice de calor fue alrededor de 69 a las 0700h de la mañana; éste se incrementó paulatinamente, y a las 1600h alcanzó 77, para nuevamente comenzar a bajar (Figura 4).

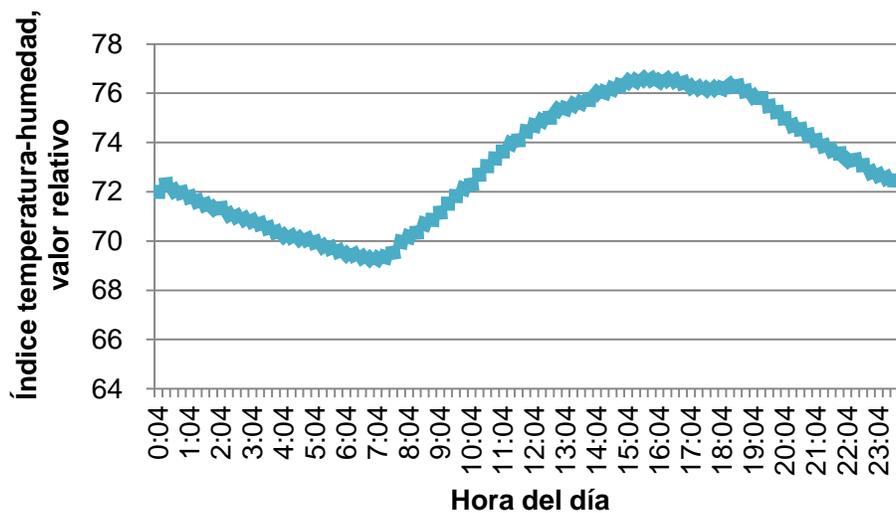


Figura 4. Índice de temperatura y humedad (ITH)

7.2 Variables fisiológicas

La temperatura intestinal promedio de los cerdos durante el día fluctuó entre 39.7 y 40.8 °C (Figura 5). Durante la mañana (0700h) la frecuencia respiratoria de los cerdos fue de 29 a 38 pulsos x minutos; en la tarde (1600h) la frecuencia se incrementó de 85 a 95 pulsos x minutos (Figura 6).

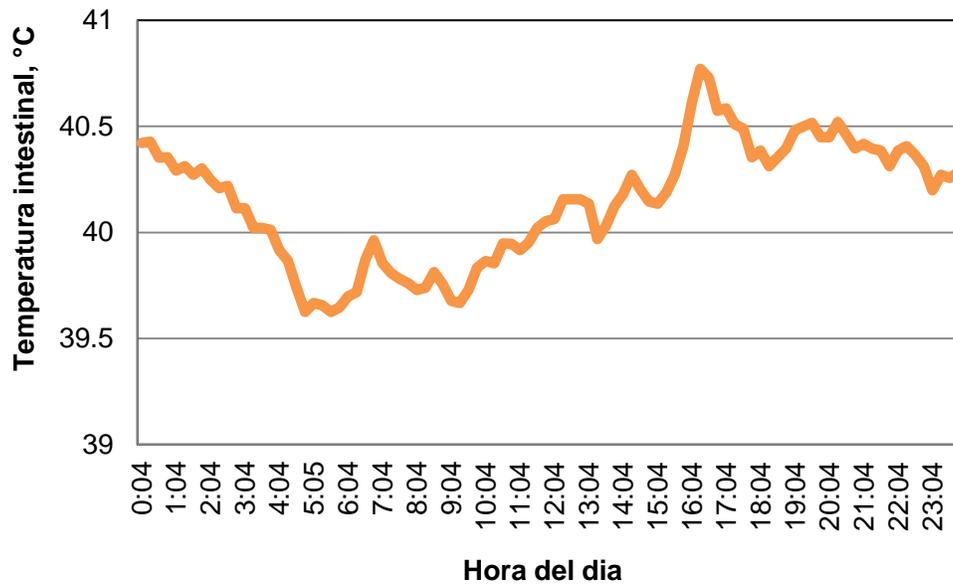


Figura 5. Temperatura intestinal de los cerdos alimentados con la dieta testigo durante cuatros días durante el período experimental

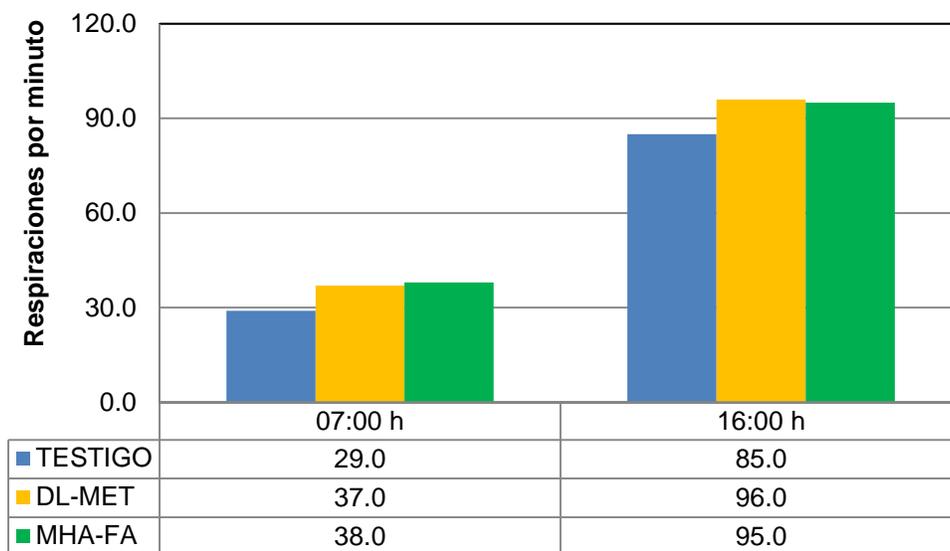


Figura 6. Frecuencia respiratoria de los cerdos

7.3 Comportamiento productivo

Durante el primer periodo experimental murieron dos cerdos del tratamiento uno y en el segundo periodo murió un cerdo del tratamiento tres por causas ajenas del experimento. El peso promedio de los cerdos al final del ensayo fue de 29.7, 31.8 y 34.7 kg para el tratamiento Testigo, DL-Met, y MHA-FA, respectivamente. Los resultados de los parámetros productivos se muestran en el Cuadro 3.

Se observó una tendencia a incrementar la ganancia de peso (GDP) en el tratamiento suplementado con DL-metionina ($P=0.090$) y un incremento significativo en la GDP de los cerdos suplementados con el análogo de metionina ($P=0.001$). El consumo de alimento fue similar entre tratamientos; pero se la eficiencia alimenticia fue superior en los cerdos alimentados con DL-Met y MHA-FA. ($P<0.05$).

Cuadro 3. Variables de comportamiento productivo ganancia diaria de peso (GDP), consumo diario de alimento (CDA) y eficiencia alimenticia de los cerdos expuestos a EC y alimentados con las dietas testigo, DL-Met y MHA-FA.

	Testigo	DL-Met	MHA-FA	EE	Contrastes, $P=^a$		
					C3	C2	C1
Peso inicial, kg	23.76	23.60	23.85				
Peso final, kg	29.70	31.85	34.73				
GDP, kg/d	0.299	0.39	0.499	30.4	0.090	0.001	0.060
CDA, kg/d	1.05	1.25	1.22	23.7	0.130	0.191	0.812
Eficiencia alimenticia	0.27	0.32	0.43	25.4	0.253	0.001	0.020

^aContrastes: C1, TESTIGO vs DL-MET; C2: TESTIGO vs MHA-FA; C3: DL-MET vs MHA-FA.

7.4 Histología intestinal de los cerdos

En el Cuadro 4 se presentan los promedios de altura de vellosidades intestinales, profundidad de criptas, relación altura de vellosidades: profundidad de criptas; así como ancho apical, medio y basal de las vellosidades analizadas en cortes histológicos de duodeno yeyuno e íleon de los cerdos en estrés por calor alimentados con la dieta testigo y suplementados con DL-metionina y el análogo de metionina.

En duodeno, la altura de vellosidades tendió a ser mayor en los cerdos que recibieron la dieta DL-Met ($P=0.058$), con un promedio de 249 micras en comparación con los tratamientos Testigo y MHA-FA en los que el promedio de altura de vellosidades fue de 220 micras. En promedio la profundidad de criptas en los tres tratamientos fue de 109 micras y la relación altura de vellosidades: profundidad de criptas fue de 2.30, ninguno de estos parámetros fue afectado ($P>0.10$) por la dieta consumida por los cerdos en EC. Los promedios de ancho apical, medio y basal de las vellosidades intestinales en los cortes histológicos de duodeno fueron 35, 38 y 43 micras respectivamente, ninguna de estas mediciones fue afectada ($P>0.10$) por el tipo de dieta.

En yeyuno, la altura de vellosidades tendió a ser mayor en los cerdos que recibieron la dieta DL-Met ($P=0.091$), con un promedio de 248 micras en comparación con los tratamientos Testigo y MHA-FA en los que el promedio de altura de vellosidades fue de 222 micras. La profundidad de criptas (122 micras) fue mayor en los cerdos que recibieron la dieta DL-Met ($P=0.031$), en comparación con los que recibieron la dieta testigo (101 micras); y tendió a ser mayor en los cerdos que recibieron la dieta MHA-FA ($P=0.091$; 106 micras).

La relación altura de vellosidades: profundidad de criptas fue de 2.21, ninguno de estos parámetros fue afectado ($P>0.10$) por la dieta consumida por los cerdos en EC.

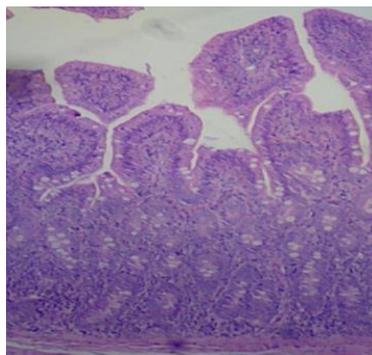
Los promedios de ancho apical, medio y basal de las vellosidades intestinales en los cortes histológicos de yeyuno fueron 35, 38 y 42 micras respectivamente, ninguna de estas mediciones fue afectada ($P>0.10$) por el tipo de dieta consumida por los animales.

En íleon, la altura de vellosidades fue mayor en los cerdos que recibieron la dieta DL-Met ($P=0.003$) y MHA-FA ($P=0.020$) con una altura de 240 y 226 micras en comparación con el tratamiento Testigo en que el promedio de altura de vellosidades fue de 187 micras. La profundidad de criptas fue mayor en los cerdos que recibieron la dieta DL-Met ($P=0.046$) y tendió a ser mayor en los cerdos que recibieron la dieta MHA-FA ($P=0.070$), en comparación con la dieta testigo. La relación altura de vellosidades: profundidad de criptas fue de 2.26, ninguno de estos parámetros fue afectado ($P>0.10$) por la dieta consumida por los cerdos en EC. Los promedios de ancho apical, medio y basal de las vellosidades intestinales en los cortes histológicos de íleon fueron 34, 37 y 42 micras respectivamente, ninguna de estas mediciones fue afectada ($P>0.10$) por el tipo de dieta consumida por los animales.

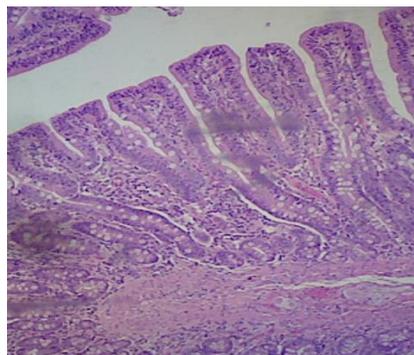
Cuadro 4. Características histología del epitelio de intestino delgado de los cerdos en crecimiento en EC alimentados con las dietas testigo, DL-Met o MHA-FA.

	Testigo	DL-Met	MHA-FA	Contrastes, P= ^a		
				C1	C2	C3
Duodeno						
Altura de vellosidad	201.56	249.42	238.32	0.058	0.135	0.640
Profundidad Criptas	95.39	121.41	110.35	0.111	0.213	0.352
Altura: Profundidad	2.24	2.27	2.41	0.907	0.529	0.607
Ancho Apical	36.44	33.93	34.1	0.387	0.419	0.954
Ancho Medio	38.6	37.17	37.95	0.693	0.857	0.829
Ancho Basal	44.47	40.57	42.98	0.408	0.750	0.605
Yeyuno						
Altura de vellosidad	207.26	247.61	238.48	0.091	0.182	0.688
Profundidad Criptas	101.12	122.41	106.28	0.031	0.571	0.091
Altura: Profundidad	2.16	2.13	2.35	0.879	0.446	0.363
Ancho Apical	33.72	32.08	38.18	0.557	0.122	0.041
Ancho Medio	37.88	38.31	35.6	0.887	0.459	0.380
Ancho Basal	42.04	44.68	40.16	0.566	0.685	0.333
Íleon						
Altura de vellosidad	186.94	240.42	226.33	0.003	0.020	0.365
Profundidad Criptas	89.19	111.2	109	0.046	0.070	0.831
Altura: Profundidad	2.36	2.20	2.21	0.428	0.461	0.955
Ancho Apical	32.96	32.36	35.31	0.828	0.409	0.301
Ancho Medio	34.76	38.44	36.85	0.226	0.485	0.593
Ancho Basal	42.4	41.05	41.38	0.771	0.826	0.943

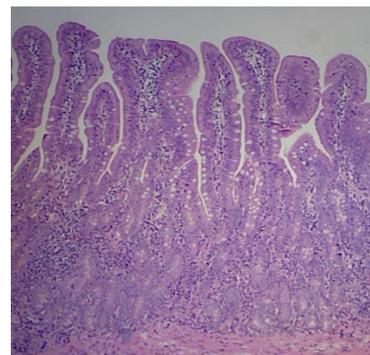
^aContrastes: C1, TESTIGO vs DL-MET; C2: TESTIGO vs MHA-FA; C3: DL-MET vs MHA-FA.



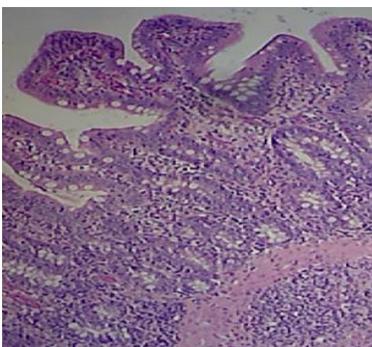
Duodeno-TESTIGO



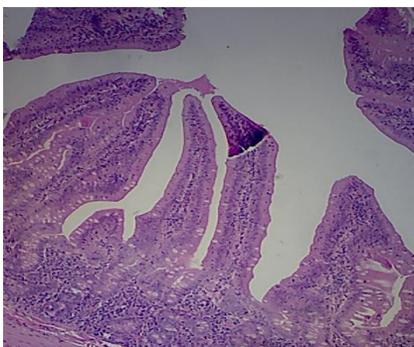
Duodeno-DL-METIONINA



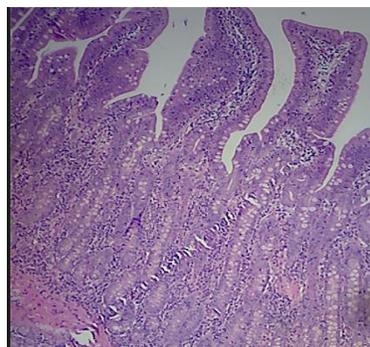
Duodeno-MHA-FA



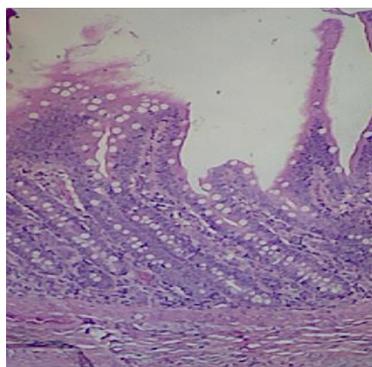
Yeyuno-TESTIGO



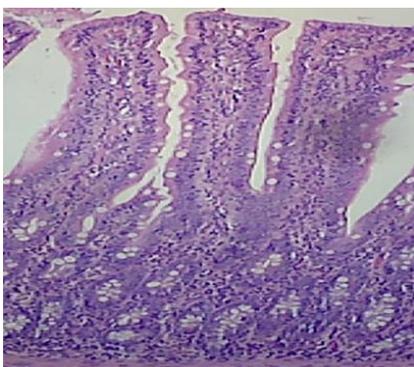
Yeyuno-DL-METIONINA



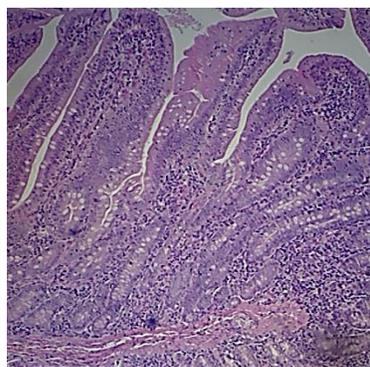
Yeyuno-MHA-FA



Íleon-TESTIGO



Íleon-DL-METIONINA



Íleon-MHA-FA

Figura 7. Características histológicas de vellosidades intestinales en cada una de las secciones de intestino delgado de cerdos en estrés por calor, alimentados con la dieta Testigo, DL-Met, o MHA-FA.

VIII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo la temperatura ambiental (TA) y humedad relativa (HR) dentro de la sala donde los cerdos se alojaron tenía variaciones importantes a lo largo del día. La fluctuación diaria en TA fue de 28 a 35 °C, con un ITH superior a 75 de las 1100h a las 2100h. Si se considera que la temperatura de confort para cerdos en crecimiento es de alrededor de 24 °C (Quiniou *et al.*, 2001), y un ITH de 75 a 79 es un indicador de peligro leve (NWSCR, 1976), entonces se confirma que los cerdos del presente trabajo se encontraban en condiciones de EC.

En este trabajo la temperatura corporal de los cerdos se incrementó 1.5 °C con respecto a su temperatura corporal normal. La frecuencia respiratoria de los cerdos también se incrementó durante la tarde, en este período fue cuando la TA alcanzó valores críticos; sin embargo, aunque el incremento en la frecuencia respiratoria es una medida para disipar calor, éste incremento no fue suficiente y los cerdos no lograron mantener su temperatura corporal, que para cerdos de esta edad y peso debería ser de 39.3 °C (Straw, *et al.*, 2006). Los resultados de este trabajo coinciden con lo observado anteriormente en cerdos en EC, los cuales han presentado incrementos de hasta 200% en su tasa respiratoria, y de hasta 2 °C por arriba de su temperatura corporal normal (Morales *et al.*, 2016a; Pearce *et al.*, 2014). Como se mencionó antes, la temperatura ambiental alta provoca EC en los animales en producción (Coffey *et al.*, 1995). Y de acuerdo con la literatura, a consecuencia de la temperatura ambiental elevada, se afecta negativamente el consumo de alimento, eficiencia productiva y reproductiva de los animales (Pearce *et al.*, 2013; Das *et al.*, 2016).

Collin *et al.* (2001b) demostraron que el consumo voluntario de alimento se reduce por el aumento en la temperatura ambiente, y que esa reducción en el consumo es la principal responsable de la reducción en el rendimiento productivo de los cerdos. Se ha propuesto que alimentar con dietas con una mayor concentración de nutrientes, o adicionadas con AA en forma libre podría contribuir a mejorar los parámetros productivos de cerdos en EC (Cervantes *et al.*, 2016).

En general, los AA de la dieta se emplean para la síntesis de proteínas (Wu *et al.*, 2014). Cuando esos AA se incluyen en forma libre, éstos no requieren ser digeridos, lo que contribuye a mejorar su absorción y disponibilidad en tejidos (Lewis, 2001). En el presente trabajo, la suplementación con DL-metionina y el análogo de metionina en forma libre ayudaron a mejorar la ganancia de peso y la eficiencia alimenticia de los cerdos en EC. Por una parte, es probable que esto sea resultado de una mayor absorción en el tracto gastrointestinal y disponibilidad en tejidos corporales; pero por otra es probable que esto sea resultado del efecto de metionina para prevenir la acumulación de ROS (Martínez *et al.*, 2017). Probablemente la suplementación de metionina o su análogo favorecieron su metabolismo y utilización en el intestino delgado (Stoll *et al.*, 1998), lo que pudo ayudar a mantener la integridad y salud intestinal. En consecuencia, la mejora en las características del epitelio intestinal, consecuencia de la adición de metionina a las dietas, pudo ayudar, de forma indirecta, a reducir la pérdida de AA endógenos y aumentar la digestibilidad ileal de los AA, especialmente lisina, primer AA limitante en cerdos que podría asociarse con una mejor digestión y absorción de los nutrientes acompañado con un mejor rendimiento y eficiencia de los cerdos (Liao *et al.*, 2015).

Hasta ahora hay poca información disponible acerca de la adición de metionina y su análogo a las dietas para cerdos en crecimiento en condiciones de estrés, por lo que se requiere de más estudios que demuestren su efecto directo en la producción animal y cómo podría ser la base de nuevas prácticas de producción de cerdos lo que representa una oportunidad para estudios futuros.

Diversos estudios han demostrado los efectos negativos del EC en la función e integridad intestinal. Cui y Gu (2015) y Yu *et al.* (2010) observaron que después de exponer a cerdos a 40 °C durante 5 horas por diez días (EC crónico), éstos presentaron daños significativos en mucosa de duodeno y yeyuno a partir de tres días en tratamiento. Lo anterior se debe a que la redirección del flujo sanguíneo hacia la periferia para eliminar calor, genera vasoconstricción en órganos del tracto gastrointestinal (Lambert, 2009); y, en consecuencia, el aporte de oxígeno y nutrientes al epitelio intestinal se reduce, lo que provocando daño severo a las células intestinales (Hall *et al.*, 2001), y acortamiento de vellosidades (Liu *et al.*, 2009). Como resultado de este problema, habría una reducción en la capacidad de absorción de nutrientes y predisposición a padecer problemas severos como infecciones y diarreas (Pearce *et al.*, 2013).

Por otra parte, Marion *et al.* (2002) observaron que un bajo consumo de alimento también puede explicar la reducción en la altura de vellosidades en el intestino delgado. En este experimento los cerdos tuvieron un consumo de alimento bajo, así como se ha visto en otros trabajos con cerdos en EC (Liu *et al.*, 2009; Pearce *et al.*, 2014).

Sin embargo, en el presente estudio, se observó un incremento en la altura de vellosidades y profundidad de las criptas debido principalmente a la suplementación con DL-metionina y en menor proporción por su análogo. Estos parámetros podrían indicar una mayor actividad del epitelio intestinal para mantener la proliferación y diferenciación de enterocitos, y asociarse con una mejora en la salud intestinal, su capacidad de digestión, absorción y disponibilidad de nutrientes para mantener proliferación y división celular (Maeda *et al.*, 2006). Además, aunque la relación altura de vellosidad: profundidad de criptas se considera un criterio útil para estimar la capacidad digestiva e integridad del intestino delgado (Montagne *et al.*, 2003), esta relación no fue afectada por la adición de metionina o su análogo en la dieta de los cerdos de este trabajo, ya que ambas se incrementaron de forma más o menos proporcional.

Una característica importante de metionina es su función antioxidante (Luo y Levine, 2009). En este sentido, metionina podría haber ayudado a reducir las lesiones a células epiteliales de intestino provocadas por el estrés oxidativo, debidas al EC, que en primer lugar se asociaría con el incremento en la altura de las vellosidades intestinales que observamos en este trabajo. A nivel celular, esta respuesta podría haber ocurrido debido a la participación de metionina tanto en la estructura como en la función de proteínas mitocondriales con actividad antioxidante (Binder *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2010), y a su participación en la síntesis de glutatión, que es una molécula antioxidante muy importante para la célula (Rao *et al.*, 1990).

De esta forma metionina pudo haber ayudado a aliviar los efectos negativos del estrés por calor, específicamente el estrés oxidativo y la recuperación de la altura de las vellosidades intestinales; así como a incrementar la absorción de nutrientes que pudimos traducir en la mejora en la ganancia de peso de los cerdos que recibieron las dietas con metionina y su hidroxianálogo.

Kaewtapee *et al.*, (2016) también informaron que la suplementación con el análogo de metionina mejoró la altura de vellosidades del yeyuno de lechones. Estos autores discuten acerca de que el análogo de metionina podría tener un efecto antioxidante secundario, ya que es precursor de taurina y glutatión; además de ser una fuente de energía y precursor de la síntesis de proteínas, que favoreció el crecimiento celular. Otro supuesto en el metabolismo de metionina, es que este AA juega un papel importante en la síntesis de poliaminas, compuestos que son clave para la proliferación de células epiteliales de intestino (Satriano, 2004), lo que explicaría el efecto benéfico de adicionar este AA a la dieta de animales en situaciones estresantes sobre su salud intestinal, pero que aún requiere ser confirmado.

Los resultados de este trabajo demuestran que aún se requiere un estudio mayor acerca de la adición de metionina y su análogo a dieta de cerdos en crecimiento criados en condiciones de estrés por calor, y que analizar su efecto directo en la producción y en la salud intestinal podría ser la base de nuevas prácticas de producción de cerdos.

IX. CONCLUSION

La suplementación con metionina y el hidroxianálogo de metionina incremento la ganancia de peso y eficiencia alimenticia de los cerdos en crecimiento bajo condiciones de estrés por calor; además mejoró las características histológicas del epitelio de intestino delgado.

X. LITERATURA CITADA

- Arce, N., Cota, M., Araiza, B. A., Cervantes, M., y Morales, A., 2013. Heat stress affects the intestinal temperature in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 91 (E-Suppl. 2):344. (Abstr.).
- Baumgard, L.H., y R. Rhoads. 2013. Effects of heat stress on postabsorptive metabolism and energetics. *Annual Review of Animal Biosciences.* 1: 311-337.
- Bernabucci, U., B. Ronchi, N. Lacetera, y A. Nardone. 2002. Markers of Oxidative Status in Plasma and Erythrocytes of Transition Dairy Cows During Hot Season. *J.DairySci.*85:21732179. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12362449>
- Bernabucci, U., Lacetera, N., Baumgard, L. H., Rhoads, R. P., Ronchi, B., y Nardone, a. (2010). Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal*, 4(7), 1167–1183. <https://doi.org/10.1017/S175173111000090X>
- Binder, M; A. Lemme. 2007. The characteristics of the methionine/hydroxy analogue calcium salt MHA-Ca (as a methionine source for the feed industry). *Amino News.Degussa* 08(02): 2-3.
- Bobadilla-Soto EE, Espinoza-Ortega A, M.-C. F. (2010). Dinámica de la producción porcina en México de 1980 a 2008 Swine production dynamics in México (1980 – 2008). *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 1(3), 251–268.

- Cervantes, M., Cota, M., Arce, N., Castillo, G., Avelar, E., Espinoza, S., & 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, x., J. Zhao and H. Gregersen. 2008. The villi contribute to the mechanics in the guinea pig small intestine. *J. of Biomechanics*. 41: 806-812.
- Coffey, R.D., G.R. Parker and K.M. Laurent. 1995. Feeding growing-finishing pigs to maximize lean growth rate. In ASC-147- Cooperative Extension Service; University of Kentucky College of Agriculture: Lexington, KY, USA.
- Collin, A., J.van Milgen, S. Dubois, and J. Noblet 2001. Effect of high temperature and feeding level on energy utilization in piglets. *J. Anim. Sci.* 79:1849-1857.
- Collin, A., van Milgen, J., Le Dividich, J., 2001b. Modelling the effect of high, constant temperature on food intake in young growing pigs. *Anim. Sci.* 72, 519–527.
- Cromwell, G. L. 2004. Identifying the limiting amino acids in complex and cereal grain-based diets to minimize nitrogen excretion. In: Midwest Swine Nutr. Conf. Proc. Indianapolis, IN. The Ohio Univ. Press, Columbus, OH. p. 69–83.
- Cui, Y., y X. Gu. 2015. Proteomic changes of the porcine small intestine in response to chronic heat stress. *J. Mol. Endocrinol.* 55:277–293. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26416815>

- Curtis, T.R., J. Schindelin, M.C. Hiner, B.E. De Zonia, A.E. Walter, E.T. Arena, K.W. Eliceiri. 2017. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*. 18: 529.
- Das, R., S. Lalrendpuii, V. Nishat, B. Phranay, J. Saika, and R. Kumar. 2016. Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review, *Veterinary World*, 9(3): 260-268.
- De Conto, C., A. Oevermann, I.A. Burgener, M.G. Doherr and J.W Blum. 2010. Gastrointestinal tract, mucosal histomorphometry and epithelial cell proliferation and apoptosis in neonatal and adult dogs. *J. Anim. Sci.* 88:2255-2264.
- Dibner, J. J. 2003. A review of the metabolism of 2-hydroxy-4- (methylthio) butanoic acid. *World's Poult. Sci. J.* 59:99–110.
- Difiore, M. 2005. Atlas de histología. Ed. Ateneo. Buenos Aires. 457 páginas.
- Dilger, R. N., and D. H. Baker. 2007. DL-Methionine is as efficacious as l-methionine, but modest l-cystine excesses are anorexigenic in sulfur amino acid-deficient purified and practical-type diets fed to chicks. *Poult. Sci.* 86:2367–2374.
- Duo, Y., Y. Fan, J. Zhao and H. Gregersen. 2006. Longitudinal residual strain and stress train relationship in rat small intestine. *Bio Medical Engineering Online*, 5: 37. Editorial Masson S.A.p 512.

- Driscoll, J.O. and J.P. Ryan. 1978. A modified haematoxylin and eosin stain for Duo, Y., Y. Fan, J. Zhao and H. Gregersen. 2006. Longitudinal residual strain and stress-strain relationship in rat small intestine. *Bio Medical Engineering Online*, 5: 37. Editorial Masson S.A.p 512.
- Fang Z. et al., 2010. Fang, K. Yao., X. Zhang, S. Zhao, Z. Sun, D. Wu *Nutrition and health relevant regulation of intestinal sulfur amino acid metabolism Amino Acids.*, 39 (2010), pp. 633-640.
- Finkelstein, J. D. 1990. Methionine metabolism in mammals. *J. Nutr.Biochem.* 1:228-237.
- Gasquez A, Blanco A. (2004). *Tratado de histología veterinaria*. 1ª ed. España: Hahn, G. L. 1999. Dynamic responses of cattle to thermal heat loads. *J. Anim. Sci.* 77 Suppl 2:10–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15526777>
- histological sections of lymph nodes. *J.Clin. Pathol.* 31:700.
- Hahn, G. L. 1999. Dynamic responses of cattle to thermal heat loads. *J. Anim. Sci.* 77 Suppl 2:10–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15526777>
- histological sections of lymph nodes. *J.Clin. Pathol.* 31:700.
- Hall, D. M., G. R. Buettner, L. W. Oberley, L. Xu, R. D. Matthes, and C. V. Gisolfi. 2001. Mechanisms of circulatory and intestinal barrier dysfunction during whole body hyperthermia. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 280. Available from: <http://ajpheart.physiology.org/content/280/2/H509.long>

- Hou, Y., Y. Yin, and G. Wu. 2015. Dietary essentiality of nutritionally non-essential amino acids for animals and humans. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 240:997–1007. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26041391>
- Huerta-Jiménez, M., M. E. Ortega-Cerrilla, M. C. Peralta, J. G. Herrera-Haro, A. Díaz-Cruz y R. G. Perrusquía. 2005. Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales domésticos. *INCI30:12*. Disponible en línea: <http://www.scielo.org/ve/scielo.php?pid=S037818442005001200002>.
- Huynh, T. T. T., A. J. A. Aarnink, M. W. A. Verstegen, W. J. J. Gerrits, M. J. W. Heetkamp, B. Kemp, and T. T. Canh. 2005. Effects of increasing temperatures on physiological changes in pigs at different relative humidities. *J. Anim. Sci.* 83:1385. Available from: <https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/abstracts/83/6/0831385>.
- Junqueira LC, Carneiro J. (2006). *Histología básica*. 6ª ed. España: Editorial Masson S.A. p. 640.
- Junqueira LC, Carneiro J. (2011). *Histología básica*. 4ª ed. España: Editorial Masson S.A. p. 588.
- Kaewtapee, C., N. Krutthai, and C. Bunchasak. 2016. Effects of Supplemental Liquid DL-methionine Hydroxy Analog Free Acid in Diet on Growth Performance and Gastrointestinal Functions of Piglets. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 29:1166-1172.

- Lambert, G. P. 2009. Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. *J. Anim. Sci* 87:101–108. Available from: http://www.journalofanimalscience.org/content/87/14_suppl/E101
- Le Bellego, L., J. van Milgen, and J. Noblet. 2002. Effect of high temperature and low-protein diets on the performance of growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 80:691–701.
- Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA. (1990) Texto atlas de histología. 1ª ed. México: Editorial Interamericana Mc Graw – Hill.p. 741.
- Lewis, A.J. and L. Lee Southern. 2000. *Swine Nutrition, Second Edition*. ISBN 9781420041842.1032 paginas.
- Lewis AJ (2001) Amino acids in swine nutrition. In Lewis A, Southern JL (Eds.) *Swine Nutrition*. 2nd ed. CRC Press. New York, USA. Pp. 151-186
- Liao, S. F., T. Wang, and N. Regmi. 2015. Lysine nutrition in swine and the related monogastric animals: muscle protein biosynthesis and beyond. *Springerplus* 4:147. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25830085>
- Liu, F., J. Yin, M. Du, P. Yan, J. Xu, X. Zhu, and J. Yu. 2009. Heat-stress-induced damage to porcine small intestinal epithelium associated with down regulation of epithelial growth factor signaling. *J. Anim. Sci.* 87:1941–1949. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19213704>

Luo, S., and R. L. Levine. 2009. Methionine in proteins defends against oxidative stress. *FASEB J.* 23:464–472.

Maeda, T., T. Wakasawa, Y. Shima, I. Tsuboi, S. Aizawa, and I. Tamai. 2006. Role of polyamines derived from arginine in differentiation and proliferation of human blood cells. *Biol. Pharm. Bull.* 29:234–239. Available from: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/bpb/29.234?from=CrossRef>

Mahan, D. C., and R. G. Shields. 1950. Essential and Nonessential Amino Acid Composition of Pigs from Birth to 145 Kilograms of Body Weight , and Comparison to Other Studies 1, 2 ABSTRACT :5 3–521.

Marion, J., M. Biernat, F. Thomas, G. Savary, y. Breton, R. Zabielski, I. Le Huerou-Luron y J. Le Dividich. 2002. Small intestine growth and morphometry in piglets weaned at 7 days of age. Effects of level of energy intake. *Reprod Nutr Dev*, 42: 339-354.

Martínez, F. S., G. J. González, J. M. Culebras y M. J. Tuñón. 2003. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria.* 17: 271–278.

Martín-Venegas, R., P. A. Geraert, and R. Ferrer. 2006. Conversion of the methionine hydroxy analogue DL-2-hydroxy-(4- methylthio) butanoic acid to sulfur-containing amino acids in the chicken small intestine. *Poult. Sci.* 85:1932-1938.

- Martín-Venegas, R., M. J. Rodríguez-Lagunas, P. A. Gerard, and R. Ferrer. 2007. Monocarboxylate transporter 1 mediates DL-2- Hydroxy-(4-methylthio) butanoic acid transport across the apical membrane of Caco-2 cell monolayers. *J. Nutr.* 137:49–54.
- Mertz, E. T., W. M. Beeson, and H. D. Jackson. 1952. Classification of essential amino acids for the weanling pig. *Arch. Biochem. Biophys.* 38:121–128. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0003986152900155>
- Moeser, A.J., L.B. Borst, B.L. Overman, and J.S. Pittman. 2012. Defects in small intestinal epithelial barrier function and morphology associated with peri-weaning failure to thrive syndrome (PFTS) in swine. *Res. Vet. Sci.* 93: 975- 982.
- Montagne, L., J.R. Pluske y D.J. Hampson. 2003. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health young-non ruminant animals. *Anim. Feed Sci. Technol.* 108: 95-117.
- Morales, A., Buenabad, L., Castillo, G., Arce, N., Araiza, B.A., Htoo, J.K., and Cervantes, M., 2015. Low protein-amino acid supplemented diets for growing pigs: Effect on expression 50 of amino acid transporters, serum concentration, performance and carcass composition. *J. Anim. Sci.* 93:2154– 2164. doi:10.2527/jas.2014-8834.
- Morales, A., Cota, S.E.M., Ibarra, N.O., Arce, N., Htoo, J.K., Cervantes, M., 2016a. Effect of heat stress on the serum concentrations of free amino acids and some of their metabolites in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 94, 2835–2842.

- Morales, A., Pérez, M., Castro, P., Ibarra, N., Bernal, H., Baumgard, L.H., Cervantes, M., 2016b. Heat stress affects the apparent and standardized ileal digestibilities of amino acids in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 94, 3362–3369.
- Morales, A., Pérez, M., Castro, P., Ibarra, N., Bernal, H., Baumgard, L.H., Cervantes, M., 2016c. Heat stress affects the apparent and standardized ileal digestibilities of amino acids in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 94, 3362–3369.
- Mowat, A.M., y J.L. Viney. 1997. The anatomical basis of intestinal of intestinal immunity. *Immunol Rev.* 156: 145-166.
- Nabuurs, M.K.A., A: Hoogendoorn, E.J. Van Der Molen and A.L.M. Van Osta. 1993. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs reared under various circumstances in the Netherlands *Res Vet Sci*, 55: 78-84.
- National Weather Service Central Region (NWSCR). 1976. Livestock hot weather stress regional operations manual letter C-31-76. National Weather Service Central Region, Kansas City, Missouri, USA.
- Noblet J., Shi, X., & Dubois, S., 1993. Energy cost of standing activity in sows. *Livestock Production Science* 34, 127–136.
- NRC. 2012. Nutrient requirements of swine. 12th ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

- Patience, J. F., J. F. Umboh, R. K. Chaplin, and C. M. Nyachoti. 2005. Nutritional and physiological responses of growing pigs exposed to a diurnal pattern of heat stress. *Livest. Prod. Sci.* 96:205–214. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301622605000436>
- Pearce, S. C., Mani, V., Boddicker, R. L., Johnson, J. S., Weber, T. E., Ross, J. W., Gabler, N. K. (2012). Heat stress reduces barrier function and alters intestinal metabolism in growing pigs. *Journal of Animal Science*, 90(SUPPL4), 257–259. <https://doi.org/10.2527/jas.52339>
- Pearce, S. C., Mani, V., Weber, T.E., Rhoads, R.P., Patience, J.F., Baumgard, L.H., and Gabler, N.K., 2013. Heat stress and reduced plane of nutrition decreases intestinal integrity and function in pigs. *J. Anim. Sci.* 91:5183–5193. doi:10.2527/jas.2013-6759.
- Pearce, S. C., Sanz-Fernandez, M.V., Hollis, J.H., Baumgard, L.H., and Gabler, N.K., 2014. Short-term exposure to heat stress attenuates appetite and intestinal integrity in growing pigs¹. *J. Anim. Sci.* 92:5444–5454. Doi: 10.2527/jas20148407.
- Quiniou, N., J. Noblet, J. van Milgen and S. Dubois. 2001. Modelling heat production and energy balance in group-housed growing pigs exposed to cold or hot ambient temperatures. *Br. J. Nutr.* 85: 97-106.

- Quiniou, N., S. Dubois, and J. Noblet. 2000. Voluntary feed intake and feeding behaviour of group-housed growing pigs are affected by ambient temperature and body weight. *Livest. Prod. Sci.* 63:245–253. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301622699001359>
- Rao AM, Drake MR, Stipanuk MH (1990). Role of the transsulfuration pathway and of gamma-cystathionase activity in the formation of cysteine and sulfate from methionine in rat hepatocytes. *J Nutr*; 120:837-845.
- Reddy, V. Y., P. E. Desorchers, S. V. Pizzo, S. L. Gonias, J. A. Sahakian, R. L. Levine, and S. J. Weiss. 1994. Oxidative dissociation of human alpha 2-macroglobulin tetramers into dysfunctional dimers. *J. Biol. Chem.* 269:4683–4691.
- Renaudeau, D., Kerdoncuff, M., Anai, C., & Gourdine, J. L. (2008). Effect of temperature level on thermal acclimation in Large White growing pigs, 1619–1626. <https://doi.org/10.1017/S1751731108002814>
- Rezaei, R., W. Wang, Z. Wu, Z. Dai, J. Wang, y G. Wu. 2013. Biochemical and physiological bases for utilization of dietary amino acids by young Pigs. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4:7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23445937>
- Romero Alvira D, Bueno Gómez J. Radicales libres del oxígeno y antioxidantes en medicina (Editorial). *Rev Clin Española* 1998; 184(7):345-6.
- SAGARPA 2017. Situación actual y perspectiva de la producción de carne de cerdo en México.

Satriano, J. 2004. Arginine pathways and the inflammatory response: Interregulation of nitric oxide and polyamines: Review article. *Amino Acids* 26:321–329. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00726-004-0078-4>

Sonna, L, A., Fujita, J., Gaffin, S.L., Lilly, C.M., 2002. Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J. Appl. Physiol.* 92, 1725-1742.

Soraci AL, Amanto F, Harkes R, Pérez DS, Martínez G, Dieguez SN, Tapia MO. (2010). Uso estratégico de aditivos: Impacto sobre el equilibrio y salud gastrointestinal del lechón. *Analecta Vet* 30(1): pp.42-53.

Stoll, B., J. Henry, P. J. Reeds, H. Yu, F. Jahoor, and D. G. Burrin. 1998. Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. *J. Nutr.* 128:606–614.

St-Pierre N. R., Cobanov B., y Schnitkey G., (2003). Economic Losses from Heat Stress by US Livestock Industries. *J. Dairy Sci.* 86 :(E. Suppl.):E52–E77.

Van Beers-Schreurs H.M.G., M.J.A. Nabuurs, L. Vellenga, H.J. Kals-beek-van der Valk, T. Wensing and H.J. Breukink. 1998. Weaning and weaning diet influence the villous height and crypt depth in the small intestine of pigs and alter the concentrations of short-chain fatty acids in the large intestine and blood. *J. Nutr.* 128: 947-953.

- Van Milgen, J., and J.-Y. Dourmad. 2015. Concept and application of ideal protein for pigs. *J. Anim. Sci. Biotechnology*. 6:15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25937926>
- Venereo-Gutierrez, J. R. 2002. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana Medicinal Militar*. 31: 126-33.
- Wilson, T. E., & Crandall, C. G. (2012). Effect of Thermal Stress on Cardiac Function, 39(1), 12–17. <https://doi.org/10.1097/JES.0b013e318201eed6>
- Wu, G. 2009. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids* 37:1–17. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00726-009-0269-0>
- Wu, G. 2010. Functional amino acids in growth, reproduction, and health. *Adv. Nutr.* 1:31–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22043449>
- Wu, G., F. W. Bazer, Z. Dai, D. Li, J. Wang, and Z. Wu. 2014. Amino Acid Nutrition in Animals: Protein Synthesis and Beyond. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 2:387–417. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-animal-022513-114113>
- Yen, J. T. (2001). Anatomy of the digestive system and nutritional physiology. *Swine Nutrition*, 2, 31–64. <https://doi.org/doi:10.1201/9781420041842.ch3>
- Yu, J., P. Yin, F. Liu, G. Cheng, K. Guo, A. Lu, X. Zhu, W. Luan, and J. Xu. 2010. Effect of heat stress on the porcine small intestine: A morphological and gene expression study. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 156:119–128.

Zhao, J.B., H.Sha, F.Y. Zhuang and F. Gregersen. 2002. Morphological properties and residual strain along the small intestine in rats. *World Journal of Gastroenterology*. 8: 312-317.