

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Instituto de Ciencias Agrícolas



**ADICIÓN DE METIONINA A DIETAS PARA CERDOS EN
ESTRÉS POR CALOR: EFECTO EN LA ACTIVIDAD
ANTIOXIDANTE E INTEGRIDAD DEL EPITELIO
INTESTINAL**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

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

PRESENTA

BAYRON PÉREZ BUSTILLO

DIRECTORA

DRA REYNA LUCERO CAMACHO MORALES

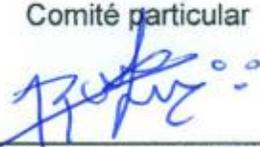
MEXICALI, BAJA CALIFORNIA

AGOSTO DE 2021

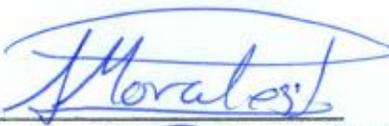
La presente tesis titulada “**Adición de metionina a dietas para cerdos en estrés por calor: efecto en la actividad antioxidante e integridad del epitelio intestinal**” fue realizada por el C. Bayron Pérez Bustillo, dirigida por la **Dra. Reyna Lucero Camacho Morales**, ha sido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

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

Comité particular

Presidente/ 
Director de Tesis **Dra. Reyna Lucero Camacho Morales**

Sinodal 
Dr. Miguel Cervantes Ramirez

Sinodal 
Dra. Adriana Morales Trejo

Sinodal 
Dr. Ernesto Avelar Lozano

Sinodal 
Dra. Nydia Corina Vasquez Aguilar

“POR LA REALIZACIÓN PLENA DEL HOMBRE”

Ejido Nuevo León, Mexicali Baja California, México, agosto de 2021

AGRADECIMIENTOS

A **DIOS** todo poderoso por estar a mi lado en los momentos más difíciles en los que solo él fue capaz de ayudarme a lograr este objetivo, por iluminarme, darme la sabiduría y fortaleza para poder culminar con éxito.

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

Al Instituto de Ciencias agrícolas y a la Universidad Autónoma de Baja California por permitirme realizar mis estudios de maestría.

A mi directora de tesis; Dra. Reyna Lucero Camacho Morales, por el gran apoyo brindado durante todo este proceso, además por sus aportaciones y sugerencias en el desarrollo de mi tesis, muchas gracias.

Al Dr. Miguel Cervantes, por su aporte de cuan gran conocimiento y ejemplo de pedagogía, por quien siento un profundo respeto y gran admiración.

A la Dra. Adriana Morales Trejo, por sus comentarios y sugerencias durante la redacción del presente documento.

Al Dr. Ernesto Avelar Lozano, por su apoyo, amistad y sus sugerencias en la revisión de este documento.

Agradezco de manera especial a la Dra. Nydia Vásquez por su colaboración en las histologías de esta tesis.

Al Dr. Juan González Maldonado y al Dr. Lorenzo Buenabad gracias por su amistad y consejos brindados durante toda mi estancia.

A la Dra. Patricia Carbajal y Dra. Carolina Reyes por haberme apoyado y guiado en todo este proceso, infinitamente gracias por su toda su ayuda.

Al personal administrativo de ICA que me brindó su apoyo, en especial a Sandrita por su trato tan amable y estar siempre al pendiente.

A mis amigos en especial a Jazmín Perez, Verónica Sánchez, Susana Barrales, Marlon Oyuela, Cristian Ponce y Ariel Pastrana, gracias por todo su apoyo y mensajes de ánimos que fueron muy importantes en este proceso.

DEDICATORIA

A DIOS TODO PODEROSO porque sin su ayuda nada es posible, por darme la fuerza necesaria para salir adelante y poder cumplir mis sueños, brindándome la sabiduría y la paciencia para afrontar todos los obstáculos que la vida me presenta y sobre todo darme la salud y el apoyo de mi maravillosa familia.

Dedico esta tesis a mis padres **ALTAGRACIA BUSTILLO LÓPEZ y MONICO PÉREZ**, que están siempre apoyándome incondicionalmente tanto en mi formación personal como profesional para llegar a ser la persona de hoy en día. Por el inmenso y muy valioso apoyo brindado durante toda mi vida, gracias por sus llamadas con sabios consejos brindados diariamente, darme ánimo y la fuerza necesaria para poder continuar con mis objetivos propuestos.

A MIS QUERIDO HERMANOS MARCIA, BELKY, FRANCIA, GERSON, ISAIAS GABRIELA Y ARONY PÉREZ BUSTILLO. Por compartir conmigo momentos de alegría y de tristezas por escucharme y estar siempre disponibles para ayudarme aún en la distancia.

A todos mis demás familiares, **ABUELO, TÍOS, PRIMOS, MADRINA** que de una u otra forma me apoyaron y estuvieron conmigo, sus mensajes y llamadas fueron de gran importancia en todo momento y quisieron de todo corazón desearme siempre lo mejor.

Mis palabras no bastarían para agradecerles su apoyo, comprensión y consejos en los momentos más difíciles.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA	v
ÍNDICE DE CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	2
III. OBJETIVOS	3
3.1 General	3
3.2 Específicos	3
VI. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1 Estrés por calor	4
4.2 Efectos del estrés por calor en la producción animal	4
4.3 Anatomía y fisiología intestinal del cerdo	6
4.4 Efectos del estrés oxidativo a nivel celular	9
4.5 Antioxidantes	12
4.6 Enzimas antioxidantes y mecanismos de acción	14
4.7 Función antioxidante de la metionina	19
V. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1 Lugar de estudio	22

5.2. Animales y manejo experimental	22
5.3 Dietas y tratamientos experimentales.....	23
5.4 Recolección de muestras	24
5.5 Análisis enzimático	25
5.6 Análisis histomorfológico.....	28
5.7 Análisis estadístico	30
VI. RESULTADOS	31
6.1 Variables ambientales	31
6.2 Variables fisiológicas	33
6.3 Variables enzimáticas	34
6.4 Variables histológicas.....	38
VII. DISCUSIÓN	44
VIII CONCLUSIÓN	52
IX. LITERATURA CITADA	53

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Antioxidantes enzimáticos, localización celular y mecanismos de acción	13
Cuadro 2. Composición de ingredientes de las dietas experimentales *	24
Cuadro 3. Concentración de enzimas antioxidantes en suero de cerdos en crecimiento alimentados con diferentes niveles de metionina en condiciones de EC y TN.	37
Cuadro 4. Morfología del intestino delgado de cerdos en crecimiento alimentados con diferentes niveles de metionina en condiciones de EC y TN.	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de la pared y epitelio intestinal (Adaptado de Yen, 2000).....	8
Figura 2. Producción de radicales libres como resultado del estrés por calor (Slimen et al., 2016).....	11
Figura 3. Tipos de especies reactivas de oxígeno (ROS) y antioxidantes para contrarrestarlos (Harris y De Nicola, 2020).....	14
Figura 4. Esquema del ensayo de superóxido dismutasa (Ukeda et al., 1999). ...	26
Figura 5. Esquema del reciclaje glutatión (Rahman et al., 2006).....	28
Figura 6. Sitios histológicos y su localización en el intestino delgado utilizado para análisis morfométricos (De Conto et al., 2010).....	29
Figura 7. Temperatura ambiente (°C) y humedad relativa (%) en la sala de los cerdos en condiciones de EC	31
Figura 8. Temperatura ambiente (°C) y humedad relativa (%) en la sala de los cerdos en condiciones de TN	32
Figura 9. Índice de temperatura y humedad (ITH) en la sala de los cerdos en condiciones de EC	32
Figura 10. Temperatura corporal e intestinal (°C) de los cerdos en EC	33
Figura 11. Comparación de la temperatura corporal (°C) de los cerdos en EC y TN	33
Figura 12. Frecuencia respiratoria por minuto de los cerdos en condiciones EC y TN. Contrastes: C1, TN100 vs EC 100; C2, EC100 vs promedio de EC120, EC140 y EC160; C3, TN100 vs promedio de EC120, EC140 y EC160;.....	34
Figura 13. Actividad enzimática de SOD en suero de cerdos en condiciones de EC y TN (Q: P=0.05; C1: TN100 vs EC100: P<0.05; C3: TN100 vs EC120-160: P<0.05).	35
Figura 14. Actividad enzimática de GPX en suero de cerdos en condiciones de EC y TN (L: P=0.05).....	35
Figura 15. Actividad enzimática de CAT en suero de cerdos en condiciones de EC y TN (L: P<0.05; C1: TN100 vs EC100: P<0.05; C2: EC100 vs EC120-160: P<0.05).	36

Figura 16. Actividad enzimática de GSH en suero de cerdos en condiciones de EC y TN (C1: EC100 vs EC120-160: P<0.05; C2: TN100 vs EC120-160: P<0.05).	37
Figura 17. Altura de las vellosidades intestinales de los diferentes segmentos de los cerdos en crecimiento alimentados con diferentes niveles de metionina en condiciones de EC y TN (C1: TN100 vs EC100: P<0.05; C2: EC100 vs EC120-160: P<0.05; C3: TN100 vs EC120-160: P<0.05).	39
Figura 18. Profundidad de las criptas intestinales de los diferentes segmentos de los cerdos en crecimiento alimentados con diferentes niveles de metionina en condiciones de EC y TN (C1: TN100 vs EC100: P<0.05; C3: TN100 vs EC120-160: P<0.05).	40
Figura 19. Relación altura de vellosidad: profundidad de cripta de los diferentes segmentos de los cerdos en crecimiento alimentados con diferentes niveles de metionina en condiciones de EC y TN (L: P<0.05).	41
Figura 20. Cambios morfológicos en los segmentos del intestino delgado de los cerdos alimentados con diferentes niveles de metionina en condiciones de EC y TN.	43

LISTA DE ABREVIATURAS

EC	Estrés por calor
TN	Termo neutral
TC	Temperatura corporal
TI	Temperatura intestinal
ROS	Especies reactivas de oxígeno
CA	Consumo de alimento
FR	Frecuencia respiratoria
TA	Temperatura ambiente
HR	Humedad relativa
ITH	Índice de temperatura y humedad
AA	Aminoácidos
Met	Metionina
Cys	Cisteína
Glu	Glutamato
Gly	Glicina
MHA	Hidroxianálogo de metionina
SOD	Superóxido dismutasa
SOD-Mn	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
SOD-Cu	Superóxido dismutasa dependiente de cobre
SOD- Zn	Superóxido dismutasa dependiente de zinc
GPX	Glutación peroxidasa
GPX-C	Glutación peroxidasa intracelular
GPX-P	Glutación peroxidasa extracelular
GPX-PH	Glutación peroxidasa para fosfolipoperóxidos
CAT	Catalasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidado

ATP	Adenosina trifosfato
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
O ₂ ^{•-}	Radical superóxido
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
OH [•]	Radical hidroxilo
O ₂	Oxígeno
H ₂ O	Agua
IMT	Iones metales de transición
Mn	Manganeso
Cu	Cobre
Zn	Zinc
Se	Selenio
Fe ²⁺	Ion ferroso
Fe ³⁺	Ion férrico
Fe-S	Hierro-azufre
SH	Grupo tiol
ROO [•]	Radical piróxilo
L-OOH	Lipoperóxido
PHL-OOH	Fosfolipoperóxidos
ONOO ⁻	Peroxinitrito
NO	Óxido nítrico
L [•]	Radical lipídico
BHT	Butilhidroxitolueno
BHA	Butilhidroxianisol
TBHQ	Terc-butilhidroquinona
PRDX	Peroxiredoxinas
SAH	S-adenosil homosisteina
SAM	S-adenosil metionina
PBS	Buffer de fosfato salino

RESUMEN

La temperatura ambiental por encima de la temperatura termo neutral provoca estrés por calor (EC) en los animales. A consecuencia del EC se han evidenciado cambios en la digestión y absorción de nutrientes, así mismo daño en el epitelio del intestino delgado que afecta el rendimiento de los cerdos. Metionina (Met) podría mejorar las características y funciones del epitelio intestinal de cerdos en EC a través del aumento en la actividad de enzimas antioxidantes. En esta investigación se evaluó el efecto de la suplementación con DL-Met libre a dietas para cerdos en EC sobre la actividad de enzimas antioxidantes y características de la integridad del epitelio intestinal. Se emplearon 60 cerdos de 23.0 kg de peso corporal inicial promedio, asignados a cinco tratamientos: TN100, termo neutral, dieta con 100% DL-Met; EC100, estrés por calor, dieta con 100% DL-Met; EC120, estrés por calor, dieta con 120% DL-Met; EC140, estrés por calor, dieta con 140% DL-Met; EC160, estrés por calor dieta con 160% DL-Met. En el día 18 se colectaron muestras de sangre y en el día 21 los cerdos fueron sacrificados y se recolectaron muestras del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon). Todos los cerdos recibieron agua y alimento ad libitum. Para los cerdos en EC con adición de Met la actividad enzimática de superóxido dismutasa y glutatión presentaron tendencias cuadráticas ($P \leq 0.05$), mientras que la actividad de glutatión peroxidasa mostró una disminución lineal ($P \leq 0.05$). Sin embargo, la actividad enzimática de catalasa mostró un incremento lineal ($P < 0.05$). A nivel intestinal los cerdos en EC con adición de Met presentaron mayor altura de vellosidad en íleon ($P < 0.05$) y la profundidad de criptas solamente se vio afectada en yeyuno ($P < 0.05$), sin embargo, fue el único segmento que mostró una respuesta lineal ($P < 0.05$) en la relación altura de vellosidad: profundidad de cripta. En conclusión, la suplementación de Met afecta la actividad de enzimas antioxidantes y puede ayudar a mantener la integridad del epitelio de intestino delgado.

Palabras clave: Estrés por calor, metionina, enzimas, antioxidantes, epitelio intestinal

ABSTRACT

The ambient temperature above the thermo neutral temperature causes heat stress (HS) in the animals. As a consequence of HS, changes in the digestion and absorption of nutrients have been evidenced, as well as damage to the epithelium of the small intestine that affects the performance of pigs. Methionine (Met) could improve the characteristics and functions of the intestinal epithelium of pigs in HS through the increase in the activity of antioxidant enzymes. In this investigation, the effect of supplementation with free DL-Met to diets for pigs in HS on the activity of antioxidant enzymes and characteristics of the integrity of the intestinal epithelium was evaluated. 60 pigs of 23.0 kg of average initial body weight were used, assigned to 5 treatments: TN100, thermo neutral, diet with 100% DL-Met; HS100, heat stress, 100% DL-Met diet; HS120, heat stress, 120% DL-Met diet; HS140, heat stress, 140% DL-Met diet; HS160, heat stress diet with 160% DL-Met. On day 18 blood samples were collected and on day 21 the pigs were sacrificed and samples of the small intestine (duodenum, jejunum and ileum) were collected. All pigs received food and water ad libitum. For pigs in HS with Met addition, the enzymatic activity of superoxide dismutase and glutathione showed quadratic trends ($P \leq 0.05$), while the glutathione peroxidase activity showed a linear decrease ($P \leq 0.05$). However, the enzymatic activity of catalase showed a linear increase ($P < 0.05$). At the intestinal level, the pigs in HS with the addition of Met presented greater villus height in the ileum ($P < 0.05$) and the crypt depth was only affected in the jejunum ($P < 0.05$), however, it was the only segment that showed a linear response ($P < 0.05$) in the villus height: crypt depth ratio. In conclusion, Met supplementation affects the activity of antioxidant enzymes and may help to maintains the integrity of the small intestinal epithelium.

Key words: Heat stress, methionine, enzymes, antioxidants, intestinal epithelium

I. INTRODUCCIÓN

La producción animal en el norte de México es afectada durante la época de verano, ya que la temperatura ambiental sobrepasa los 30°C alcanza los 50°C. Esta temperatura está por encima del umbral de tolerancia de cerdos en crecimiento 18-22°C (Huynh et al., 2005) que, en consecuencia, provoca estrés por calor (EC). En los animales, el EC se caracteriza por un aumento en la temperatura corporal, frecuencia respiratoria (Pearce et al., 2014), flujo sanguíneo hacia la periferia, bajo consumo de alimento (Morales et al. 2019) y reducción en la altura de las vellosidades intestinales (Yu et al., 2010), todo esto se asocia con una mayor producción de especies reactivas de oxígeno ROS y estrés oxidativo (Liu et al., 2009).

Metionina (Met), es un aminoácido esencial y tercer limitante en las dietas para cerdos que debe suministrarse en cantidades adecuadas para optimizar el rendimiento (Shoveller et al., 2010). Met tiene muchas funciones biológicas, incluyendo metabolismo de proteínas, metilación del ADN, síntesis de cisteína y como componente principal del sistema antioxidante (Tesseraud et al., 2008), a través de glutatión y precursor de taurina y creatina (Bin et al., 2017). Met actúa como un antioxidante directo ya sea libre o como parte de las proteínas de las mitocondrias (Schindeldecker y Moosmann, 2015). La importancia de Met en la producción animal requiere una investigación más profunda sobre su papel en la respuesta antioxidante (Wang et al., 2019).

Es importante corregir la deficiencia en el consumo de Met incrementando el contenido de esta en las dietas, ya que esta pudiera ayudar a mitigar los efectos negativos causados por el EC en los cerdos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de diferentes niveles de metionina a dietas para cerdos en estrés por calor, efecto en la actividad antioxidante e integridad del epitelio intestinal.

II. HIPÓTESIS

El uso de metionina libre en dietas para cerdos en estrés por calor puede contrarrestar el impacto de los radicales libres a través del aumento en la actividad de enzimas antioxidantes y mejorar la integridad del epitelio intestinal

III. OBJETIVOS

3.1 General

Evaluar el efecto de la adición de metionina, en la actividad antioxidante e integridad del epitelio intestinal de cerdos en estrés por calor.

3.2 Específicos

Analizar condiciones ambientales (temperatura ambiente, humedad relativa e índice de temperatura-humedad) en las que se llevó a cabo este trabajo.

Analizar las constantes fisiológicas (frecuencia respiratoria, temperatura corporal e intestinal) de los cerdos en estrés por calor y termoneutralidad.

Analizar la actividad de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa y glutatión) en suero de cerdos, en estrés por calor y termoneutralidad, con diferentes niveles de metionina.

Determinar las características de la integridad del epitelio intestinal de los cerdos en estrés por calor y termoneutralidad con diferentes niveles metionina.

VI. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Estrés por calor

El estrés por calor (EC) se ha definido como una serie de alteraciones en la fisiología, metabolismo y comportamiento de animales expuestos a una alta temperatura ambiente (Huynh et al., 2005). El EC es un término que se utiliza para describir una serie de condiciones que atentan con la salud y bienestar del organismo (Horowitz y Robinson, 2007). El EC es el resultado de un equilibrio negativo entre la cantidad neta de energía que fluye del animal al entorno que lo rodea y la cantidad de energía térmica producida por el animal (St-Pierre et al., 2003). Combatir los efectos del EC es metabólicamente costoso para la producción animal (Cottrell et al., 2015) debido a que para adaptarse a estas condiciones, los animales incrementan su frecuencia respiratoria (Manno et al., 2006) y reducen su consumo de alimento (Morales et al., 2019).

El EC disminuye el rendimiento de los animales principalmente en la reducción del apetito, aunque otros factores involucrados en la disponibilidad celular de nutrientes también pueden contribuir a esta disminución (Morales et al., 2014). A consecuencia del calentamiento global se requieren estudios para evaluar los efectos del EC en animales como también en los seres humanos, involucrando no solo el aspecto productivo, sino también a nivel fisiológico y de salud, todo ello con el objetivo de establecer medidas y soluciones de manejo adecuadas para reducir el problema (Álvarez, 2014).

4.2 Efectos del estrés por calor en la producción animal

El EC afecta la producción animal incrementando los costos en el cuidado, manejo y salud de los animales; los animales expuestos a una elevada temperatura ambiental modifican su fisiología para mantener su temperatura corporal y superar el estrés, lo que implica un desafío para la producción animal en todo el mundo (Temple et al., 2015).

Además de las altas temperaturas, existen otros factores ambientales que causan estrés en los animales como por ejemplo la intensa radiación directa y la humedad que causan efectos negativos en el consumo de alimento, ganancia de peso, conversión alimenticia y rendimiento productivo de los animales (Roca, 2011).

La producción de cerdos en países como Estados Unidos, Brasil, Australia, ciertos países de Europa y en otros países, ha causado pérdidas económicas considerables porque se encuentran alojados en condiciones donde la temperatura ambiente es más elevada que la temperatura ideal (termo neutral) para los cerdos 18-22°C (St-Pierre et al., 2003). La exposición de los cerdos a altas temperaturas ambientales ocasiona EC, lo que modifica su comportamiento, fisiología y metabolismo para preservar la homeostasis (Morales et al., 2016c).

A nivel fisiológico el sistema nervioso es el responsable de dar respuesta al EC permitiendo la termorregulación del cerdo, ya que las neuronas son sensibles a los cambios de temperatura que se encuentran localizadas en el hipotálamo (Downing y Miyan, 2000). Dichas neuronas son las responsables de desencadenar los procesos fisiológicos para disipar el exceso de calor (Troy et al., 2010).

El aumento del flujo sanguíneo hacia la piel y las extremidades, ayuda a recupera el estado normotérmico, para posteriormente continuar con la disipación del calor mediante respiraciones fuertes y rápidas y luego la pérdida del calor por medio de evaporación (Manteca, 2012). La vasodilatación es la primera respuesta del EC (Ooue et al., 2007). Los cerdos poseen glándulas sudoríparas queratinizadas, por lo cual no son una vía de disipación del calor. Por tanto, debe emplear otras vías, como la redirección del flujo sanguíneo hasta la periferia (Alarcón et al., 2007).

El EC aumenta la muerte de las células intestinales en los cerdos ya que disminuye el suministro de oxígeno y nutrientes al tracto gastrointestinal y a su vez causa estrés oxidativo en el epitelio intestinal, lo que puede elevar la pérdida

intestinal endógena de proteínas y AA (Morales et al., 2016c). Afectando la composición y distribución de la microflora, que en consecuencia favorece en mayor parte a la proliferación de microorganismos patógenos y brotes de enfermedades llegando a ocasionar la muerte (Liu et al., 2009).

4.3 Anatomía y fisiología intestinal del cerdo

El intestino delgado es el órgano más importante en la absorción de nutrientes, este se divide en tres porciones, duodeno, yeyuno e íleon; en cerdos al finalizar la etapa de crecimiento, su intestino delgado mide entre 16 a 21 m de largo, de los cuales 4 a 5% es duodeno, 88 a 91% de yeyuno y 4 a 5% de íleon (Yen, 2000).

En el duodeno es el sitio en donde se mezcla la digesta del estómago con las secreciones del intestino, hígado y el páncreas; en seguida la bilis se canaliza en el duodeno en una papila de 2 a 5 cm del píloro del estómago, posteriormente el jugo pancreático entra en el intestino en una papila de 12 a 20 cm después de la entrada de la bilis (Kong et al., 2018). El yeyuno es la sección más larga contiene pliegues circulares y vellosidades que permiten la absorción de los nutrientes; el último segmento es el íleon que se identifica a partir por sus capas musculares ligeramente más gruesas y por estar unido con el intestino grueso (Yen, 2000). En la pared del intestino delgado se encuentran cuatro capas: la mucosa que se subdivide en tres subcapas, la muscular de la mucosa, lámina propia y epitelio, la lámina propia está compuesta de vasos sanguíneos, linfocitos libres, nódulos linfáticos (parches de Peyer) y neuronas unidas por tejidos conectivos, la segunda capa es la submucosa, en seguida la muscular y en como ultima se encuentra la serosa. (Yen, 2000).

La capa mucosa participa en los procesos de digestión y absorción de nutrientes (Soraci et al., 2010), como también de barrera fisicoquímica, metabólica e inmunológica contra la entrada de toxinas, macromoléculas y microorganismos al organismo, además conforma el revestimiento interno del intestino delgado y presenta una serie de pliegues o vellosidades intestinales que forman proyección

de la mucosa, con dirección a la luz del intestino delgado se pueden encontrar unas aberturas llamadas criptas cuya principal función es dar origen a las células que se encuentran en las vellosidades así como también la absorción de nutrientes previamente digeridos (Junqueira et al., 2016).

Existen cuatro tipos de células epiteliales en la superficie de las vellosidades: células absorbentes o enterocitos, células caliciformes, encargadas de la producción de mucina para la protección de las paredes intestinales, células de paneth (Plitzner et al., 2008) y células enteroendocrinas (Yen, 2000). Todas ellas proceden de las células madre que se ubican en la base de las criptas; los enterocitos están conformados de microvellosidades que hacen frente a la luz del intestino para favorecer la absorción de nutrientes y se encuentran cubiertos de una membrana apical; la membrana basolateral es la parte de la membrana de los enterocitos que no se tiene contacto con el luz del intestino (Yen, 2000).

Las criptas y las vellosidades están cubiertas por una capa continua de células epiteliales llamadas enterocitos, dispuestas en forma de dedos en combinación con las células enteroendocrinas, paneth y caliciformes; la morfología del epitelio cambia a medida avanza el del tracto gastrointestinal, aunque básicamente presenta una región de criptas (que se localizan las células madres y paneth que cumplen con la función de defensa) en la región apical (vellosidades) se encuentran las células bien diferenciadas (Soraci et al., 2010).

Los enterocitos emigran de las criptas hacia la punta de las vellosidades y son descamados en el lumen, este proceso aumenta su velocidad en cerdos en condiciones de estrés por calor, cuando las células epiteliales alcanzan la madurez mueren y son liberadas al lumen intestinal; el recambio de las célula presentes en las vellosidades del epitelio intestinal en los cerdo ocurre de manera rápida, aproximadamente entre 2 a 5 días (Soraci et al., 2010).

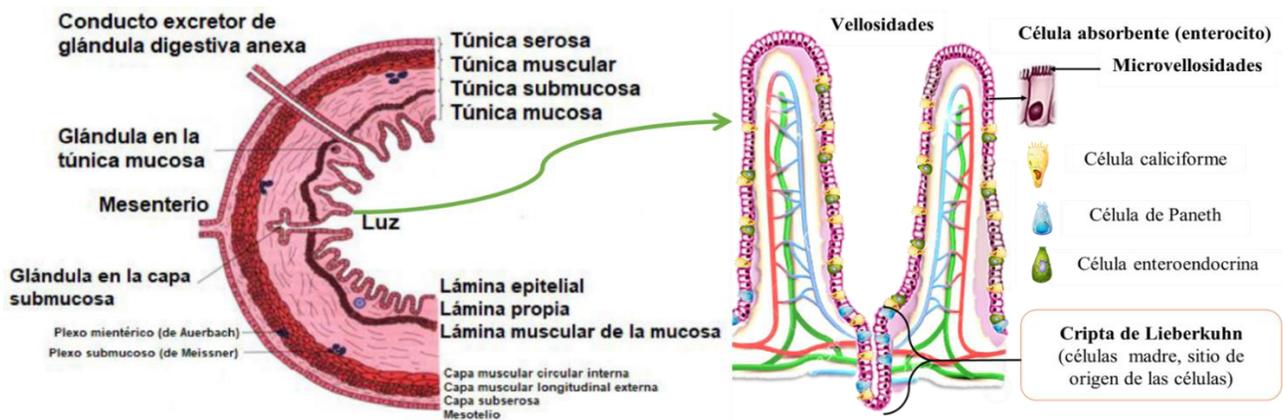


Figura 1. Estructura de la pared y epitelio intestinal (Adaptado de Yen, 2000).

En el proceso que los enterocitos migran, experimentan una maduración tanto estructural como funcional, esto para favorecer el alargamiento de las microvellosidades, en seguida estos migran hacia la tercera parte de las vellosidades y se completa su diferenciación estructural y comienzan a realizar su función digestiva; la absorción de nutrientes es la principal función de los enterocitos y esta comienza a medida que estos logran llegar hasta la parte media o final de las vellosidades y finaliza cuando los enterocitos se desprenden de la punta de la vellosidad (Yen, 2000).

La capa submucosa es una capa del tejido conectivo fibroso que permite mantener unidos los vasos sanguíneos, los vasos linfáticos y los complejos neurales; en los primeros centímetros del duodeno la capa submucosa está fuertemente formada de glándulas submucosas intestinales (glándulas de Brunner), el número de glándulas de Brunner disminuye a partir de entonces, las glándulas de Brunner secretan un abundante líquido alcalino (iones bicarbonato, glicoproteínas y pepsinógeno) que se conduce desde la submucosa por medio de la capa muscular en dirección a las aberturas localizadas en las células del epitelio en las criptas de las vellosidades (Yen, 2000).

La capa muscular de la pared del intestino es la responsable de la contractilidad, contiene dos capas de musculo liso: una capa interna circular y una capa externa longitudinal dispuestas en un patrón helicoidal, por otro lado, la última capa es la serosa, está conformada por un epitelio escamoso que tiene el mesenterio de soporte contiene el tejido conectivo, los vasos sanguíneos grandes y los nervios, formada de una sola capa de células mesoteliales (Yen, 2000).

La pérdida en la integridad de las vellosidades, y el acortamiento y cambios de forma de las vellosidades intestinales, son alteraciones causadas en la morfología de la mucosa intestinal en los cerdos en condiciones de EC, y por tanto un número reducido de células absorbentes y menor expresión de transportadores de nutrientes, que pueden afectar la absorción de aminoácidos y otros nutrientes ofrecidos en la dieta (Yu et al., 2010).

4.4 Efectos del estrés oxidativo a nivel celular

El EC aumenta la concentración de radicales libres que se encuentran estables, lo que resulta en daño oxidativo tanto celular como mitocondrial en los animales. (Slimen et al., 2016). Además, el EC redistribuye los componentes corporales como la grasa, la energía y las proteínas, alterando el metabolismo postabsortivo (Cervantes y Córdova, 2018). El estrés oxidativo es el resultado de un disturbio en el equilibrio de las concentraciones de pro-oxidantes y antioxidantes, dando lugar a la sobreproducción de radicales libres, especies reactivas de oxígeno (ROS), y disminución de las defensas antioxidantes (Ganaie et al., 2013).

El EC es responsable de inducir estrés oxidativo durante el verano en la producción animal (Ganaie et al., 2013; Nisar et al., 2013). La exposición al calor aumenta la producción de ROS e induce estrés oxidativo, que puede conducir a citotoxicidad; se ha sugerido que el EC es similar al estrés oxidativo esto se debe a su correspondencia en la expresión genética, p. ej., proteínas de choque térmico y enzimas antioxidantes, después de la exposición al calor (Archana et al., 2017).

El aumento en la actividad de las enzimas antioxidantes ocurre con: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX); el incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes es la respuesta a los altos niveles de ROS para mantener las concentraciones en un estado estacionario de los radicales libres; estudios realizados en cabras Marwari muestran que los antioxidantes endógenos, tales como glutatión, vitaminas (E, C y A) y β - Caroteno disminuyen durante los ambientes cálidos y frío (Kumar et al., 2011; Gupta et al., 2013).

La cadena respiratoria mitocondrial es el principal sitio de formación de ROS; el EC agudo provoca un aumento en la concentración de ROS en las mitocondrias musculares; el aumento en la oxidación del sustrato, la desregulación del desacoplamiento de proteínas y la depresión en la actividad de la cadena respiratoria mitocondrial dañan la membrana interna y el ADN (Mujahid et al., 2007).

El estrés por calor conduce a una sobreproducción de iones de metales de transición (IMT) al aumentar la tasa de liberación de hierro de la ferritina, los IMT puede ceder electrones al oxígeno, formando anión superóxido y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Freeman, Spitz, y Meredith, 1990; Agarwal y Prabakaran, 2005). El oxígeno O_2 es altamente reactivo, precursor de la mayoría de las ROS y un mediador en las reacciones oxidativas en cadena H_2O_2 se reduce aún más al extremadamente reactivo radical hidroxilo (OH) a través de la reacción de Fenton (Liochev y Fridovich, 1999).

Las ROS también son generadas por la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa) al convertir NADPH a $NADP^+$ (Segal y Abo, 1993). El estrés por calor activa la NADPH oxidasa y aumenta la relación $NADP^+/NADPH$; los aumentos incontrolados en las concentraciones de ROS conducen a una serie de efectos en cadena ocasionados por ROS que atacan simultáneamente a las proteínas (Stadtman y Levine, 2000), los fosfolípidos (Rubbo

et al., 1994), polisacáridos (Harparkash y Barry, 1994) y ácido desoxirribonucleico (ADN) (LeDoux et al., 1999).

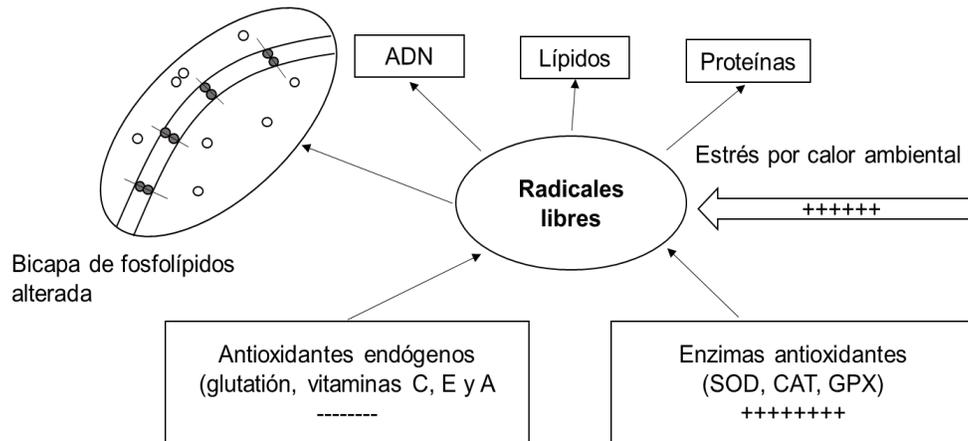


Figura 2. Producción de radicales libres como resultado del estrés por calor (Slimen et al., 2016).

El estrés por calor aumenta la producción de radicales libres Figura 1. En consecuencia, los antioxidantes endógenos y las enzimas antioxidantes se movilizan para contrarrestar los radicales producidos, cuando el sistema antioxidante no logra mantener la concentración en estado estable de las especies oxidantes, se dañan las membranas, los lípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos (Slimen et al., 2016).

Aunque las mitocondrias no son el único compartimento celular responsable de la producción de ROS, pero aseguran la mayor parte de la producción de las ROS, cuando se altera la concentración de ROS que se encontraban estables, las mitocondrias son el primer compartimento celular que se daña; reportes en literatura indican que la alteración del nivel de producción de ROS en estado estacionario induce la inactivación de la cadena respiratoria, a través de la oxidación de los complejos I, II, IV y V (England et al., 2004). Por lo tanto, el flujo de electrones se

reduce y la síntesis de adenosina trifosfato (ATP) disminuye; como resultado, la regulación negativa de la producción energética, debido a la alteración de la vía de fosforilación oxidativa (Zhao et al., 2006).

4.5 Antioxidantes

Los antioxidantes son moléculas que inhiben o apagan las reacciones de los radicales libres retrasando o inhibiendo el daño celular; los antioxidantes pueden clasificarse de acuerdo a diferentes criterios; no obstante, generalmente se dividen como enzimáticos y no enzimáticos (Mehta y Gowder, 2015). Los antioxidantes enzimáticos son el principal recurso antioxidante de los diferentes tejidos de los animales y, de manera sinérgica, catalizan diferentes reacciones que impiden la peroxidación lipídica de las membranas celulares al reducir la concentración de H_2O_2 (Balasaheb y Pal, 2015).

La producción de ROS ocurre continuamente en todas las células como parte de la función celular normal, no obstante, el incremento en la producción de ROS que se originaron de fuentes internas o externas podría desempeñar un papel en muchas enfermedades; los antioxidantes inhiben el daño ocasionado por los radicales libres al prevenir la formación de radicales, eliminarlos y promover su descomposición (Young y Woodside, 2001).

Por otra parte, los antioxidantes no enzimáticos son compuestos endógenos y exógenos que interrumpen la peroxidación al interactuar con los radicales peroxilos (LOO^{\bullet}), así como al ejercer su acción quelante sobre los iones metálicos (Kumar et al., 2015). Dependiendo de su origen, los antioxidantes no enzimáticos pueden ser sintéticos o naturales (Mehta y Gowder, 2015).

El primer grupo lo conforman compuestos como el butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA), terc-butilhidroquinona (TBHQ) y etoxiquina (EQ), antioxidantes que se caracterizan por ser eficaces contra la peroxidación *in vivo* y

post mortem (Salami et al., 2016). Sin embargo, debido a que han sido asociados con una actividad promotora de tumores en el consumidor final, su uso en animales de producción está siendo restringido (Błaszczyk et al., 2013).

Cuadro 1. Antioxidantes enzimáticos, localización celular y mecanismos de acción

Antioxidantes	Localización celular	Sustrato	Reacción
SOD Mn/Cu/Zn	Mitocondria y citosol	O ₂	O ₂ → H ₂ O ₂
GPX	Citosol y extracelular	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ +GSH→GS-SG+ H ₂ O
Catalasa	Peroxisomas	H ₂ O ₂	2H ₂ O ₂ → O ₂ + 2H ₂ O
Peroxiderroxina	Citosol	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ +TrxS ₂ →Trx(SH) ₂ + H ₂ O

SOD= superóxido dismutasa; GPX= glutatión peroxidasa; O₂= superóxido; H₂O₂= peróxido de hidrógeno; O₂= oxígeno; H₂O= agua; GSH= glutatión reducido; GS-SG= glutatión oxidado; TrxS₂= tiorredoxina disulfuro; Trx (SH)₂= tiorredoxina disulfidrilo (Balasaheb y Pal, 2015).

Por su parte, los antioxidantes no enzimáticos naturales, son metabolitos secundarios (flavonoides y vitaminas A, B y C) o compuestos estructurales de las células vegetales (carotenoides e hidroxicinamatos (Balasaheb y Pal, 2015), que actúan reduciendo la producción de ROS o incrementando su eliminación (Kumar et al., 2015). Uno de los principales inconvenientes que presentan los antioxidantes naturales es su insuficiente concentración en la dieta animal.

La presencia biológica activa de las vitaminas C y E, así como también del glutatión, conforman antioxidantes de alta calidad reductora, actuando cada uno en sus escenarios biológicos, para equilibrar las ROS mediante su atracción para posteriormente reducirlo (Benítez, 2006).

4.6 Enzimas antioxidantes y mecanismos de acción

Las ROS son producidas por una variedad de eventos fisiológicos y no fisiológicos, incluida la reacción de Fenton, la respiración celular, las disfunciones mitocondriales, las patologías, los fagocitos, los neutrófilos y el estrés; sin embargo, los sistemas celulares de desintoxicación eliminan fácilmente las bajas concentraciones de ROS y radicales libres activando antioxidantes endógenos como SOD, CAT, GSH peroxidasa y GSH reductasa (Freitas et al., 2016).

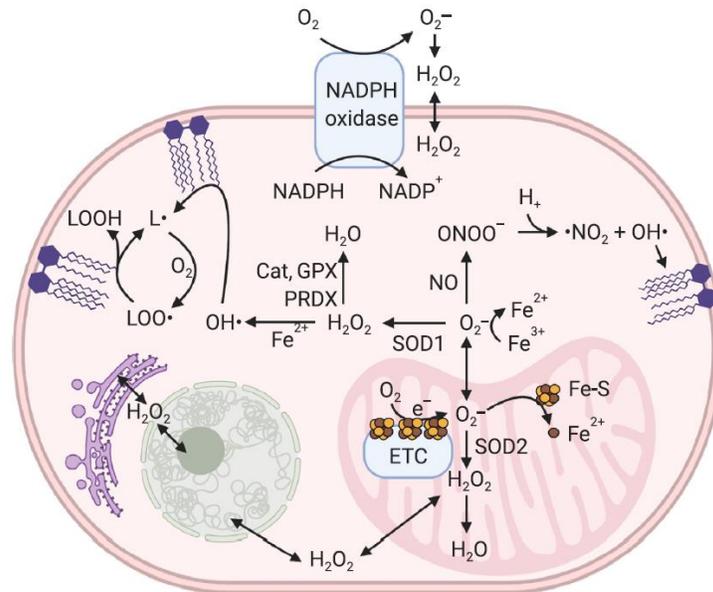


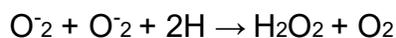
Figura 3. Tipos de especies reactivas de oxígeno (ROS) y antioxidantes para contrarrestarlos (Harris y De Nicola, 2020).

El superóxido (O_2^-) se produce extracelularmente por la NADPH oxidasa o intracelularmente por la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Figura 3), en las mitocondrias se dirige a los grupos de hierro-azufre (Fe-S) para liberar hierro (Fe^{2+}) y reduce el hierro férrico (Fe^{3+}) a hierro ferroso (Fe^{2+}); el O_2^- es dismutado en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por las superóxido dismutasa (SOD1, SOD2); el H_2O_2 se difunde a través de las membranas para reaccionar con las proteínas y el ADN y es desintoxicado en agua por las peroxidasa celulares [catalasa (Cat), glutatión peroxidasa (GPX), peroxiredoxinas (PRDX)]; O_2^- produce peroxinitrito ($ONOO^-$) a través de una reacción con óxido nítrico (NO), por otra parte el radical peroxilo ($OH\cdot$)

se forma a partir de la reacción de H_2O_2 con Fe^{2+} y la descomposición de ONOO^- e inicia la cascada de peroxidación lipídica; primero, $\text{OH}\cdot$ reacciona con lípidos para formar radicales lipídicos ($\text{L}\cdot$), que reaccionan con el oxígeno para formar radicales lípidos peróxido ($\text{LOO}\cdot$), esta reacciona con lípidos para reformar $\text{L}\cdot$ más peróxidos lipídicos (LOOH) y el ciclo continúa.; la peroxidación lipídica excesiva conduce a la ferroptosis (Harris De Nicola, 2020).

Superóxido dismutasa SOD

Superóxido oxidoreductasa (EC 1.15.1.1) son una familia de enzimas que realizan la dismutación del anión superóxido (O_2^-) en oxígeno molecular (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), importantes como mecanismo de defensa antioxidante celular; el peróxido de hidrógeno resultante debe eliminarse mediante catalasa o glutatión peroxidasa, SOD está formada por un grupo de enzimas metaloides, esto significa que dependen estrictamente de la presencia de minerales como el zinc (Zn), cobre (Cu), y manganeso (Mn), que actúan como catalizadores para su síntesis (Venereo, 2002).



Esta familia está formada por tres tipos, las cuales se localizan en lugares bien específicos, una extracelular y dos dentro de la célula (Wang et al., 2018); la primera es una SOD que contiene en su sitio activo iones de Cu y Zn (SOD 1 o SOD-Cu/Zn) se ubica en el citoplasma, núcleo y membrana externa de la mitocondria, la segunda enzima está ubicada cerca de la membrana interna mitocondrial, esta es una SOD que contiene Mn en su centro catalítico (SOD 2 o SOD-Mn); y finalmente existe una más, la cual se localiza fuera de la célula y está asociada a la matriz extracelular; al igual que la primera SOD, ésta tiene asociado un Cu y un Zn (SOD 3 o SOD-EC; García, 2002).

Las tres cumplen con la misma actividad catalítica, sin embargo presentan diferencias notorias en su estructura y organización (Gomez y Cuevas, 2008). De estas, la SOD dependiente de Mn (SOD-Mn) juega un papel importante debido a su ubicación mitocondrial, es decir, el sitio principal de producción de superóxido (O_2^- ; Bresciani et al., 2015).

Glutación peroxidasa GPX

Glutación peroxidasa oxidorreductasa (EC 1.11.1.9) es una enzima dependiente de selenio (Se), cuya función es permitir la reducción del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o lipoperóxido (L-OOH; Takahashi y Cohen, 1986), utilizando como agente reductor el glutatión reducido (GSH; Cisneros et al., 1997).



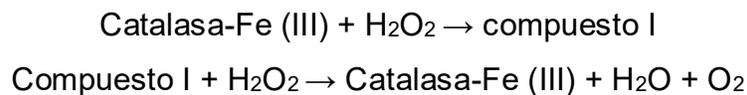
Existen al menos 3 formas de GPX dependientes de selenio: una que se encuentra intracelular (GPX-C), una externa o en plasma (GPX-P) y otra que presenta afinidad específica para los fosfolipoperóxidos (GPX-PH) este último se encuentra principalmente en la membrana, aunque su actividad es la misma, presentan diferencias en cuanto a su estructura (Zachara, 1992).

La GPX intracelular y plasmática son enzimas tetraméricas; que están formadas por 4 subunidades iguales entre sí compuesta cada una por un átomo de Se que se une covalentemente a la cisteína; la secuencia de los aminoácidos de la GPX intracelular es diferente a la secuencia de los aminoácidos de la GPX-plasmática esta además es una proteína glicosilada que posee puentes disulfuros intramoleculares; está demostrado que la GPX intracelular tiene mayor afinidad por el H_2O_2 que por los L-OOH, mientras que, la GPX plasmática lo tiene para los dos sustratos y GPX-PH por los (PHL-OOH; Cisneros et al., 1997).

La GPX y el glutatión reductasa (GRd) son parte de un sistema antioxidante (GPX/GRd), y la CAT de otro; se ha podido evidenciar que estos dos sistemas no funcionan juntos; la CAT actúa en cantidades altas de H₂O₂ y GPX lo hace a concentraciones bajas, lo que demuestra que las actividades de estos dos sistemas están correlacionado negativamente (Zachara, 1992).

Catalasa CAT

Peróxido de hidrógeno oxidoreductasa (EC 1.11.1.6) permiten la conversión del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en agua y oxígeno en dos etapas, estas enzimas son homotetrámeros y contienen un grupo hemo en cada subunidad y una molécula de NADPH (Kirkman et al., 1987).



Existen tres tipos CAT, la CAT-1 son monofuncionales que tiene el grupo hemo y se puede encontrar en organismos procariotas y eucariotas; la CAT-Mn o CAT-2 es una enzima hexamérica que no presentan el grupo hemo pero contienen Mn en el sitio catalítico, solamente está presente en algunos organismos procariotas anaerobios, y la CAT-peroxidasas o CAT-3, presenta actividad de catalasa y de peroxidasa, en su estructura contienen un grupo hemo y sólo puede encontrarse en organismos como las bacterias y hongos (Díaz, 2003).

En las células se pueden encontrar en las mitocondrias y los peroxisomas, a excepción de los eritrocitos, que se localizan en el citosol; en ciertas especies la CAT contienen moléculas de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) en la forma reducida unidas fuertemente con la enzima, no obstante, se ha evidenciado que la CAT de los seres humanos y la de los bovinos están estrechamente unidas a 4 moléculas de NADPH, una en cada subunidad y que no tienen una interacción directa con el grupo hemo y el NADPH (Céspedes et al., 1996).

El modelo de triple escudo para contrarrestar ROS, la defensa de primer nivel consiste en pequeñas moléculas antioxidantes, como ácido úrico, GSH y vitaminas C y E, la segunda capa (intermedia) está compuesta por enzimas antioxidantes SOD, CAT y GPX, y la tercera capa está compuesta por enzimas reparadoras que se ocupan del daño oxidativo (Lei et al., 2016).

Glutación GSH

Es una molécula de bajo peso molecular compuesta por 3 aminoácidos: glutamato (Glu), cisteína (Cys) y glicina (Gly), es el principal antioxidante con presencia en todas las células y ayuda a protegerlas de las ROS (Tobón et al., 2018). En las células, el glutati6n se encuentra en estado reducido (GSH) disponible para su funci6n y, en menor cantidad, en su estado oxidado (GSSG), resultado de su acci6n de defensa de la c6lula, una enzima llamada glutati6n reductasa va reparando a medida que se oxida (Sies, 1999).

El GSH es un antioxidante end6geno, es decir, es producido en el propio organismo, es el principal tiol (-SH) celular que participa en las reacciones redox celulares y la formaci6n de tio6ter, se sintetiza en el citoplasma de las c6lulas y se localiza primordialmente en org6nulos como las mitocondrias, ret6culo endopl6smico y n6cleo, es en estos sitios espec6ficos donde se ha podido ver un incremento en la concentraci6n cuando sucede apoptosis o autofagia celular (Sarrasague et al., 2006).

Muchas de las funciones fisiol6gicas se deben a la presencia del grupo tiol o sulfhidrilo del amino6cido ciste6na, es el sitio activo que participa en las reacciones reducci6n y oxidaci6n del GSH, por todo esto el GSH puede cumplir su funci6n protectora cuando est6 presente en su forma reducida, a su vez, dos mol6culas de GSH pueden oxidarse cediendo un electr6n cada uno y uni6ndose entre ellos para formar un glutati6n oxidado (GSSG; Bachhawat et al., 2013).

Además de los antioxidantes enzimáticos, no enzimáticos y las vitaminas hidrosolubles, se ha investigado el uso de otras sustancias con un efecto antioxidante directo e indirecto como es el caso del aminoácido metionina que parece tener un papel importante en la actividad antioxidante (Schindeldecker y Moosmann, 2015).

4.7 Función antioxidante de la metionina

Metionina (Met) es uno de los primeros aminoácidos limitantes en las dietas de cerdos y, a menudo, debe complementarse para evitar un suministro insuficiente de este aminoácido esencial y cumplir con los requisitos totales de aminoácidos azufrados para el mantenimiento y el crecimiento (Zeitz et al., 2017). Curiosamente, Met se utilizó preferentemente para la síntesis de proteínas y las reacciones de metilación, pero no tanto para el catabolismo de Met a través de la vía de transulfuración que genera, entre otros, GSH, que reduce el estrés oxidativo debido a su función antioxidante (Bauchart et al., 2009).

Met es un aminoácido (AA) esencial en los cerdos y se complementa de forma rutinaria en sus dietas junto con otros AA limitantes, Met, a su vez, puede reducir la proliferación y el estado antioxidante del epitelio intestinal (Zeitz et al., 2019). Además, Met es un precursor de moléculas esenciales que incluyen glutatión reducido (GSH) y S-adenosil-metionina (Bauchart-Thevret et al., 2009).

Met es un AA alifático que contiene azufre y un precursor de succinil-CoA, homocisteína, cisteína, creatina y carnitina, necesario para el metabolismo de poliaminas y fosfatidilcolina (Bin et al., 2017). Investigaciones recientes han demostrado que Met puede regular los procesos metabólicos, el sistema inmune innato y el funcionamiento digestivo en mamíferos, también interviene en el metabolismo de los lípidos, la activación de enzimas antioxidantes endógenas como la metionina sulfóxido reductasa A y la biosíntesis de glutatión para contrarrestar el estrés oxidativo, además, la restricción de metionina previene la alteración del

metabolismo de la metionina/transmetalación, lo que disminuye el daño al ADN y los procesos cancerígenos y posiblemente previene enfermedades arteriales, neuropsiquiátricas y neurodegenerativas (Martínez et al., 2017).

Met es un AA que exhibe varias funciones fisiológicas, incluidos los efectos antioxidantes y la extensión de la vida útil, regula la homeostasis redox celular a través de varias vías; primero, interactúa directamente con ROS y luego se da una autooxidación en sulfóxido de metionina, además, la metionina puede mejorar indirectamente la función antioxidante a través de la mejora del metabolismo de Cys y GSH (Yin et al., 2018).

Met tiene la capacidad de mejorar el desarrollo de los tejidos, promover la capacidad antioxidante y regular la función inmune en los animales (Liu et al., 2010). L-Metionina, DL-Met y DL-Met hidroxianálogo (MHA) pueden usarse como fuentes de Met para aves y cerdos, pero la biodisponibilidad relativa no es la misma, estudios anteriores mostraron que la biodisponibilidad relativa media de la sal de calcio del MHA (MHA-Ca) a DL-Met fue del 63% (Elwert et al., 2008).

Al igual que otros aminoácidos, Met es un componente importante de las proteínas de los tejidos; la síntesis de proteínas y la acumulación durante el crecimiento del tejido se ven afectadas cuando se proporciona Met a niveles insuficientes (Kino y Okumura, 1986). La suplementación con L-Met o DL-Met mejoró la altura de las vellosidades intestinales (AV), relación AV: PC y la capacidad antioxidante de los lechones lactantes con retraso del crecimiento intrauterino (Zhang et al., 2019).

Se descubrió que el aumento en el consumo de DL-2-hidroxi-4-metiltiobutirato (HMTBA) o DL metionina disminuye el retraso del crecimiento inducido por el destete en los lechones, que está fisiológicamente asociado con cantidades elevadas de AA que contienen azufre disponible para el suministro a los tejidos extra intestinales sin comprometer la disponibilidad de lisina e isoleucina, y promueve el

rendimiento del crecimiento y capacidad antioxidante del intestino, este hallazgo puede tener implicaciones importantes para el manejo nutricional de cerdas lactantes y lechones destetados (Li et al., 2014).

En pollos de engorda expuestos al estrés y alimentados con dietas suplementadas con metionina mostraron mejores resultados en las actividades de las enzimas utilizadas como marcadores de estrés, lo que podría deberse a una mayor capacidad antioxidante (Vesco et al., 2015).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Lugar de estudio

El experimento se llevó a cabo, en la Unidad de Metabolismo y Fisiología del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, durante la estación más cálida del año (verano 2019) cuya temperatura generalmente fluctúa entre 20 a 45 °C al día. El análisis enzimático se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del mismo instituto y el histomorfológico en la Universidad Autónoma de Nuevo León.

5.2. Animales y manejo experimental

Se emplearon 60 cerdos cruzados de la raza (Landrace x Hampshire x Duroc) de 23.0 kg de peso corporal inicial promedio. Los cerdos fueron distribuidos en cinco grupos según el peso corporal inicial, sexo y camada, asignados aleatoriamente a los cuatro tratamientos de dieta, se contó con 12 repeticiones por tratamiento. Los cerdos empleados en este trabajo fueron cuidados de acuerdo con las directrices establecidas en la Norma Oficial Mexicana de Cuidado Animal (NOM-062-ZOO-1999; Ochoa, 2001).

Un grupo de cerdos se alojó en condiciones termo neutrales controladas en una habitación con un termostato ajustado a 22 ± 2 °C y alimentados con una dieta de control (TN.100). Los otros cuatro grupos restantes se alojaron en condiciones de alta temperatura (31.5 °C en promedio) y fueron alimentados con la dieta control 100% (EC.100), dieta suplementada con 20 (EC.120), 40 (EC.140), y 60 (EC.160) % más de DL-metionina.

Los cerdos se alojaron individualmente en corrales de 1.2 x 1.2 m dentro de la habitación con temperatura controlada (TN) y una habitación sin control de temperatura con las típicas fluctuaciones de temperatura ambiente (EC) en corrales 0.6 x 1.2 m. Cada corral estuvo equipado con un alimentador de un solo orificio y un bebedero de boquilla, lo cual permitió 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 (higrotermógrafos) instalados dentro de cada una de las habitaciones, y configurado para registrar estas variables cada hora.

5.3 Dietas y tratamientos experimentales

La dieta testigo fue formulada con trigo y pasta de soya, así como lisina para cumplir con los requerimientos del NRC (2012). La concentración de AA se ajustó a los requerimientos para cerdos en el rango de peso corporal de 25-50 kg (Cuadro 2). Excepto metionina, todas las dietas contenían los mismos niveles de AA requeridos NRC (2012). El nivel suplementario de metionina fue elegido 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.

Tratamientos utilizados en el experimento de cerdos en condiciones de EC y TN

- 1.TN con 100% Met requeridos NRC 2012 (TN-100)
- 2.EC con 100% Met requeridos NRC 2012 (EC-100)
- 3.EC con 120% Met requeridos NRC 2012 (EC-120)
- 4.EC con 140% Met requeridos NRC 2012 (EC-140)
- 5.EC con 160% Met requeridos NRC 2012 (EC-160)

A tres cerdos de cada tratamiento se les implanto por vía subcutánea un termógrafo para registrar la variación de la temperatura a intervalos de 5 minutos. Al final de la prueba, se recuperaron todos los termógrafos y se analizaron los datos de la variación de temperatura.

Cuadro 2. Composición de ingredientes de las dietas experimentales *

Ingredientes	Met-100%	Met-120%	Met-140%	Met-160%
Trigo	80.08	80.08	80.08	80.08
Pasta de soya 48%	16.00	16.00	16.00	16.00
L-Lisina • HCl	0.66	0.66	0.66	0.66
L-Treonina	0.20	0.20	0.20	0.20
L-Metionina	0.040	0.095	0.150	0.205
L-Valina	0.05	0.05	0.05	0.05
Almidón	0.165	0.110	0.055	---
Carbonato de calcio	1.25	1.25	1.25	1.25
Fosfato de calcio	0.80	0.80	0.80	0.80
Sal yodada	0.35	0.35	0.35	0.35
Premezcla de vitaminas y minerales ¹	0.40	0.40	0.40	0.40

* Dietas: Met 100, dieta testigo a base de trigo y soya que suministra 100% de Met, cubriendo en 120% de los requerimientos de AA indispensable (NRC, 2012); y Met 120, Met 140 y Met 160 contienen 20, 40 y 60 más Met que la dieta testigo.

¹ Suministrado 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. La premezcla fue suministrada por Nutrionix, S.A., Hermosillo, México.

5.4 Recolección de muestras

Las muestras de sangre se tomaron en el día 18 del tratamiento en horas de la tarde (1700h). Después de finalizar el muestreo, todas las muestras de sangre fueron transportadas al laboratorio de biología molecular para ser centrifugadas a 1,500 *g* durante 15 minutos a 4 °C. Al finalizar se colectó el plasma y las muestras se almacenarán a -80 °C hasta su posterior análisis.

Seis cerdos de cada tratamiento fueron sacrificados al final del tratamiento (d21), las canales fueron evisceradas y se les recolectaron muestras de los segmentos del intestino delgado y se almacenaron en frascos de 50 ml con solución buffer de formaldehído al 10 % para caracterización histológica posterior según el procedimiento descrito por Moeser et al., (2012). Según las experiencias anteriores, el proceso de recolección total tomó 10 minutos o menos, lo que garantiza la buena calidad de las muestras.

5.5 Análisis enzimático

La medición de la actividad enzimática se utilizaron los kits de la marca Cayman Chemical, las muestras fueron procesadas de la siguiente manera:

Para los análisis de SOD y GPX las muestras se procesaron de la siguiente forma: Se diluyo el plasma en una relación 1:2, con el buffer de muestra, luego se removió la capa blanca superior y se descartó (leucocitos), posteriormente se lisaron los eritrocitos en 4 ml de agua fría grado HPLC, se centrifugaron a 10,000 g durante 15 min a 4°C y se recolectó el sobrenadante para su análisis. Para el análisis de CAT el procedimiento fue similar antes mencionado, a excepción de que la dilución del plasma fue a una relación 1:5 y no se empleó buffer. Para analizar GSH, las muestras antes procesadas fueron desproteinizadas con una solución saturada de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ a una relación 1:1, se dejaron reposar en hielo durante 10 m y posteriormente se centrifugaron a 3500 g durante 15 m, se colecto el sobrenadante y se diluyo nuevamente en agua HPLC a una relación 1:1.

Actividad superóxido dismutasa:

La determinación de la actividad enzimática de la enzima superóxido dismutasa (EC 1.15.1.1) se realizó utilizando el kit comercial de Cayman Chemical a 450 nm, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se utilizó una sal de tetrazolio para verificar la presencia de los radicales superóxido que se producen por la enzima xantina oxidasa y la hipoxantina (Figura 3). Se definió la unidad de SOD como la proporción de la enzima que se necesita para manifestar una dismutación del 50% del radical superóxido. El análisis de SOD cuantifica los tres tipos de SOD (Cu/Zn, Mn y Fe SOD).

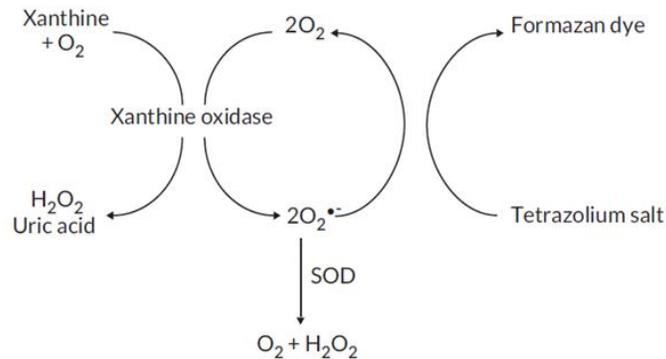


Figura 4. Esquema del ensayo de superóxido dismutasa (Ukeda et al., 1999).

Actividad glutatión peroxidasa:

Se determinó la actividad enzimática de glutatión peroxidasa (EC 1.11.1.9) se realizó utilizando el kit comercial de Cayman Chemical a 340 nm, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La medición de la actividad de GPX se realiza calculando de manera indirecta una reacción unida a glutatión reductasa (GR). El glutatión oxidado (GSSG), elaborado al reducir hidropéroxido por GPX, se reutiliza a su estado reducido por GR y NADPH:



La oxidación del NADPH a NADP⁺ va unida a un descenso de la emisión a 340 nm. Cuando la actividad de GPX es limitante, la estimación del descenso en el A₃₄₀ es directamente proporcional a la actividad de GPX en la muestra. Una unidad de GPX se define con base en la dosis de enzima que provocará la oxidación de 1.0 nmol de NADPH a NADP⁺ por minuto a 25 ° C.

Actividad catalasa:

Para determinar la actividad enzimática de catalasa (EC 1.11.1.6) se realizó utilizando el kit comercial de Cayman Chemical a 540 nm, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó la función peroxidativa de CAT para realizar el cálculo de la actividad enzimática. La metodología utilizada está basada en la reacción de la enzima con metanol cuando se encuentra disponible una cantidad adecuada de H₂O₂. La producción del formaldehído se cuantifica colorimétricamente con 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,3-triazol como cromógeno. Este cromógeno constituye de forma específica un heterociclo bicíclico con aldehídos, que posterior a la oxidación se modifica de incoloro a una coloración violeta. Una unidad de CAT está definida como la porción de enzima que provocará la formación de 1.0 nmol de formaldehído por minuto a 25 °C.

Actividad glutatión:

Se determinó la actividad de glutatión se realizó utilizando el kit comercial de Cayman Chemical a un rango de 404-414 nm, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se empleó un método de reciclaje enzimático cuidadosamente optimizado, que utiliza glutatión reductasa, para la cuantificación de GSH (Figura 4). El grupo tiol de GSH presenta una reacción con DTNB (reactivo de Ellman) y forma ácido 5-tio-2-nitrobenzico (TNB) con una coloración amarilla. El disulfuro mixto, GSTNB (entre GSH y TNB) que se produce concomitantemente, es reducido por la enzima glutatión reductasa que recicla el GSH y produce una mayor cantidad de TNB.

La producción del compuesto TNB es directamente proporcional a la reacción de reciclaje mencionada anteriormente, la cual es proporcional a la cantidad de GSH que tiene la muestra. GSH oxida de manera fácil a glutatión oxidado (GSSG). El GSSG es producido a la par de la reducción de hidroperóxido por la glutatión peroxidasa. GSSG es reducido a GSH por la enzima glutatión reductasa y por cada mol de GSSH, se elaboran 2 μM de GSH

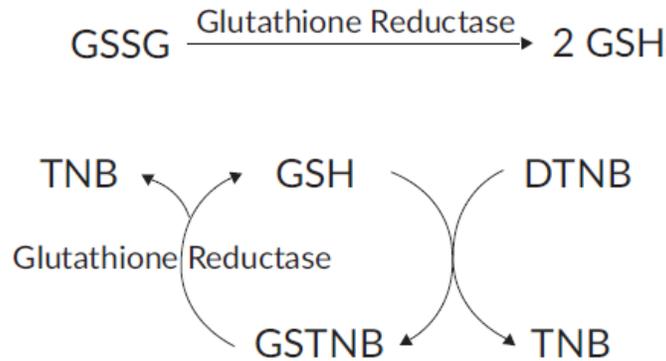


Figura 5. Esquema del reciclaje glutatión (Rahman et al., 2006).

5.6 Análisis histomorfológico

La morfología intestinal fue analizada empleando el método descrito por (Moeser et al., 2012). Cortes macroscópicos de las muestras de duodeno, yeyuno e íleon conservadas en una solución de buffer de formaldehído al 10% en PBS, para ser incluidos en parafina, seccionados a 3 μm de espesor y teñidos con hematoxilina y eosina (Driscoll y Ryan, 1978). En cada portaobjetos se montaron dos cortes transversales, a estos cortes se les determinó el promedio de la altura de las vellosidades, así como la profundidad de las criptas adyacentes.

La observación del tejido se realizó empleando un microscopio óptico (Primo Star Zeiss, HBO50, México). Mediante el uso de cámara fotográfica adaptadas marca Canon se tomaron varias fotografías de varias secciones de los diferentes segmentos intestinales, de tal manera que garantizara las observaciones completas de las vellosidades intestinales, y poder así realizar las mediciones correspondientes.

Se utilizó el Software Image J2 (Curtis et al., 2017), que permite conocer la medida de un área histológica que se encuentra en pixeles a unidades de longitud (micrómetros, en este caso).

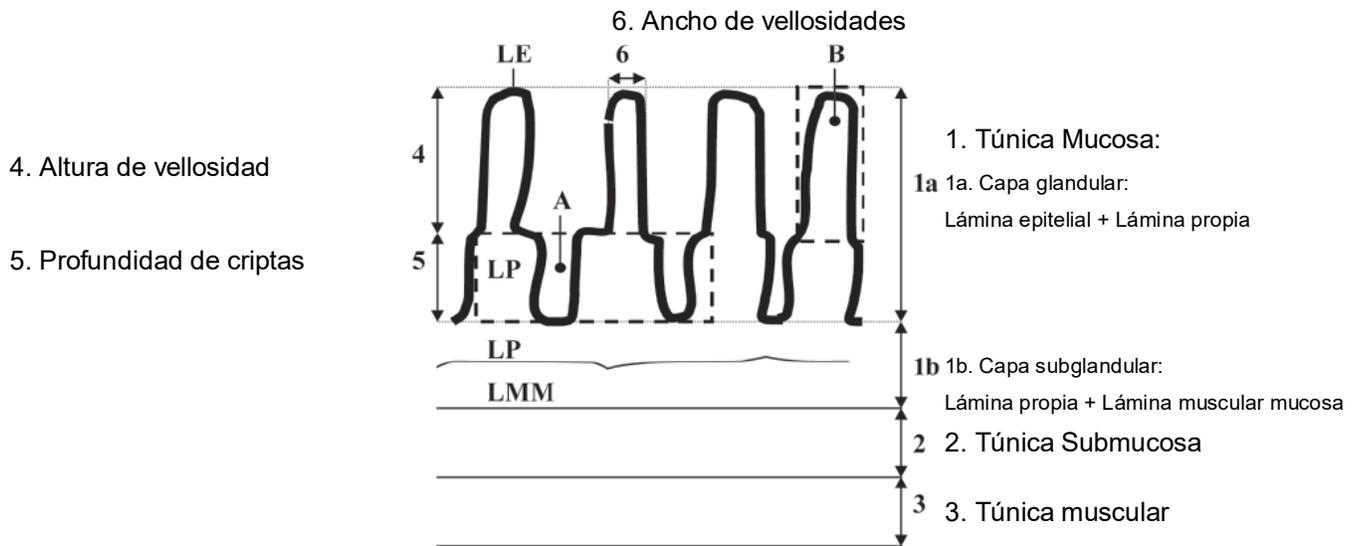


Figura 6. Sitios histológicos y su localización en el intestino delgado utilizado para análisis morfométricos (De Conto et al., 2010).

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).

Se midieron al menos 10 vellosidades íntegras y uniformes y las correspondientes dos criptas de cada una de las vellosidades, por cada muestra de segmento.

1) Altura de vellosidad AV: una vez que se establece la base de la vellosidad, desde su punto medio se traza una línea hasta el ápice.

2) Profundidad de las criptas intestinales PC: una vez identificada la cripta, desde la base de la cripta hasta la base de las vellosidades más cercana.

3) Se calculó la relación AV: PC: se obtiene dividiendo la altura de las vellosidades entre profundidad de las criptas.

5.7 Análisis estadístico

Los análisis de varianza de los datos se realizaron en función del diseño experimental bloques completos al azar (BCA). Se analizaron por contrastes polinomiales para analizar la respuesta lineal y cuadrática de los tratamientos de EC, como también contrastes no ortogonales para todos los tratamientos. Contrastes: C1, EC100 vs TN100; C2, EC100 vs promedio de EC120, EC140 y EC160; C3, TN100 vs promedio de EC120, EC140 y EC160 Las diferencias se consideraron significativas cuando $P < 0.05$. Los análisis de resultados se realizaron con el paquete estadístico Statistix versión 10.

VI. RESULTADOS

6.1 Variables ambientales

Durante el periodo experimental se registraron variaciones diurnas de temperatura ambiente (TA) y humedad relativa (HR) dentro de las salas en que fueron alojados los cerdos. La TA promedio en la sala termo neutral (TN) fue de 22.7°C, con 20.2°C de temperatura mínima y 25.6°C temperatura máxima, mientras que en la sala de estrés por calor (EC) la TA promedio fue de 31.5°C, con 27.9°C de temperatura mínima y 35.8°C de temperatura máxima. Alrededor de las 0600 h se registró la temperatura más baja; la temperatura comenzó a incrementarse a partir de las 0800 h y la máxima ocurrió alrededor de las 1600 h, momento en que se observó que afectaba más a los animales; durante la noche la temperatura descendió paulatinamente. Por otra parte, la HR presentó valores promedio en TN y EC de 67.5 y 63.6% respectivamente, con los valores máximos entre 0700 y 0800 h comenzó a descender hasta la 1600 h, cuando se observó el menor porcentaje de HR 50% en EC y 58.1% en TN (Figura 6 y 7).

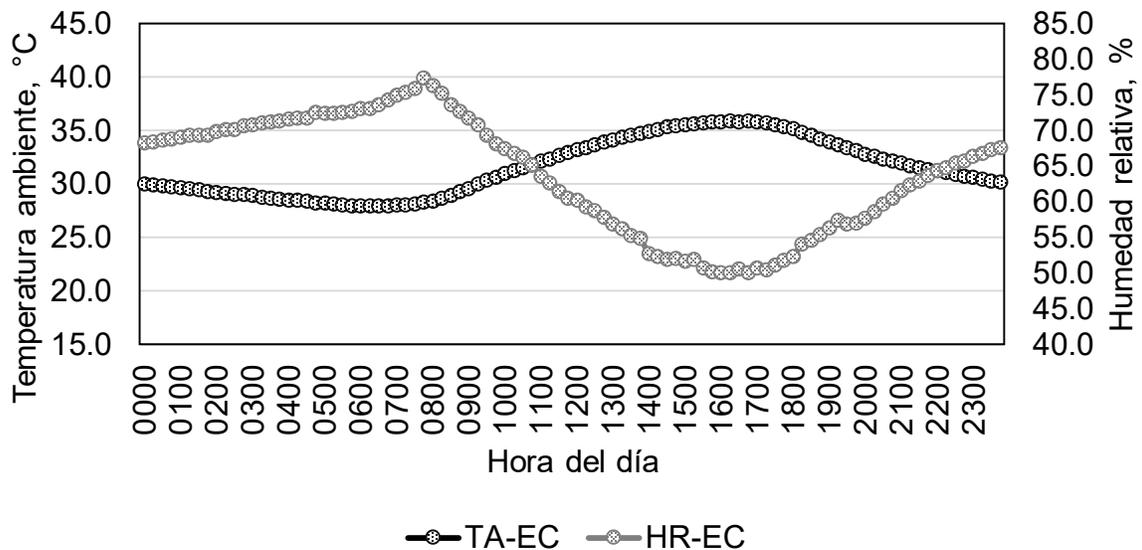


Figura 7. Temperatura ambiente (°C) y humedad relativa (%) en la sala de los cerdos en condiciones de EC

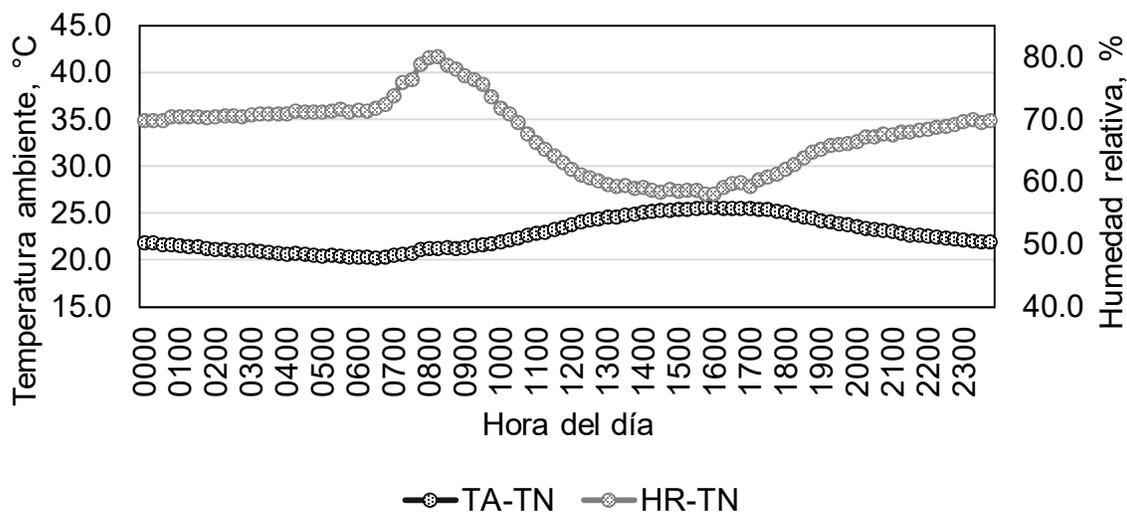


Figura 8. Temperatura ambiente (°C) y humedad relativa (%) en la sala de los cerdos en condiciones de TN

Diariamente, el índice de calor promedio fue de 78.2, con un valor mínimo de 72.3 en las horas de la mañana, incrementándose paulatinamente en el transcurso del día hasta alcanzar un valor máximo de 86 entre las 1500 y 1700 h, para nuevamente comenzar a descender (Figura 8).

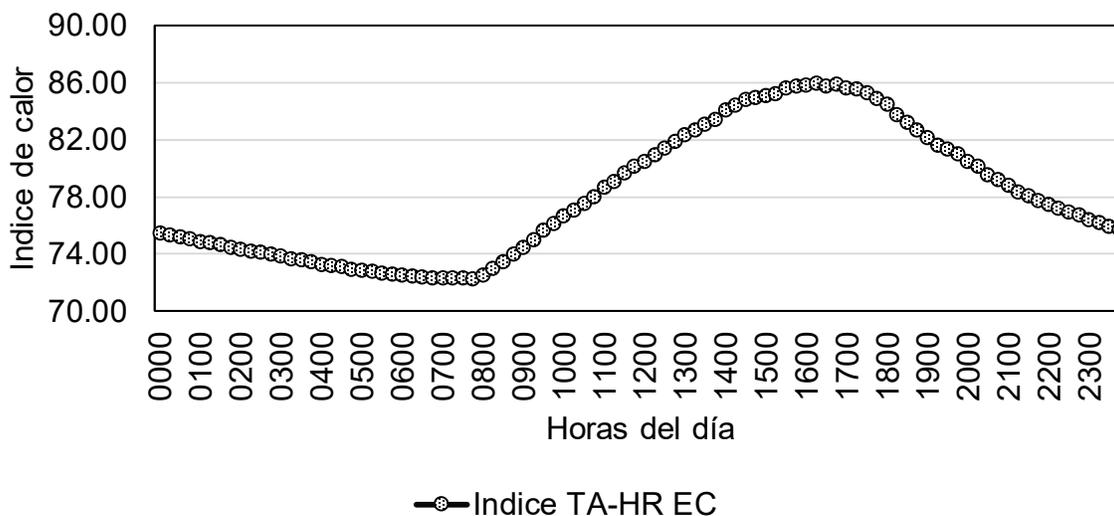


Figura 9. Índice de temperatura y humedad (ITH) en la sala de los cerdos en condiciones de EC

6.2 Variables fisiológicas

En la Figura 9 y 10 se presentan los promedios de temperatura corporal (TC) y temperatura intestinal (TI) de los cerdos en condiciones de estrés por calor (EC) y termoneutralidad (TN), registrados cada 5 min, a lo largo del día. La TC y TI promedio de los cerdos en EC fue de 39.4 y 40.3°C respectivamente. A las 0700 h los cerdos presentaron su TC y TI más baja y a las 2000 h la más alta. La TC de los cerdos en EC fue mayor ($P < 0.05$) a la TC de los cerdos en TN mayormente en las 1200 a 2000 h. La TC promedio para los cerdos en TN fue de 39.2°C.

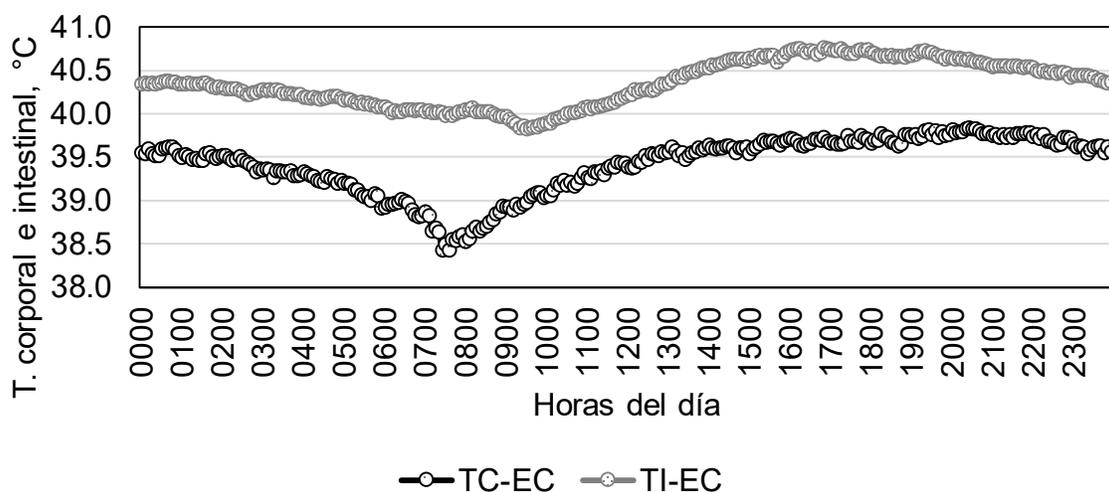


Figura 10. Temperatura corporal e intestinal (°C) de los cerdos en EC

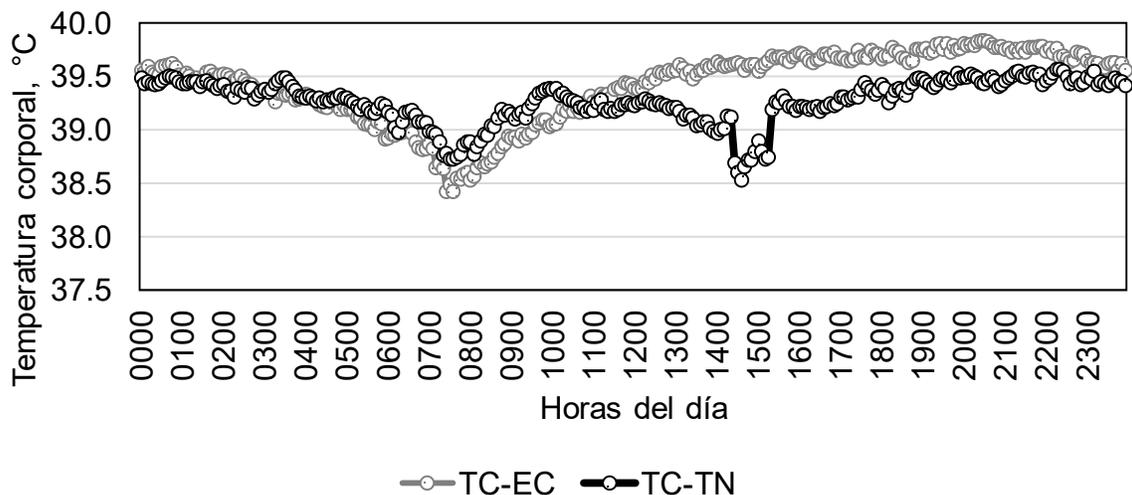


Figura 11. Comparación de la temperatura corporal (°C) de los cerdos en EC y TN

Durante las 0700 h de la mañana en la sala de confort se registró una frecuencia respiratoria en los cerdos de 38.7 (± 1) respiraciones por minuto, en cambio en promedio los cerdos en estrés por calor fueron de 47 (± 2.6) respiraciones por minuto. En la tarde 1700 h la frecuencia respiratoria se incrementó ($P < 0.05$) a 94.5 (± 2.6) respiraciones por minutos para los cerdos en estrés por calor y 46 (± 1.2) para confort (Figura 11).

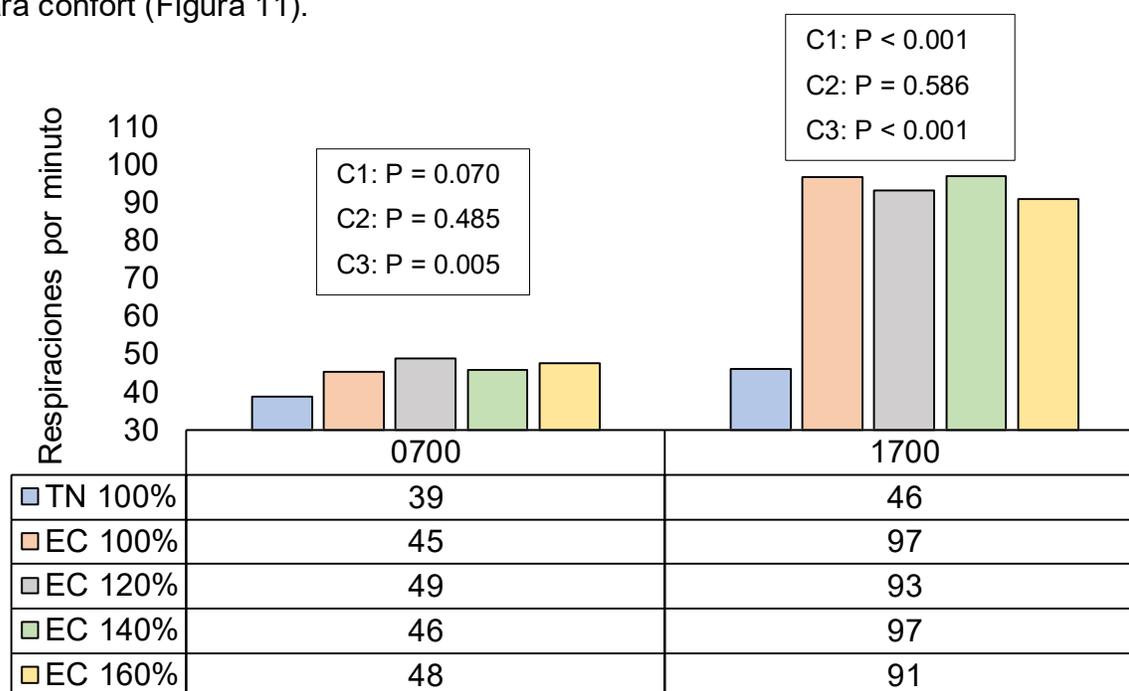


Figura 12. Frecuencia respiratoria por minuto de los cerdos en condiciones EC y TN. Contrastes: C1, TN100 vs EC 100; C2, EC100 vs promedio de EC120, EC140 y EC160; C3, TN100 vs promedio de EC120, EC140 y EC160;

6.3 Variables enzimáticas

La actividad de SOD (Figura 12), fue mayor en los cerdos en condiciones de TN-100% comparado con los de EC-100% ($P < 0.05$), con un promedio de 3.94 y 2.14 U/ml respectivamente. Para el caso de los tratamientos en EC, no hubo diferencias significativas en la actividad de SOD ($P > 0.05$), pero si presentaron tendencias cuadráticas ($P \leq 0.05$). Los cerdos en condiciones en TN-100% tuvieron mayor actividad ($P < 0.05$) en comparación con todos los tratamientos de EC.

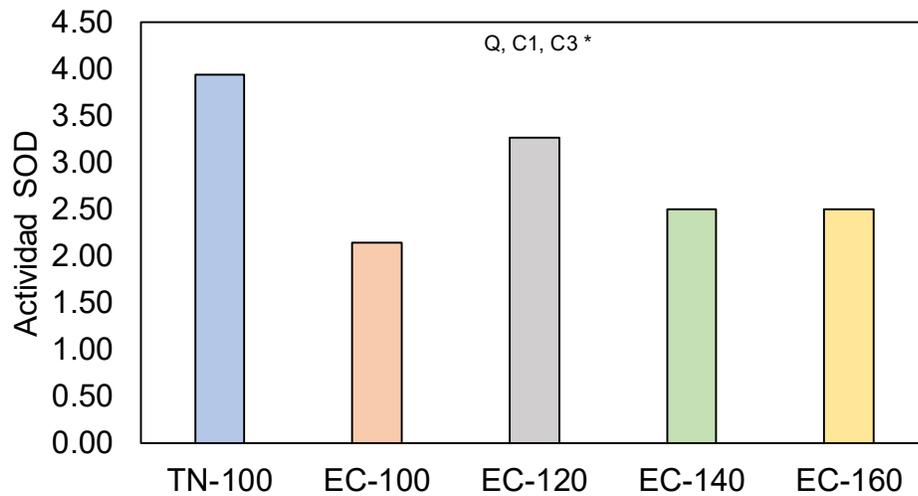


Figura 13. Actividad enzimática de SOD en suero de cerdos en condiciones de EC y TN (Q: $P=0.05$; C1: TN100 vs EC100: $P<0.05$; C3: TN100 vs EC120-160: $P<0.05$).

La actividad de GPX (Figura 13), para el tratamiento de TN-100% comparado con el de EC-100% no hubo diferencias significativas ($P>0.05$). Para el caso de los tratamientos en EC, no hubo diferencias significativas en la actividad de GPX ($P>0.05$), pero si presentaron tendencias lineales ($P\leq 0.05$). TN-100% comparado con todos los tratamientos de EC no presento diferencias significativas ($P>0.05$).

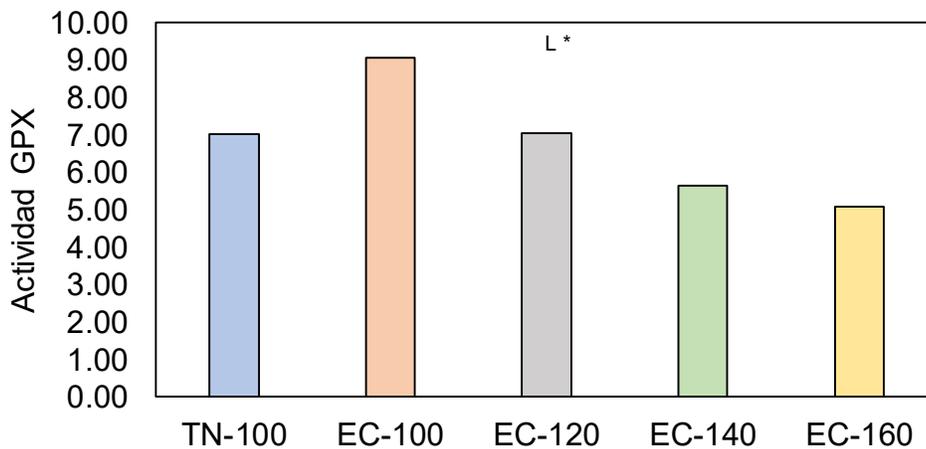


Figura 14. Actividad enzimática de GPX en suero de cerdos en condiciones de EC y TN (L: $P=0.05$).

La actividad de CAT (Figura 14), fue mayor en los cerdos en condiciones de TN-100% comparado con el de EC-100% ($P < 0.05$), con un promedio de 164.29 y 83.64 nm/min/ml respectivamente. Para el caso de los tratamientos en EC 100, 120, 140 y 160%, presentaron diferencias significativas en la actividad de CAT ($P < 0.05$), con promedios de 83.64, 122.0, 156.0 y 199.9 nm/min/ml respectivamente, como también presentaron una respuesta lineal ($P < 0.05$) al nivel de metionina en la dieta. TN-100% comparado con todos los tratamientos de EC no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$).

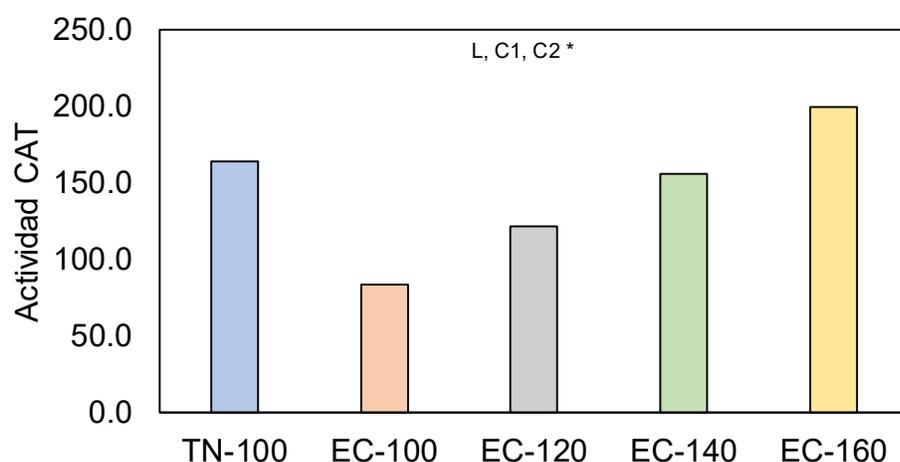


Figura 15. Actividad enzimática de CAT en suero de cerdos en condiciones de EC y TN (L: $P < 0.05$; C1: TN100 vs EC100: $P < 0.05$; C2: EC100 vs EC120-160: $P < 0.05$).

La actividad de GSH (Figura 15), fue mayor en los cerdos en condiciones de TN-100% comparado con los de EC-100% ($P < 0.05$), con un promedio de 14.58 y 10.54 μM respectivamente. Para el caso de los tratamientos en EC, no hubo diferencias significativas en la actividad de GSH ($P > 0.05$), no presentaron respuesta lineales ni cuadráticas ($P > 0.05$). Los cerdos en condiciones en TN-100% tuvieron mayor actividad ($P < 0.05$) en comparación con todos los tratamientos de EC.

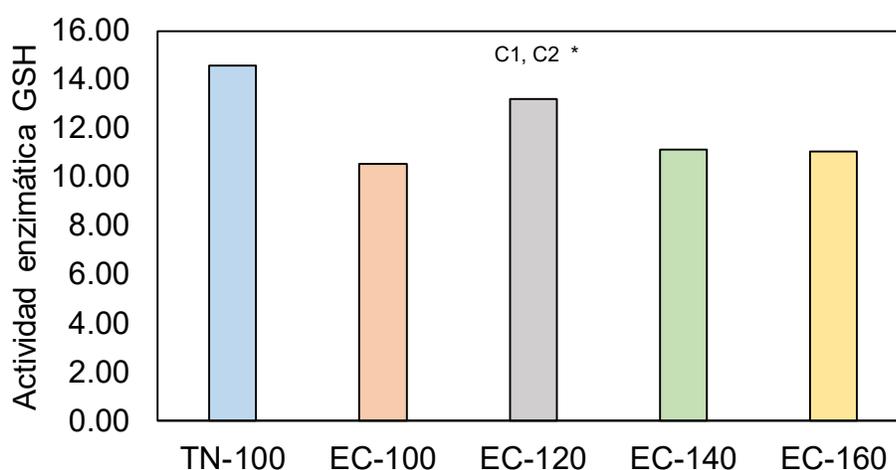


Figura 16. Actividad enzimática de GSH en suero de cerdos en condiciones de EC y TN (C1: EC100 vs EC120-160: $P < 0.05$; C2: TN100 vs EC120-160: $P < 0.05$).

En el cuadro 3 se resumen los promedios de actividad de enzimas antioxidantes en suero de los cerdos en estrés por calor alimentados con diferentes niveles de metionina en condiciones de EC y TN, resultados antes presentados.

Cuadro 3. Concentración de enzimas antioxidantes en suero de cerdos en crecimiento alimentados con diferentes niveles de metionina en condiciones de EC y TN.

Enzimas	Tratamientos ^a						Contrastes ^b				
	TN 100	EC 100	EC 120	EC 140	EC 160	EE	C-1	C-2	C-3	L	Q
SOD	3.94	2.14	3.27	2.50	2.50	0.30	0.001	0.081	0.001	0.800	0.053
GPX	7.30	9.06	7.05	5.65	5.09	1.40	0.380	0.060	0.402	0.053	0.627
CAT	164.3	83.64	122.0	156.0	199.9	13.68	0.002	0.001	0.754	0.001	0.852
GSH	14.58	10.54	13.20	11.13	11.05	0.74	0.001	0.149	0.002	0.873	0.068

^a Tratamientos: TN100, termo neutral, dieta con 100% DL-Met; EC100, estrés por calor, dieta con 100% DL-Met; EC120, estrés por calor, dieta con 120% DL-Met; EC140, estrés por calor, dieta con 140% DL-Met; EC160, estrés por calor dieta con 160% DL-Met.

^b Contrastes: C1, TN100 vs EC 100; C2, EC100 vs promedio de EC120, EC140 y EC160; C3, TN100 vs promedio de EC120, EC140 y EC160; L, polinomial lineal; Q, polinomial cuadrático.

6.4 Variables histológicas

La altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas fueron diferente entre las diferentes secciones intestinales, así como entre los diferentes tratamientos. Las vellosidades intestinales y la profundidad de las criptas más altas se presentaron en las muestras de duodeno y yeyuno.

En duodeno, la altura de vellosidad (Figura 16) fue mayor en los cerdos en condiciones de TN-100% comparado con los de EC-100% ($P < 0.05$), con un promedio de 401.67 y 349.87 micras respectivamente. Para el caso de los tratamientos en EC, no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$), no presentaron respuesta lineal ni cuadrática ($P > 0.05$). Los cerdos en condiciones en TN-100% tuvieron mayor altura de vellosidad ($P < 0.05$) en comparación con todos los tratamientos de EC.

La altura de las vellosidades en yeyuno (Figura 14) fue mayor en los cerdos en condiciones de TN-100% comparado con los de EC-100% ($P < 0.05$), con un promedio de 422.93 y 331.45 micras respectivamente. Para el caso de los tratamientos en EC, no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$), no presentaron respuesta lineal ni cuadrática ($P > 0.05$). Los cerdos en condiciones en TN-100% tuvieron mayor altura de vellosidad ($P > 0.05$) en comparación con todos los tratamientos de EC.

En íleon, la altura de vellosidad (Figura 16) fue mayor en los cerdos en condiciones de TN-100% comparado con los de EC-100% ($P < 0.05$), con un promedio de 320.28 y 251.77 micras respectivamente. Para el caso de los tratamientos en EC 100, 120, 140 y 160%, presentaron diferencias significativas en la altura de vellosidad ($P < 0.05$), con promedios de 251.77, 308.0, 321.82 y 305.30 micras respectivamente, no presentaron respuesta lineal ni cuadrática ($P > 0.05$). TN-100% comparado con todos los tratamientos de EC no presentaron diferencias significativas ($P > 0.05$).

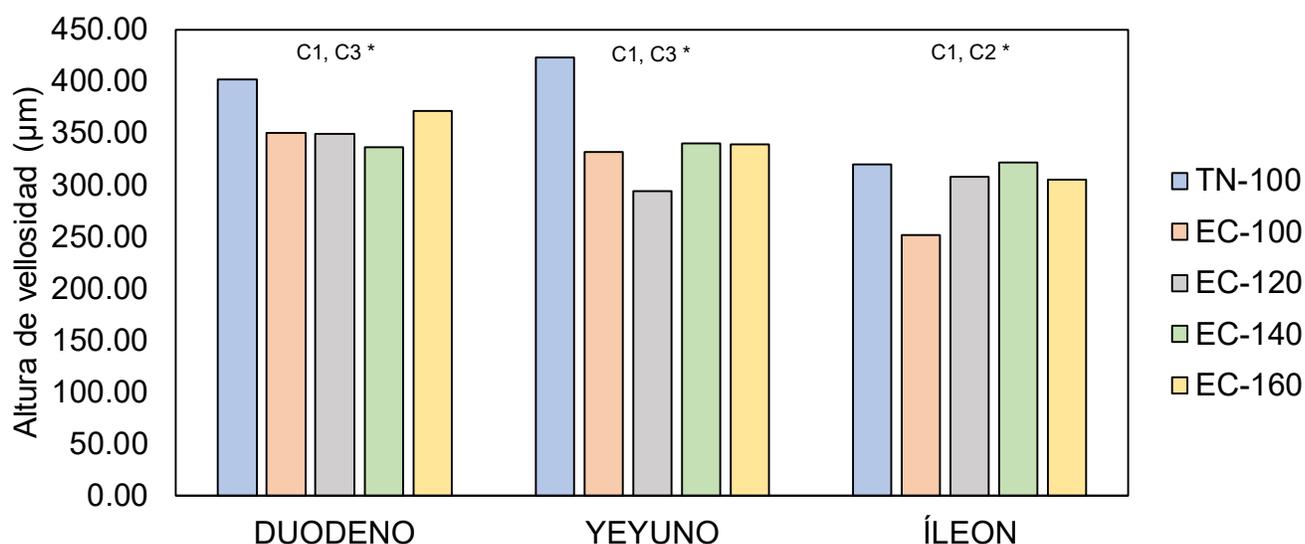


Figura 17. Altura de las vellosidades intestinales de los diferentes segmentos de los cerdos en crecimiento alimentados con diferentes niveles de metionina en condiciones de EC y TN (C1: TN100 vs EC100: $P < 0.05$; C2: EC100 vs EC120-160: $P < 0.05$; C3: TN100 vs EC120-160: $P < 0.05$).

Los promedios de profundidad de criptas (Figura 17) para los tratamientos TN-100, EC-100, EC-120, EC-140 y EC-160%, en duodeno fueron 150.22, 131.83, 151.14, 146.55 y 147.63 micras respectivamente; en íleon fueron 117.52, 102.22, 140.79, 111.98 y 133.78 micras respectivamente. Esta variable no se vio afectada ($P > 0.05$) por el consumo del tipo de dieta en los cerdos en EC y TN.

En yeyuno, la profundidad de criptas (Figura 17) fue mayor en los cerdos en condiciones de TN-100% comparado con los de EC-100% ($P < 0.05$), con un promedio de 157.25 y 127.07 micras respectivamente. Para el caso de los tratamientos en EC, no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$), no presentaron respuesta lineal ni cuadrática ($P > 0.05$). Los cerdos en condiciones en TN-100% tuvieron mayor profundidad de criptas ($P < 0.05$) en comparación con todos los tratamientos de EC.

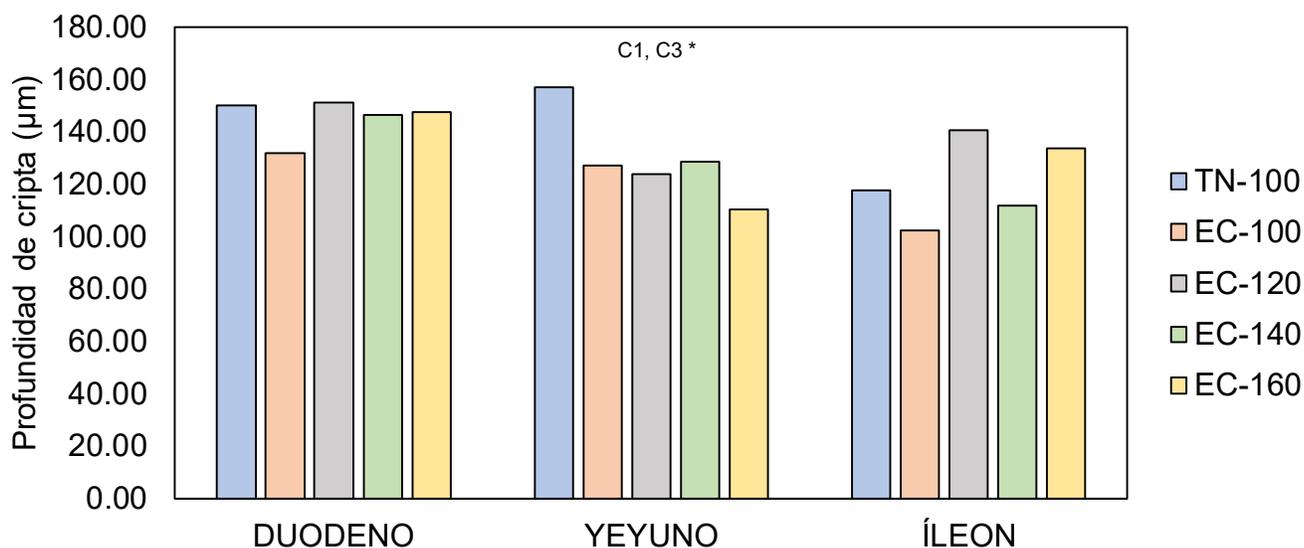


Figura 18. Profundidad de las criptas intestinales de los diferentes segmentos de los cerdos en crecimiento alimentados con diferentes niveles de metionina en condiciones de EC y TN (C1: TN100 vs EC100: $P < 0.05$; C3: TN100 vs EC120-160: $P < 0.05$).

Al relacionar la altura de vellosidad con la profundidad de criptas (Figura 18) en los tratamientos TN-100, EC-100, EC-120, EC-140 y EC-160% en duodeno fueron, 2.77, 2.70, 2.43, 2.43 y 2.60 micras respectivamente; en íleon fueron 2.80, 2.55, 2.39, 2.95 y 2.32 micras respectivamente. Esta variable no se vio afectada ($P > 0.05$) por el consumo del tipo de dieta en los cerdos en EC y TN.

En yeyuno, la relación altura de vellosidad: profundidad de criptas (Figura 18), para en tratamiento de TN-100% comparado con el de EC-100% no hubo diferencias significativas ($P > 0.05$). Para el caso de los tratamientos en EC, no hubo diferencias significativas en la la relación altura de vellosidad: profundidad de criptas ($P > 0.05$), pero si presentaron respuesta lineal ($P < 0.05$). TN-100% comparado con todos los tratamientos de EC no presento diferencias significativas ($P > 0.5$).

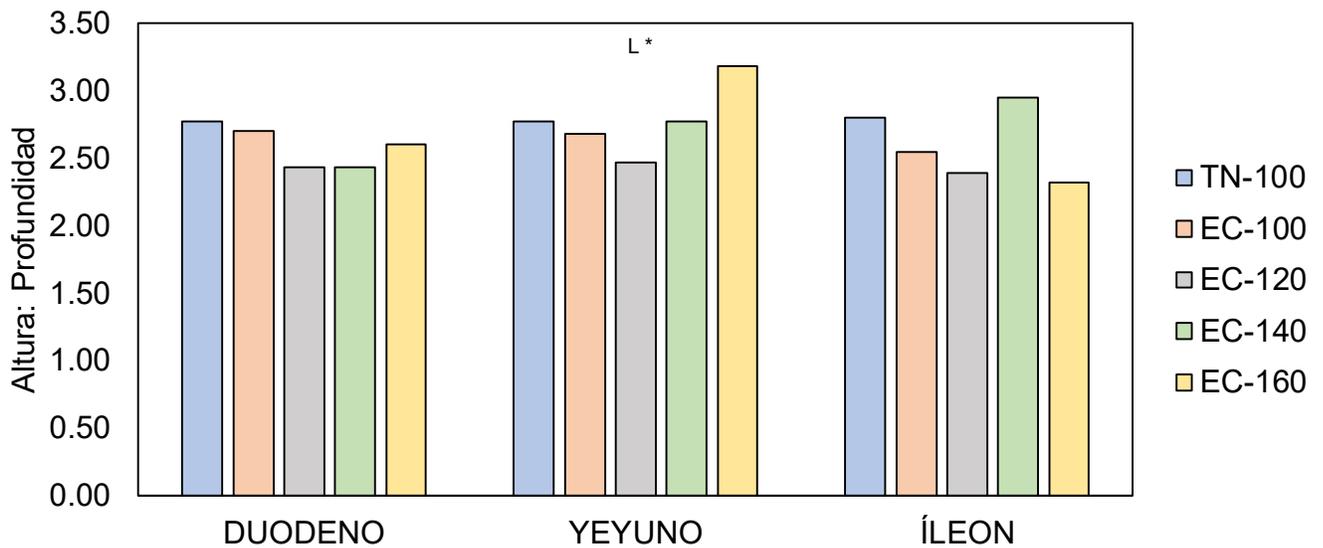


Figura 19. Relación altura de vellosidad: profundidad de cripta de los diferentes segmentos de los cerdos en crecimiento alimentados con diferentes niveles de metionina en condiciones de EC y TN (L: $P < 0.05$).

En el cuadro 4 se resumen los promedios de altura de vellosidad, profundidad de cripta y relación altura de vellosidad: profundidad de criptas de las vellosidades intestinales analizadas en cortes histológicos de duodeno yeyuno e íleon de los cerdos en estrés por calor alimentados con diferentes niveles de metionina en condiciones de EC y TN, resultados antes presentados.

Cuadro 4. Morfología del intestino delgado de cerdos en crecimiento alimentados con diferentes niveles de metionina en condiciones de EC y TN.

		Segmentos del intestino delgado								
		Duodeno			Yeyuno			Íleon		
		AV	PC	AV:PC	AV	PC	AV:PC	AV	PC	AV:PC
Tratamientos ^a	TN-100	401.67	150.22	2.77	422.93	157.25	2.77	320.28	117.52	2.80
	EC-100	349.87	131.83	2.70	331.45	127.07	2.68	251.77	102.22	2.55
	EC-120	349.17	151.14	2.43	294.44	123.84	2.47	308.00	140.79	2.39
	EC-140	336.22	146.55	2.43	340.03	128.77	2.77	321.82	111.98	2.95
	EC-160	371.62	147.63	2.60	339.68	110.35	3.18	305.30	133.78	2.32
Contrastes ^b	EE	17.00	10.38	0.14	22.51	7.94	0.17	18.99	11.84	0.14
	C1	0.041	0.222	0.744	0.008	0.012	0.736	0.017	0.369	0.208
	C2	0.900	0.175	0.206	0.797	0.511	0.538	0.011	0.061	0.996
	C3	0.018	0.883	0.100	0.001	0.001	0.839	0.697	0.412	0.125
	L	0.525	0.391	0.669	0.387	0.156	0.035	0.070	0.271	0.829
	Q	0.323	0.407	0.159	0.308	0.274	0.089	0.085	0.521	0.101

AV: Altura de vellosidad; PC: Profundidad de cripta; AV: PC: Relación altura de vellosidad y profundidad de cripta

^aTratamientos: TN100, termo neutral, dieta con 100% DL-Met; EC100, estrés por calor, dieta con 100% DL-Met; EC120, estrés por calor, dieta con 120% DL-Met; EC140, estrés por calor, dieta con 140% DL-Met; EC160, estrés por calor dieta con 160% DL-Met.

^bContrastes: C1, TN100 vs EC 100; C2, EC100 vs promedio de EC120, EC140 y EC160; C3, TN100 vs promedio de EC120, EC140 y EC160; L, polinomial lineal; Q, polinomial cuadrático.

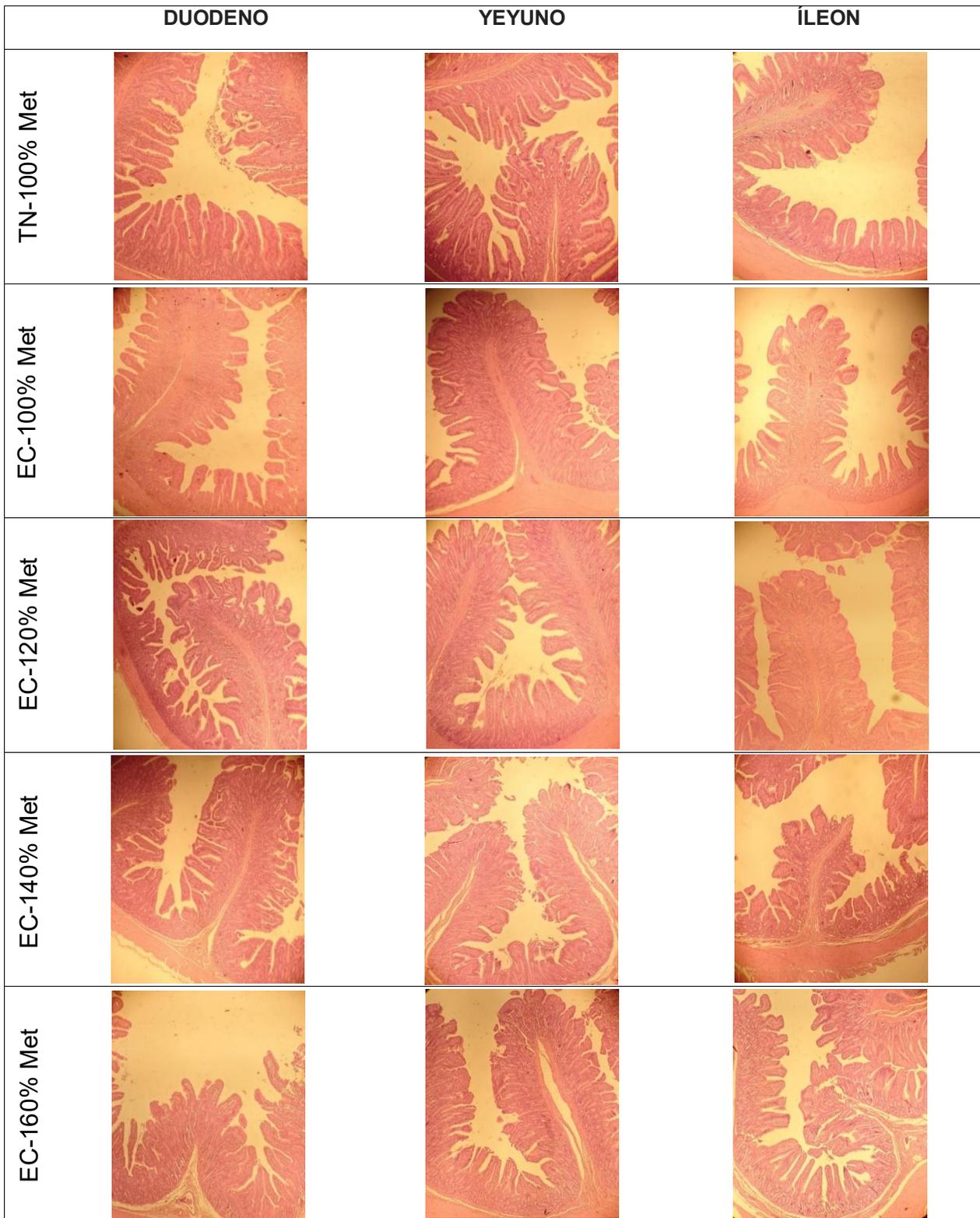


Figura 20. Cambios morfológicos en los segmentos del intestino delgado de los cerdos alimentados con diferentes niveles de metionina en condiciones de EC y TN.

VII. DISCUSIÓN

Ambientales y fisiológicas

En la mayor parte del mundo los cerdos alojados en granjas durante el verano están expuestos a TA, que fluctúan diariamente en condiciones de estrés por calor EC (Cervantes et al., 2017). Durante la fase experimental de este trabajo de investigación, se registraron grandes variaciones de TA y humedad relativa (HR) dentro de las salas donde los cerdos fueron alojados. Sin embargo, durante el periodo de confort se mantuvieron dentro del rango de termoneutralidad (TN); puesto que la temperatura en condiciones de confort para cerdos en periodo de crecimiento se maneja en un rango de los 18-22°C (Huynh et al., 2005).

En el periodo de EC la TA sobrepasó el nivel de termoneutralidad. La TA fluctuó entre 27.9 y 35.8 °C, e incluso el índice de temperatura y humedad (ITH) fue superior a 75 entre las 0900 y 2200 h. Morales et al., (2016c) informaron que cuando los cerdos son expuestos a 35 °C o más aumentan su temperatura intestinal (TI) y muestran signos marcados de EC, un ITH superior a 75 es un indicador de peligro leve (Habeeb et al., 2018). El incremento en la temperatura corporal (TC) y TI en cerdos en condiciones de EC es el resultado del aumento en la TA (Morales et al., 2016b). La TC y TI máxima para los cerdos en EC fue de 39.8 y 40.8°C respectivamente entre las 1600 y 1900 h. En el presente experimento la TC de los cerdos en EC fue más alta a la de los cerdos en TN, variando de 0.3 °C a las 0900 h a 1.2 °C a las 1400 h. Así mismo, la FR promedio fue dos veces mayor en los cerdos EC en comparación con los de TN a las 1700 h. De igual manera Pearce et al., (2014) demostraron que cerdos expuestos constantemente a 36°C duplicaron su frecuencia respiratoria (FR) y aumentaron la TC en 2°C. Las diferencias en las variables ambientales y fisiológicas en los tratamientos del presente trabajo evidencian claramente que los cerdos se encontraban en condiciones de EC.

La producción de cerdos en países como Estados Unidos, Brasil, Australia, ciertos países de Europa y en otros países, ha causado pérdidas económicas considerables porque se encuentran alojados en condiciones donde la temperatura ambiente es más elevada que la temperatura ideal (St-Pierre et al., 2003). La exposición de los cerdos a altas temperaturas ambientales ocasiona EC, lo que modifica su comportamiento, fisiología y metabolismo para conservar la homeostasis (Morales et al., 2016c). Como resultado en el incremento de la TA, TC, FR, frecuencia cardiaca y temperatura rectal de los cerdos, se afecta drásticamente el consumo de alimento, eficiencia productiva y reproductiva (Das et al., 2016). Es un desafío actual la implementación de estrategias correctivas (modificaciones físicas del medio ambiente o nutricionales) para reducir el efecto del EC en la producción animal (Temple et al., 2015).

Enzimáticas

El EC altera las concentraciones de radicales libres ROS (Slimen et al., 2016). Siendo estos los responsables de inducir estrés oxidativo en las células (Nisar et al., 2013). El estrés oxidativo es el resultado de un desequilibrio en las concentraciones de pro-oxidantes y antioxidantes, dando lugar a la sobreproducción de ROS, y disminución de las defensas antioxidantes (Ganaie et al., 2013). La exposición al calor aumenta la producción de ROS e induce estrés oxidativo, que puede producir citotoxicidad (Archana et al., 2017). Existen varios sistemas enzimáticos y no enzimáticos que participan en la eliminación de ROS (Lu et al., 2010; Mehta y Gowder, 2015). Los antioxidantes enzimáticos incluyen superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GPX; Freitas et al., 2016), y los antioxidantes no enzimáticos como el glutatión (GSH) que sirve como donante de electrones para GPX (Tobón et al., 2018). La actividad enzimática antioxidante aumenta en respuesta a los altos niveles de ROS para mantener las concentraciones en un estado estable a los radicales libres (Kumar et al., 2011).

En el presente trabajo, la actividad enzimática de SOD tendió a ser mayor para los cerdos en EC-120% (20% adición de Met) en comparación al resto de los tratamientos en EC (con adición de Met). Probablemente Met favoreció la síntesis de S-

adenosilmetionina, siendo este un importante donador de grupos metilo para mejorar la expresión de SOD (Zhang et al., 2017). La metilación del ADN es fundamental para regular la expresión génica de las proteínas; se sabe que la metilación del ADN, es un factor epigenético importante que influye en la actividad de expresión de los genes (Moore et al., 2013). Met es un precursor de la síntesis de proteínas y sirve como aminoácido predominante para el inicio de la traducción de todas las proteínas (Zhang et al., 2017). Una disminución en la actividad de esta en los cerdos en EC-100% (sin adición de Met) pudiera estar asociado a que en condiciones de EC existe un mayor daño y degradación de proteínas (formación de disulfuros; Montilla et al., 2014). Cuando se suplementó con un 40 y 60% de Met a los cerdos en EC la actividad de SOD disminuyó. Met tiene un efecto directo que ayuda a reducir el estrés oxidativo, los residuos de Met y Cys en las proteínas eliminan las especies reactivas de oxígeno (ROS) y, por lo tanto, protegen tanto a las proteínas como a otras macromoléculas del daño oxidativo (Bin et al., 2017). Met se oxida de forma reversible para formar sulfóxido de Met, que protege a la célula de la acción dañina de los ROS (Weissbach et al., 2005). Creatina es otro mecanismo directo que ayuda a eliminar el anión superóxido (Lawler et al., 2002). De acuerdo con Habashy et al., (2019) en pollos de engorde la actividad de SOD en el hígado aumentó bajo EC crónico pero no, bajo estrés agudo y en el músculo P. mayor no se observó ningún cambio, la respuesta de SOD a EC puede depender de la duración del estrés como también del tipo de tejido. La actividad de SOD disminuyó después de 3 días de EC en comparación con TN y 1 día de EC en cerdas hembras sometidas a EC por calor (Montilla et al., 2014).

Una de las vías redox es el sistema enzimático de glutatión peroxidasa (GPX), el metabolismo aeróbico genera peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que puede ser metabolizado por la GPX en el citosol y mitocondrias, o por la catalasa en el peroxisoma (Lu, 2013). La función antioxidante del GPX solamente se logra utilizando el glutatión (GSH) como reductor (Lu, 2009). El GSH es el principal antioxidante endógeno que se encuentra en la célula, necesario para el mantenimiento del balance redox (Sarrasague et al., 2006). La actividad enzimática de GPX mostró una tendencia lineal para los cerdos de los tratamientos en EC, a mayor adición de Met en la dieta menor actividad de GPX. Schindeldecker y Moosmann, (2015) encontraron que los residuos de metionina en las

proteínas actúan como antioxidante de las mitocondrias, encontrándose principalmente en la membrana mitocondrial interna. Por lo que, Met podría estar generando la disminución del estrés oxidativo y por lo tanto observamos una reducción en la actividad de GPX en las dietas con adición de Met. La disminución en la actividad de GSH en los cerdos en EC-100% (sin adición de Met) pudiera estar asociado a que en condiciones de EC se necesitan más GSH en conjunto con la GPX para contrarrestar las ROS, en el presente trabajo se observó que en los cerdos en condiciones de EC-100% (sin adición de Met) tuvieron aumento en la actividad de GPX siendo estos uno de los principales sistemas de defensa antioxidante de la célula (Habashy et al., 2019).

Se ha analizado que GPX y CAT no trabajan a la par; CAT actúa cuando existe una alta cantidad de H_2O_2 y la GPX actúa a cantidades bajas, lo que comprueba una correlación inversa en la actividad de ambas enzimas (Cisneros et al., 1997). Por el contrario Wang et al., (2019) mostró que cuando se suplementa con diferentes niveles de Met en la dieta a pollos de engorde mejoró la actividad de GPX en suero sanguíneo. La actividad de GPX en hígado aumentó 12 días después de la exposición de los pollos al EC, sin embargo, no se observaron cambios en el músculo P. mayor (Habashy et al., 2019).

La actividad de GSH tendió a ser mayor para los cerdos en EC-120% (20% adición de Met) en comparación al resto de los tratamientos en EC (con adición de Met). En particular, se sabe que Met es un precursor de compuestos que juegan un papel importante en el sistema de protección antioxidante del organismo, como la taurina (Jong et al., 2012). Además, Met es un precursor de la síntesis de Cys, que a su vez, Cys se utiliza para síntesis del GSH (Marí et al., 2009). Cuando se suplementó con un 40 y 60% de Met a los cerdos en EC la actividad de GSH disminuyó. El GSH, además de combatir directamente el H_2O_2 mediante la acción de las enzimas GPX, también se relaciona con la protección de las proteínas mediante un mecanismo conocido como glutatión; este mecanismo describe la formación de un enlace disulfuro entre un grupo tiol de una proteína y un grupo tiol de GSH, dando como resultado proteína-S-S-glutatión; este disulfuro puede reducirse mediante enzimas tioltransferasas dependientes de GSH

conocidas como glutaredoxinas; Así, la glutationilación protege las proteínas al prevenir la formación de disulfuros proteína-proteína y protege contra otros tipos de oxidación de proteínas que son irreversibles (Ghezzi, 2013). Por otra parte, Wang et al., (2019) mostró que la actividad de GSH en suero, hígado e intestino estaba influenciado por las fuentes y los niveles de Met en la dieta de pollos de engorde. Se observó una mayor actividad de GSH en los pollos de engorde a los 21 días, pero no en pollos de 42 días expuestos a EC (Del Vesco et al., 2017).

La actividad enzimática de CAT fue menor para los cerdos en EC-100% (sin adición de Met) en comparación al resto de tratamientos en EC (con adición de met) que mostraron una respuesta lineal, a mayor adición de Met en la dieta mayor actividad de CAT. El EC ocasiona daños en las proteínas (Montilla et al., 2014) y en la expresión de ARNm de genes que codifican para antioxidantes (Mujahid et al., 2007). Se ha demostrado que el estrés por calor es uno de varios factores que afectan la actividad de las enzimas antioxidantes (Pamok et al., 2009). Lo que podría estar relacionado con la baja actividad de esta enzima para los cerdos en EC-100% (sin adición de Met). El EC altera las concentraciones de ROS (Slimen et al., 2016). Se ha observado que CAT actúa en presencia de altas concentraciones de H₂O₂ (Cisneros et al., 1997). Por el contrario la actividad enzimática de catalasa no se vio afectada en cerdas hembras sometidas a 1 y 2 días de EC en el musculo esquelético (Montilla et al., 2014). En cambio Del Vesco et al., (2017) observaron una mayor actividad CAT en pollos de engorde a los 42 días, pero no en pollos de 21 días expuestos a EC, y lo asocian a que en condiciones de EC, en las que hay más producción de H₂O₂, los pollos de 21 días tienen una mayor capacidad antioxidante que los pollos de 42 días; el tiempo de exposición puede ser un factor determinante en la actividad de esta enzima, en este trabajo los cerdos fueron sometidos durante 21 días consecutivos a condiciones de EC. Lo más probable es que este resultado no esté relacionado con la acción directa de la metionina, pero si con la capacidad de este aminoácido para modular la síntesis de esta enzima para contrarrestar las ROS. De acuerdo con este y los estudios anteriores, podríamos decir que la adición de diferentes niveles de suplementación Met a dietas para cerdos en EC podría fortalecer el sistema antioxidante al mejorar la actividad de las enzimas SOD, GPX, CAT y GSH.

Histológicas

El tracto gastrointestinal es uno de los principales órganos que se ve afectado por el EC debido al mecanismo termorregulador del cuerpo, que desplaza el flujo sanguíneo hacia los órganos y tejidos periféricos para facilitar la disipación del calor que en consecuencia conduce a una isquemia intestinal (Lian et al., 2020). La integridad intestinal es uno de los principales indicadores que reflejan la salud intestinal de los cerdos (Zhang et al., 2019). En el presente trabajo se pudo observar un acortamiento en la altura de las vellosidades en duodeno y yeyuno para los cerdos de los tratamientos en EC (con adición de Met), mientras que en íleon la altura de la vellosidad mostró una tendencia lineal, a mayor adición de Met en la dieta mayor altura de vellosidad. Met, es el precursor de S-adenosilmetionina donador de grupos metilos necesarios para la síntesis de poliaminas (Martínez et al., 2017). Las poliaminas, como la putrescina, la espermina y la espermidina están involucradas en la proliferación celular y son cruciales para el crecimiento y la integridad del epitelio intestinal (Timmons et al., 2012).

Los requerimientos de Met en el intestino delgado son muy altos, necesarios para la síntesis de proteínas epiteliales como también para las reacciones de trans-metilación y trans-sulfuración, alrededor del 20-30% de la ingesta dietética de Met es metabolizada por el tejido gastrointestinal para formar cisteína que se necesita para la síntesis de glutatión debido al estrés oxidativo asociado con la alta actividad metabólica de las células epiteliales en proliferación (Riedijk et al., 2007). Por otra parte Liu et al., (2009) mostraron que cuando los cerdos son sometidos a condiciones de EC se altera la integridad del intestino delgado (mayor descamación en las puntas de las vellosidades intestinales). En condiciones de EC agudo y crónico se observó una disminución en la altura de las vellosidades en los tres segmentos de intestino delgado (Vásquez et al., 2018). Sin embargo cuando se suplementó con 20% de Met en la dieta mejoró la altura de las vellosidades (Micanor et al., 2019). De igual manera la altura de las vellosidades en íleon tendió a aumentar linealmente a medida que aumentaba la suplementación con DL-MHA a lechones recién destetados (Kaewtapee et al., 2016). Debido a que todas las dietas en EC (con adición de Met) fueron también suplementadas con un 20% de Lys,

Thr y Val, probablemente esto pudo contribuir a que no se observaran diferencias marcadas en la altura de las vellosidades de estos cerdos. Se sabe que Thr representa el aminoácido más abundante 35% en la mucina (Morales et al., 2016c). La mucina funciona como barrera protectora de la superficie de células epiteliales contra microorganismos, toxinas y partículas (Faure et al., 2002). Aunque la altura de las vellosidades no aumentó con la adición de Met en la dieta, si se pudo mantener la integridad, que es uno de los efectos que más daño ocasionan al epitelio intestinal.

En este estudio se pudo observar un acortamiento en la profundidad de las criptas de yeyuno de los cerdos de los tratamientos en EC (con adición de Met) sin embargo en duodeno e íleon esta variable no se vio afectada. El intestino delgado es el órgano más importante en la absorción de nutrientes, este se divide en tres fragmentos, duodeno, yeyuno e íleon; en el duodeno se mezcla la digesta del estómago con las secreciones del intestino, hígado y páncreas; cuando los alimentos son descompuestos en sus elementos principales, van a ser absorbidos mayoritariamente en yeyuno que es la sección más larga; en el íleon tiene lugar la absorción de sales biliares y de vitaminas (Yen, 2000). Un acortamiento en la profundidad de las criptas en yeyuno puede estar asociado a que es el principal segmento del intestino delgado en el que se lleva a cabo la absorción de los nutrientes. De acuerdo con Vásquez et al., (2018) sugiere que la reducción en la altura de la vellosidad es menos perjudicial cuando se encuentra acompañada de una disminución en la profundidad de las criptas, tal como sucedió en este trabajo. Cuando los cerdos son sometidos a EC agudo hay una disminución en la profundidad de las criptas principalmente en yeyuno (Yu et al., 2010). Sin embargo Micanor et al., (2019) observaron que cuando se suplementa con 20% de Met en la dieta mejoró la profundidad de las criptas en yeyuno e íleon de cerdos en EC. Por el contrario, Zeitz et al., (2019) mostraron que la suplementación de diferentes fuente de Met no afectó la profundidad de las criptas en duodeno y yeyuno de lechones recién destetados. Al igual que Kaewtapee et al., (2016) demostraron que la profundidad de las criptas en yeyuno no se vio afectada por la suplementación con DL-MHA en lechones recién destetados.

La relación altura de vellosidad: profundidad de la cripta (AV: PC) se considera un buen indicador del recambio de la mucosa para estimar la capacidad digestiva e integridad del intestino delgado (Montagne et al., 2003), esta relación no se vio afectada en duodeno e íleon para los cerdos de los tratamientos en EC (con adición de Met) mientras que en yeyuno mostró una respuesta lineal a mayor adición de Met en la dieta mayor relación (AV: PC). Probablemente una relación positiva se debe a que hubo una disminución en la altura como también en la profundidad de la cripta. La relación (AV:PC) aumentó en yeyuno e íleon en lechones con retrasos del crecimiento intrauterino después de la suplementación con DL-Met (Zhang et al., 2019). Sin embargo, la relación (AV: PC) únicamente en íleon aumentó linealmente con la suplementación de DL-MHA a lechones recién destetados (Kaewtapee et al., 2016). En condiciones de EC agudo y crónico se observó que esta variable no se ve afectada (Vásquez et al., 2018). Met es un aminoácido esencial y fundamental por su función antioxidante que protege tanto a las proteínas como a otras macromoléculas del daño oxidativo (Bin et al., 2017). En este sentido, Met pudo haber ayudado a reducir las lesiones de las células epiteliales de intestino provocadas por el estrés oxidativo. Los resultados del presente trabajo de investigación demuestran que aún se requieren muchos más estudios sobre la adición de diferentes niveles de metionina a dietas para cerdos en crecimiento en condiciones EC, y estudiar su efecto directo en la actividad antioxidante como en la integridad intestinal podría ser la base de nuevas prácticas en producción porcina.

VIII CONCLUSIÓN

La temperatura ambiente modifica la temperatura corporal, temperatura intestinal y frecuencia respiratoria de los cerdos en estrés por calor independientemente del nivel de metionina en la dieta.

El nivel de metionina en la dieta afecta la actividad de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, catalasa y glutatión) en suero sanguíneo de cerdos expuestos a estrés por calor.

La adición de metionina en la dieta ayuda a mantener la integridad del epitelio intestinal de cerdos expuestos a estrés por calor.

IX. LITERATURA CITADA

- Agarwal, A., and Prabakaran, S. (2005). Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian Journal of Experimental Biology*, 43, 963-974.
- Alarcón, A., Gamboa, J., y Janacua, H. (2007). El papel de las hormonas en el estrés porcino. *Tecnociencia Chihuahua*, 1(2), 72-80.
- Álvarez, A. (2014). El cambio climático y la producción animal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 48, 7-10.
- Archana, P., Aleena, J., Pragna, P., Vidia, M., Abdul, P., Bagath, M., Krishnan, G., Manimaran, A., Beena, V., Kurien, E., Sejian, V., and Bhatta, R. (2017). Role of heat shock proteins in livestock adaptation to heat stress. *Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research*, 5(1), 1-8. <https://doi.org/10.15406/jdvar.2017.05.00127>
- Bachhawat, A., Thakur, A., Kaur, J., and Zulkifli, M. (2013). Glutathione transporters. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(5), 3154-3164. <https://doi.org/10.1016/j.bba.gen.2012.11.018>
- Balasaheb, S., and 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., and Burrin, D. (2009). Intestinal metabolism of sulfur amino acids. *Nutrition Research Reviews*, 22(2), 175-187. <https://doi.org/10.1017/S0954422409990138>

- Bauchart-Thevret, C., Stoll, B., Chacko, S., and Burrin, D. (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), 1239-1250. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.91021.2008>
- Benítez, D. (2006). Vitaminas y oxidorreductasas antioxidantes: Defensa ante el estrés oxidativo. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 25(2), 1-8.
- Bin, P., Huang, R., and Zhou, X. (2017). Oxidation resistance of the sulfur amino acids methionine and cysteine. *BioMed Research International*, 2017, 1-6. <https://doi.org/10.1155/2017/9584932>
- Błaszczyk, A., Augustyniak, A., and Skolimowski, J. (2013). Ethoxyquin: An antioxidant used in animal feed. *International Journal of Food Science*, 2013, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2013/585931>
- Bresciani, G., Manica da Cruz, I., and González, J. (2015). Manganese superoxide dismutase and oxidative stress modulation (Vol. 68, pp. 87-130). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2014.11.001>
- Cervantes, M., Ibarra, N., Vásquez, N., Reyes, F., Avelar, E., Espinoza, S., and Morales, A. (2017). Serum concentrations of free amino acids in growing pigs exposed to diurnal heat stress fluctuations. *Journal of Thermal Biology*, 69, 69-75. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2017.06.008>
- Cervantes, R., y Cordova, A. (2018). Efectos metabólicos y molecular del estrés calórico en el ganado. *Sociedades Rurales, Producción y Medio Ambiente*, 18, 139-156.
- Céspedes, E., Hernández, I., y Llópez, N. (1996). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: II. Catalasa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 15(2), 1-3.

- Cisneros, E., Balboa, J., y Miranda, E. (1997). Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: III. Glutación peroxidasa. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 16(1), 10-15.
- Cottrell, J., Liu, F., Hung, A., DiGiacomo, K., Chauhan, S., Leury, B., Furness, J., Celi, P., and Dunshea, F. (2015). Nutritional strategies to alleviate heat stress in pigs. *Animal Production Science*, 55(12), 1391-1402. <https://doi.org/10.1071/AN15255>
- Curtis, T., Schindelin, J., Hiner, M., DeZonia, B., Walter, A., Arena, E., and Eliceiri, K. (2017). ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*, 18(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12859-017-1934-z>
- Das, R., Sailo, L., Verma, N., Bharti, P., Saikia, J., Imtiwati, and Kumar, R. (2016). Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. *Veterinary World*, 9(3), 260-268. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.260-268>
- De Conto, C., Oevermann, A., Burgener, I., Doherr, M., and Blum, J. (2010). Gastrointestinal tract mucosal histomorphometry and epithelial cell proliferation and apoptosis in neonatal and adult dogs. *Journal of Animal Science*, 88(7), 2255-2264. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2511>
- Del Vesco, A., Khatlab, A., Goes, E., Utsunomiya, K., Vieira, J., Oliveira, A., and Gasparino, E. (2017). Age-related oxidative stress and antioxidant capacity in heat-stressed broilers. *Animal*, 11(10), 1783-1790. <https://doi.org/10.1017/S1751731117000386>
- Díaz, A. (2003). La estructura de las catalasas. *REB*, 22, 76-84.
- Downing, E., and Miyan, J. (2000). Neural immunoregulation: Emerging roles for nerves in immune homeostasis and disease. *Immunology Today*, 21(6), 281-289. [https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01635-2](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01635-2)

- Driscoll, J., and Ryan, J. (1978). A modified haematoxylin and eosin stain for histological sections of lymph nodes. *Journal of Clinical Pathology*, 31(7), 1.
- Elwert, C., Fernandes, E., and Lemme, A. (2008). Biological effectiveness of methionine hydroxy-analogue calcium salt in relation to DL-methionine in broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 21(10), 1506-1515.
- England, K., O'Driscoll, C., and Cotter, T. (2004). Carbonylation of glycolytic proteins is a key response to drug-induced oxidative stress and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 11(3), 252-260. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401338>
- Faure, M., Moënnnoz, D., Montigon, F., Fay, L., Breuillé, D., Finot, P., Ballèvre, O., and Boza, J. (2002). Development of a rapid and convenient method to purify mucins and determine their in vivo synthesis rate in rats. *Analytical Biochemistry*, 307(2), 244-251. [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(02\)00048-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(02)00048-9)
- Freeman, M., Spitz, D., and Meredith, M. (1990). Does heat shock enhance oxidative stress? Studies with ferrous and ferric iron. *Radiation Research*, 124(3), 288-293. <https://doi.org/10.2307/3577841>
- Freitas, I., Boncompagni, E., Tarantola, E., Gruppi, C., Bertone, V., Ferrigno, A., Milanesi, G., Vaccarone, R., Tira, M. E., and Vairetti, M. (2016). In situ evaluation of oxidative stress in rat fatty liver induced by a methionine- and holine-deficient diet. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 1-14. <https://doi.org/10.1155/2016/930706>
- Ganaie, A., Ghasura, R., Mir, N., Bumla, N., Sankar, G., and Wani, S. (2013). Biochemical and physiological changes during thermal stress in bovines: A review. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 3(3), 423-430.
- García, A. (2002). El envejecimiento y el estrés oxidativo. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 21(3), 178-185.

- Ghezzi, P. (2013). Protein glutathionylation in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(5), 3165-3172. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.009>
- Gomez, L., y Cuevas, D. (2008). Superóxido dismutasa.
- Gupta, M., Kumar, S., Dangi, S. S., and Jangir, B. L. (2013). Physiological, Biochemical and Molecular Responses to Thermal Stress in Goats -. <https://doi.org/10.5455/ijlr.20130502081121>
- Habashy, W., Milfort, M., Rekaya, R., and Aggrey, S. (2019). Cellular antioxidant enzyme activity and biomarkers for oxidative stress are affected by heat stress. *International Journal of Biometeorology*, 63(12), 1569-1584. <https://doi.org/10.1007/s00484-019-01769-z>
- Habeeb, A., Gad, A., and Atta, M. (2018). Temperature-humidity indices as indicators to heat stress of climatic conditions with relation to production and reproduction of farm animals. *International Journal of Biotechnology and Recent Advances*, 1(1), 35-50. <https://doi.org/10.18689/ijbr-1000107>
- Harparkash, K., and Barry, H. (1994). Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Letters*, 350(1), 9-12. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)00722-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)00722-5)
- Harris, I., and De Nicola, G. (2020). The complex interplay between antioxidants and ROS in cancer. *Trends in Cell Biology*, 30(6), 440-451. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.03.002>
- Horowitz, M., and Robinson, S. (2007). Heat shock proteins and the heat shock response during hyperthermia and its modulation by altered physiological conditions.

Progress in Brain Research, 162, 433-446. [https://doi.org/10.1016/S0079-6123\(06\)62021-9](https://doi.org/10.1016/S0079-6123(06)62021-9)

Huynh, T., Aarnink, A., Verstegen, M., Gerrits, W., Heetkamp, M., Kemp, B., and Canh, 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>

Jong, C., Azuma, J., and Schaffer, S. (2012). Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: Prevention of mitochondrial oxidant production. *Amino Acids*, 42(6), 2223-2232. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0962-7>

Junqueira, L. C., Carneiro, J., González, M., Mezzano, G., Abrahamsohn, P., Tenório, T., Fagundes, M., and Gama, P. (2016). *Histología básica. Médica Panamericana*. <http://paltex.paho.org/Publication/Index?publicationId=eff5e107-77a1-438b-89fb-b0a2436bfa89>

Kaewtapee, C., Krutthai, N., and Bunchasak, C. (2016). Effects of supplemental liquid DL-methionine hydroxy analog free acid in diet on growth performance and gastrointestinal functions of piglets. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*, 29(8), 1166-1172. <https://doi.org/10.5713/ajas.15.0579>

Kino, K., and Okumura, J. (1986). The effect of single essential amino acid deprivation on chick growth and nitrogen and energy balances at ad libitum- and equalized-food intakes. *Poultry Science*, 65(9), 1728-1735. <https://doi.org/10.3382/ps.0651728>

Kirkman, H., Galiano, S., and Gaetani, G. (1987). The function of catalase-bound NADPH. *Journal of Biological Chemistry*, 262(2), 660-666.

- Kong, S., Zhang, Y., and Zhang, W. (2018). Regulation of intestinal epithelial cells properties and functions by amino acids. *BioMed Research International*, 2018, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2018/2819154>
- Kumar, A., Singh, G., Kumar, B., and Meur, S. (2011). Modulation of antioxidant status and lipid peroxidation in erythrocyte by dietary supplementation during heat stress in buffaloes. *Livestock Science*, 138(1), 299-303. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.12.021>
- Kumar, Y., Yadav, D., Ahmad, T., and Narsaiah, K. (2015). Recent trends in the use of natural antioxidants for meat and meat products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(6), 796-812. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12156>
- Lawler, J., Barnes, W., Wu, G., Song, W., and Demaree, S. (2002). Direct antioxidant properties of creatine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290(1), 47-52. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6164>
- LeDoux, S., Driggers, W., Hollensworth, B., and Wilson, G. (1999). Repair of alkylation and oxidative damage in mitochondrial DNA. *Mutation Research*, 434(3), 149-159. [https://doi.org/10.1016/s0921-8777\(99\)00026-9](https://doi.org/10.1016/s0921-8777(99)00026-9)
- Lei, X., Zhu, J., Cheng, W., Bao, Y., Ho, Y., Reddi, A., Holmgren, A., and Arnér, E. (2016). Paradoxical roles of antioxidant enzymes: Basic mechanisms and health implications. *Physiological Reviews*, 96(1), 307-364. <https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2014>
- Li, H., Wan, H., Mercier, Y., Zhang, X., Wu, C., Wu, X., Tang, L., Che, L., Lin, Y., Xu, S., Tian, G., Wu, D., and Fang, Z. (2014). Changes in plasma amino acid profiles, growth performance and intestinal antioxidant capacity of piglets following

- increased consumption of methionine as its hydroxy analogue. *British Journal of Nutrition*, 112(6), 855-867. <https://doi.org/10.1017/S000711451400172X>
- Lian, P., Braber, S., Garssen, J., Wichers, H., Folkerts, G., Fink-Gremmels, J., and Varasteh, S. (2020). Beyond heat stress: Intestinal integrity disruption and mechanism-based intervention strategies. *Nutrients*, 12(3), 734. <https://doi.org/10.3390/nu12030734>
- Liu, F., Yin, J., Du, M., Yan, P., Xu, J., Zhu, X., and 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>
- Liu, G., Zong, K., Zhang, L., and Cao, S. (2010). Dietary methionine affect meat quality and myostatin gene exon 1 region methylation in skeletal muscle tissues of broilers. *Agricultural Sciences in China*, 9(9), 1338-1346. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(09\)60224-8](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(09)60224-8)
- Lu, S. (2009). Regulation of glutathione synthesis. *Molecular Aspects of Medicine*, 30(1), 42-59. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.05.005>
- Lu, S. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1830(5), 3143-3153. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>
- Lu, T., Piao, X., Zhang, Q., Wang, D., Piao, X., and Kim, S. (2010). Protective effects of forsythia suspensa extract against oxidative stress induced by diquat in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(2), 764-770. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.12.018>
- Manno, M., Oliveira, R., Donzele, J., Oliveira, W., Vaz, R., Silva, B., Saraiva, E., and Souza, K. (2006). Efeitos da temperatura ambiente sobre o desempenho de suínos

- dos 30 aos 60 kg. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 35(2), 471-477. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000200019>
- Manteca, X. (2012). Bienestar animal. http://www.produccion-animal.com.ar/libros_on_line/51-manual_porcino/08-BuenasPracticasCap8.pdf
- Marí, M., Morales, A., Colell, A., García, C., and Fernández, J. (2009). Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant. *Antioxidants and Redox Signaling*, 11(11), 2685-2700. <https://doi.org/10.1089/ars.2009.2695>
- Marion, J., Biernat, M., Thomas, F., Savary, G., Breton, Y., Zabielski, R., Huërou-Luron, I., and Dividich, J. (2002). Small intestine growth and morphometry in piglets weaned at 7 days of age. Effects of level of energy intake. *Reproduction Nutrition Development*, 42(4), 339-354. <https://doi.org/10.1051/rnd:2002030>
- Martínez, Y., Li, X., Liu, G., Bin, P., Yan, W., Más, D., Valdivié, M., Hu, C., Ren, W., and 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>
- Mehta, S., and Gowder, S. (2015). Members of antioxidant machinery and their functions. *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*, 14, 59-85. <https://doi.org/10.5772/61884>
- Micanor, D., Morales, A., Cervantes, M., Avelar, E., Camacho, R., y Buenabad, L. (2019). Adición de metionina e hidroxianálogo de metionina a dietas para cerdos en estrés por calor. Universidad Autónoma de Baja de California.
- Moeser, A., Borst, L., Overman, B., and Pittman, J. (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., and Hampson, D. (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(1-4), 95-117. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(03\)00163-9](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(03)00163-9)

Montilla, S., Johnson, T., Pearce, S., Gardan, D., Gabler, N., Ross, J., Rhoads, R., Baumgard, L., Lonergan, S., and Selsby, J. (2014). Heat stress causes oxidative stress but not inflammatory signaling in porcine skeletal muscle. *Temperature*, 1(1), 42-50. <https://doi.org/10.4161/temp.28844>

Moore, L., Le, T., and Fan, G. (2013). DNA Methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38(1), 23-38. <https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>

Morales, A., Chávez, M., Vásquez, N., Camacho, L., Avelar, E., Arce, N., Htoo, J. K., and 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., Cota, S., Ibarra, N., Arce, N., Htoo, J., and Cervantes, M. (2016b). Effect of heat stress on the serum concentrations of free amino acids and some of their metabolites in growing pigs. *Journal of Animal Science*, 94(7), 2835-2842. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-0073>

Morales, A., Grageola, F., García, H., Arce, N., Araiza, B., Yáñez, J., and 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>

Morales, A., Hernández, L., Buenabad, L., Avelar, E., Bernal, H., Baumgard, L., and Cervantes, M. (2016c). Effect of heat stress on the endogenous intestinal loss of amino acids in growing pigs. *Journal of Animal Science*, 94(1), 165-172. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9393>

Mujahid, A., Akiba, Y., and Toyomizu, M. (2007). Acute heat stress induces oxidative stress and decreases adaptation in young white leghorn cockerels by downregulation of avian uncoupling protein. *Poultry Science*, 86(2), 364-371. <https://doi.org/10.1093/ps/86.2.364>

Mujahid, A., Pumford, N. R., Bottje, W., Nakagawa, K., Miyazawa, T., Akiba, Y., and Toyomizu, M. (2007). Mitochondrial oxidative damage in chicken skeletal muscle induced by acute heat stress. *Poultry Science*, 44(439-445). <https://pubag.nal.usda.gov/catalog/4706258>

Nisar, N., Sultana, M., Waiz, H., Para, P., and Dar, S. (2013). Oxidative stress—Threat to animal health and production. *International Journal of Livestock Research*, 3(2), 76-83.

NOM-062-ZOO-1999; Ochoa, L. I. (2001). Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. 59.

NRC. (2012). Nutrient requirements of swine: Eleventh revised edition 12th. National Academies Press.

Ooue, A., Ichinose-Kuwahara, T., Shamsuddin, A., Inoue, Y., Nishiyasu, T., Koga, S., and 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>
- Pamok, S., Aengwanich, W., and Komutrin, T. (2009). Adaptation to oxidative stress and impact of chronic oxidative stress on immunity in heat-stressed broilers. *Journal of Thermal Biology*, 34(7), 353-357. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2009.06.003>
- Pearce, S., Sanz, M., Hollis, J., Baumgard, L., and Gabler, N. (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>
- Plitzner, C., Etle, T., Handl, S., Schmidt, P., and Windisch, W. (2008). Effects of different dietary threonine levels on growth and slaughter performance in finishing pigs. *Journal of Animal Science*, 52(No. 12), 447-455. <https://doi.org/10.17221/2334-CJAS>
- Rahman, I., Kode, A., and Biswas, K. (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature Protocols*, 1(6), 3159-3165. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>
- Riedijk, M., Stoll, B., Chacko, S., Schierbeek, H., Sunehag, A., Goudoever, J., and Burrin, D. (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>
- Roca, A. (2011). Efectos del estres calorico en el bienestar animal, una revision en tiempo de cambio climatico. *ESPAMCIENCIA*, 2(1), 15-25.
- Rubbo, H., Radi, R., Trujillo, M., Telleri, R., Kalyanaraman, B., Barnes, S., Kirk, M., and Freeman, B. (1994). Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-

- dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, 269(42), 26066-26075.
- Salami, S., Guinguina, A., Agboola, J., Omede, A., Agbonlahor, E., and Tayyab, U. (2016). In vivo and postmortem effects of feed antioxidants in livestock: A review of the implications on authorization of antioxidant feed additives. *Animal*, 10(8), 1375-1390. <https://doi.org/10.1017/S1751731115002967>
- Sarrasague, M., Barrado, D., Zubillaga, M., Hager, A., Paoli, T., and Boccio, J. (2006). Conceptos actuales del metabolismo del glutatión. 11.
- Schindeldecker, M., and Moosmann, B. (2015). Protein-borne methionine residues as structural antioxidants in mitochondria. *Amino Acids*, 47(7), 1421-1432. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1955-8>
- Segal, A., and Abo, A. (1993). The biochemical basis of the NADPH oxidase of the phagocytes. *Trends in Biochemical Sciences*, 18(2), 43-47. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(93\)90051-N](https://doi.org/10.1016/0968-0004(93)90051-N)
- Shoveller, A., Moehn, S., Rademacher, M., Htoo, J., and Ball, R. (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>
- Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9-10), 916-921. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00177-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00177-X)
- Slimen, I., Najar, T., Ghram, A., and 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>

- Soraci, A., Amanto, F., Harkes, R., Pérez, D., Martínez, G., Diéguez, S., y Tapia, M. (2010). Uso estratégico de aditivos: Impacto sobre el equilibrio y salud gastrointestinal del lechón. *Analecta Veterinaria*, 30(1), 42-53.
- Stadtman, E., and Levine, R. (2000). Protein Oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899(1), 191-208. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb06187.x>
- St-Pierre, N., Cobanov, B., and Schnitkey, G. (2003). Economic losses from heat stress by US livestock industries. *Journal of Dairy Science*, 86, 52-77. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)74040-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)74040-5)
- Takahashi, K., and Cohen, H. (1986). Selenium-dependent glutathione peroxidase protein and activity: Immunological investigations on cellular and plasma enzymes. *Blood*, 68(3), 640-645. <https://doi.org/10.1182/blood.V68.3.640.640>
- Temple, D., Bargo, F., Mainau, E., Ipharraguerre, I., y Manteca, X. (2015). Efecto del estrés por calor en la producción de vacas de leche. *FARM ANIMAL WELFARE EDUCATION CENTRE*, 8, 1-2.
- Tesseraud, S., Coustard, S., Collin, A., y Seilliez, 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>
- Timmons, J., Chang, E., Wang, J., and Rao, J. (2012). Polyamines and gut mucosal homeostasis. *Journal of gastrointestinal & digestive system*, 2(7), 1-20.
- Tobón, E., Pastrana, R., Márquez, H., Matsumura, P., y Ríos, E. (2018). Papel del glutatión reducido (GSH) en el proceso de capacitación espermática (pp. 136-152).
- Troy, R., Bosch, M., Rick, E., Lee, B., Wagner, E., Seidlova, D., Wuttke, W., Scanlan, T., Rønnekleiv, O., and Kelly, M. (2010). Contribution of a membrane estrogen

- receptor to the estrogenic regulation of body temperature and energy homeostasis. *Endocrinology*, 151(10), 4926-4937. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0573>
- Ukeda, H., Sarker, A., Kawana, D., and Sawamura, M. (1999). Flow injection assay of superoxide dismutase based on the reduction of highly water soluble tetrazolium. *Analytical Sciences*, 15(4), 353-357. <https://doi.org/10.2116/analsci.15.353>
- Vásquez, N., Morales, A., Cervantes, M., Barragan, H., Rodríguez, L., y Avelar, E. (2018). Efecto del estrés por calor en la integridad epitelial del cerdo. Universidad Autónoma de Baja de California.
- Venereo, J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina Militar*, 31(2), 126-133.
- Vesco, A., Gasparino, E., Grieser, O., Zancanela, V., Soares, M., and Oliveira, A. (2015). Effects of methionine supplementation on the expression of oxidative stress-related genes in acute heat stress-exposed broilers. *British Journal of Nutrition*, 113(4), 549-559. <https://doi.org/10.1017/S0007114514003535>
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., and Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *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., and 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>
- Weissbach, H., Resnick, L., and Brot, N. (2005). Methionine sulfoxide reductases: History and cellular role in protecting against oxidative damage. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1703(2), 203-212. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2004.10.004>

- Yen, J. (2000). *Anatomy of the digestive system and nutritional physiology*. CRC Press.
<https://doi.org/10.1201/9781420041842.ch3>
- Yin, J., Ren, W., Chen, S., Li, Y., Han, H., Gao, J., Liu, G., Wu, X., Li, T., Kim, W., and Yin, Y. (2018). Metabolic regulation of methionine restriction in diabetes. *Molecular Nutrition and Food Research*, 62(10), 1-9. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700951>
- Young, I., and Woodside, J. (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., and Xu, J. (2010). Effect of heat stress on the porcine small intestine: A morphological and gene expression study. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 156(1), 119-128.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.01.008>
- Zachara, B. (1992). Mammalian selenoproteins. *Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease*, 6(3), 137-151.
- Zeitz, J., Kaltenböck, S., Most, E., and Eder, K. (2017). Antioxidant status and expression of inflammatory genes in gut and liver of piglets fed different dietary methionine concentrations. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(6), 1166-1174. <https://doi.org/10.1111/jpn.12633>
- Zeitz, J., Kaltenböck, S., Most, E., and Eder, K. (2019). Effects of L-methionine on performance, gut morphology and antioxidant status in gut and liver of piglets in relation to DL-methionine. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103(1), 242-250. <https://doi.org/10.1111/jpn.13000>
- Zhang, H., Li, Y., Chen, Y., Ying, Z., Su, W., Zhang, T., Dong, Y., Htoo, J., Zhang, L., and 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., and Wong, E. (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, Q., Fujiwara, Y., and Kondo, T. (2006). Mechanism of cell death induction by nitroxide and hyperthermia. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(7), 1131-1143. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.10.064>