

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



“EFECTO DE SUPLEMENTACIÓN CON PROBIÓTICO EN LA INTEGRIDAD INTESTINAL, CONCENTRACIÓN DE AMINOÁCIDOS, ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y COMPORTAMIENTO DE CERDOS EN ESTRÉS POR CALOR”

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

PRESENTA

FERNANDA GONZÁLEZ ARAGÓN

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ADRIANA MORALES TREJO

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA

JUNIO, 2024

La presente tesis "Efecto de suplementación con probiótico en la integridad intestinal, concentración de aminoácidos, actividad antioxidante, y comportamiento de cerdos en estrés por calor" realizada por la C. Fernanda González Aragón, dirigida por la Dra. Adriana Morales Trejo, ha sido evaluada y aprobada por el Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de: **Doctor en Ciencias Agropecuarias**

Comité Particular

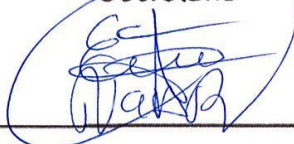


Dra. Adriana Morales Trejo
Directora de Tesis



Dr. Miguel Cervantes Ramirez

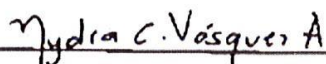
Secretario



Dr. Ernesto Avelar Lozano
Sinodal



Dr. Hugo Bernal Barragán
Sinodal



Dra. Nydia Corina Vásquez Agullar
Sinodal

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a mi asesora, la Dra. Adriana Morales, por haber confiado en mí, aceptarme como su tesista y permitirme ser parte del equipo de trabajo. Estoy eternamente agradecida por todos los consejos, enseñanzas, apoyo incondicional, oportunidades, paciencia y amistad durante los años que he trabajado con usted.

Al Dr. Miguel Cervantes, por compartir todo su conocimiento, resolver nuestras dudas, su confianza y apoyo hacia nosotros. Gracias por sus clases y seminarios tan entretenidos y llenos de aprendizaje.

Al Dr. Ernesto Avelar por ayudarme a mejorar, tanto en mis puntos débiles como en mis conocimientos. Gracias por sus consejos y su forma de hacernos divertir y reír en todos esos momentos que pasamos juntos.

Dr. Hugo Bernal, le quiero agradecer por haberme guiado y apoyado a seguir estudiando, por su confianza, sus enseñanzas y ayuda cuando la necesitaba. Muchas gracias por ser mi mentor desde la licenciatura.

Dra. Nydia Vásquez muchas gracias por tu ayuda, los consejos, enseñanzas y amistad a lo largo de mi posgrado y años que tenemos de conocernos.

A la Dra. Lucero Camacho y Dr. Néstor Arce por ayudarme en la investigación. Gracias por todas sus enseñanzas, apoyo y amistad que hemos formado en estos años de convivencia.

Al M.C. Alfonso de la Mora y al Laboratorio Hema, por habernos brindado su servicio y ayudado con las muestras de histología intestinal.

A mis compañeros del CANA, por su amistad, ayuda y tiempo que le brindaron a esta investigación durante su etapa experimental.

Me gustaría agradecer al Instituto de Ciencias Agrícolas y a la Universidad Autónoma de Baja California por permitir llevar a cabo mi experimento y mis estudios.

Agradezco a Evonik por brindarnos el apoyo económico, enviarnos el probiótico y creer en nuestros esfuerzos para llevar a cabo esta investigación.

A CONACyT por su apoyo económico durante mis estudios de posgrado.

DEDICATORIA

A mis padres, Fernando y Teresa, y mi hermano Emiliano, estoy muy agradecida con el apoyo que he tenido por parte de ustedes. Gracias por creer en mí, por los valores enseñados y alentarme a seguir estudiando y llegar a estar donde estoy.

A mi tía Blanca Lilia, que, a pesar de casi no hablar o vernos, me ayuda siempre cuando necesito algo, apoyándome y guiándome hacia un buen camino.

A mi abuela Elida, gracias por tus enseñanzas, cariño y aprecio.

A Alan, quiero agradecerte la compañía, amistad, confianza y cariño que hemos forjado estos últimos años de conocernos. Gracias por ser mi compañero en esta travesía.

ABREVIATURAS

AA	Aminoácidos
Abs	Absorbancia
CAT	Catalasa
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
D	Efecto por dieta
EC	Estrés por calor
EC-P	Tratamiento en estrés por calor con dieta testigo adicionada con probiótico
EC-T	Tratamiento en estrés por calor con dieta testigo
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
GPX	Glutación peroxidasa
H&E	Hematoxilina y eosina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IgA	Inmunoglobulina A
ITH	Índice de temperatura y humedad
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NADPH	Nicotiamida-Adenina dinucleótido fosfato
P	Dieta testigo adicionada con probiótico
pb	Pares de bases
PUE	Proteínas de unión estrecha
qPCR	Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa
RNA	Ácido ribonucleico
SOD	Superóxido dismutasa
T	Dieta testigo
TA	Temperatura ambiente

TAxD	Efecto de interacción de temperatura ambiente y dieta
TN	Termoneutralidad
TN-P	Tratamiento en termoneutralidad con dieta testigo adicionada con probiótico
TN-T	Tratamiento en termoneutralidad con dieta testigo
U/μl	Unidad por microlitro
UFC/g	Unidades formadoras de colonia por gramo
UI	Unidades internacionales
V:C	Relación vellosidad-cripta
ZO	Zonoccludina

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIA.....	v
ABREVIATURAS.....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	viii
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Alta temperatura ambiental en la producción porcina	4
2.2. Estrés por calor y sus efectos negativos en cerdos	5
2.2.1. Tracto gastrointestinal.....	6
2.2.2. Epitelio intestinal.....	8
2.2.3. Microbiota.....	9
2.3. Estrategias para promover la salud intestinal.....	10
2.4. Probióticos como alternativa ante el estrés por calor	13
2.5. <i>Bacillus subtilis</i>	14
3. HIPÓTESIS	17
4. OBJETIVOS	18
4.1. Objetivo general	18
4.2. Objetivos específicos	18

5. MATERIALES Y MÉTODOS	19
5.1. Lugar del experimento.....	19
5.2. Instalaciones y distribución	19
5.3. Animales, dietas y procedimiento experimental	19
5.4. Colecta de muestras	22
5.5. Análisis de histomorfología intestinal	23
5.6. Medición de vellosidades intestinales	24
5.7. Extracción total de RNA y purificación	26
5.8. Transcripción reversa.....	27
5.9. PCR cuantitativo (qPCR).....	28
5.10. Análisis enzimático.....	30
5.11. Análisis de aminoácidos en suero sanguíneo	33
5.12. Análisis estadístico.....	34
6. RESULTADOS	35
6.1. Temperatura ambiental y humedad relativa	35
6.2. Temperatura intestinal.....	37
6.3. Frecuencia respiratoria.....	38
6.4. Comportamiento productivo	38
6.5. Histomorfología	39
6.6. Expresión relativa de proteínas de unión estrecha	41
6.7. Actividad antioxidante de catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y superóxido dismutasa (SOD)	43
6.8. Concentración de aminoácidos en suero	45
7. DISCUSIÓN	48
7.1. Histomorfología intestinal.....	51

7.2. Expresión relativa de proteínas de unión estrecha	53
7.3. Actividad de enzimas antioxidantes	54
7.4. Concentración sérica de aminoácidos.....	56
8. CONCLUSIONES.....	59
9. BIBLIOGRAFÍA	60

ÍNDICE DE CUADROS

	Cuadro	Página
1.	Composición de las dietas experimentales.	21
2.	Secuencia de los oligonucleótidos para análisis de expresión de mRNA derivados de proteínas de unión estrecha (claudina 2, claudina 3, ocludina y zonoccludina-1) y RPL4.	29
3.	Comportamiento productivo de los cerdos alimentados con una dieta testigo (T) o adicionada con probiótico (P) en condiciones TN o EC.	39
4.	Histomorfología de las vellosidades de intestino delgado de los cerdos alimentados con una dieta testigo (T) o adicionada con probiótico (P) en condiciones TN o EC.	41
5.	Actividad enzimática en suero sanguíneo de los cerdos alimentados con una dieta testigo (T) o adicionada con probiótico (P) en condiciones TN o EC.	43
6.	Concentración de aminoácidos esenciales ($\mu\text{g/ml}$) en suero sanguíneo de los cerdos alimentados con una dieta testigo (T) o adicionada con probiótico (P) en condiciones TN o EC.	46
7.	Concentración de aminoácidos no esenciales ($\mu\text{g/ml}$) en suero sanguíneo de los cerdos alimentados con una dieta testigo (T) o adicionada con probiótico (P) en condiciones TN o EC.	47

ÍNDICE DE FIGURAS

	Figura	Página
1.	Componentes de la barrera intestinal (Adaptado de Natividad y Verdu, 2013).	8
2.	Ejemplo de “Establecer escala” en el programa Image J2.	25
3.	Ejemplo de medición de la altura (flecha roja) y profundidad de las criptas (flecha negra) de una vellosidad.	26
4.	Promedio de la temperatura ambiental (°C) y humedad relativa (%) de los 21 días de experimentación de la sala en TN.	35
5.	Promedio de la temperatura ambiental (°C) y humedad relativa (%) de los 21 días de experimentación de la sala en EC.	36
6.	Promedio del índice de temperatura y humedad de los 21 días de experimentación de las salas (TN y EC) de los cerdos.	36
7.	Temperatura intestinal (°C) de los cerdos en EC con y sin probiótico.	37
8.	Frecuencia respiratoria (eventos/minuto) de los cerdos en condiciones de EC.	38
9.	Microfotografías con objetivo 4X teñidas de H&E de las secciones de duodeno, yeyuno e íleon de cerdos alimentados con una dieta testigo (T) o adicionada con probiótico (P) en condiciones TN o EC.	40
10.	Efecto del probiótico en dietas para cerdos en TN o EC en la expresión relativa de proteínas de unión estrecha en yeyuno e íleon.	42
11.	Actividad enzimática de CAT, GPX y SOD en suero sanguíneo de cerdos alimentados con o sin probiótico en condiciones de EC o TN.	44

RESUMEN

El estrés por calor (EC) afecta negativamente el crecimiento de los cerdos, y a nivel intestinal puede modificar la microbiota e integridad intestinal, lo que podría afectar su salud. La suplementación con probióticos puede ayudar a los animales a mantener un ambiente intestinal saludable. Se realizó un experimento con 80 cerdos (21.6 ± 3.4 kg PV) expuestos a EC o termoneutralidad (TN) para evaluar el efecto de suplementar *Bacillus subtilis* DSM 32540 sobre el rendimiento productivo, integridad intestinal, concentración de aminoácidos (AA) y actividad de enzimas antioxidantes en suero sanguíneo. Los cuatro tratamientos (Trat) fueron: cerdos TN alimentados con una dieta testigo sin (TN-T) o con 2×10^9 UFC de probiótico/g de alimento (TN-P), y cerdos en EC alimentados con dieta testigo sin (EC-T) o con probiótico (EC-P). Al finalizar, ocho cerdos/Trat fueron sacrificados para colectar muestras de intestino delgado para analizar la integridad intestinal, y de sangre para determinar actividad antioxidante y AA libres en suero. Además, diez cerdos alojados en EC, canulados en íleon y provistos con un termómetro implantado que registraba la temperatura intestinal (TI) cada cinco minutos, fueron alimentados con las mismas dietas (cinco cerdos/dieta). La temperatura ambiente dentro de las salas osciló en TN entre 19 y 25 °C y en EC entre 30 y 38.5 °C. La TI en los cerdos EC-P fue más baja que los cerdos EC-T ($P < 0.05$). En TN y EC, la adición del probiótico mejoró la ganancia diaria de peso y conversión alimenticia ($P < 0.05$). Además, el probiótico aumentó la altura de las vellosidades en duodeno e íleon, y la relación vellosidad-cripta mejoró en los tres segmentos del intestino delgado ($P < 0.05$). En yeyuno, el probiótico aumentó la abundancia de claudina 2 en condiciones de TN ($P < 0.05$), pero no en íleon ($P > 0.05$). El EC redujo la concentración sérica de la mayoría de AA esenciales ($P < 0.05$). La actividad antioxidante de glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa se redujo en TN y aumentó en EC por la adición del probiótico ($P < 0.05$). En conclusión, la suplementación con *Bacillus subtilis* (DSM 32540) puede contrarrestar algunos efectos negativos que tiene el EC sobre el rendimiento productivo y la integridad intestinal de los cerdos.

Palabras clave: Estrés por calor, cerdos, probióticos, integridad intestinal.

ABSTRACT

Heat stress (HS) negatively affects pig's growth and, at intestinal level, can modify microbiome and intestinal integrity, which could affect their health. Probiotic supplementation can help animals to maintain a healthy intestinal environment. An experiment was carried out with 80 pigs (21.6 ± 3.4 kg BW) exposed to HS or thermoneutrality (TN) to evaluate the effect of supplementing *Bacillus subtilis* DSM 32540 on growth performance, intestinal integrity, amino acids (AA) concentration and antioxidant enzyme activity in blood serum. The four treatments (Trea) were: TN pigs fed with a control diet without (TN-C) or with 2×10^9 CFU of probiotic /g of feed (TN-P), and HS pigs fed with a control diet without (HS -C) or with probiotic (HS-P). At the end, 8 pigs/Trea were slaughtered to collect small intestine samples to analyze intestinal integrity; and blood to determine antioxidant activity and free AA in serum. Additionally, ten ileal-cannulated pigs, housed in HS and fed with the same diets (five pigs/diet), had an implanted thermometer that recorded intestinal temperature (IT) every five minutes. The ambient temperature inside the room ranged in TN between 19 and 25 °C and in HS room between 30 and 38.5 °C. The IT in HS-P pigs was lower than HS-C pigs ($P < 0.05$). In TN and HS, the addition of probiotic improved daily weight gain and feed conversion ratio ($P < 0.05$). Additionally, probiotic increased villus height in duodenum and ileum, and villus-crypt ratio improved in all three segments of small intestine ($P < 0.05$). In jejunum, probiotic increased the abundance of claudin 2 under TN conditions ($P < 0.05$) but, it did not affect the relative abundance in ileum ($P > 0.05$). HS reduced the serum concentration of most essential AA ($P < 0.05$). The antioxidant activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase was reduced in TN and increased in HS by the addition of probiotic ($P < 0.05$). In conclusion, supplementation with *Bacillus subtilis* (DSM 32540) may counteract some negative effects of HS on performance and intestinal integrity of pigs.

Keywords: Heat stress, pigs, probiotics, intestinal integrity

1. INTRODUCCIÓN

Las pérdidas económicas en la producción animal debido al creciente calentamiento global han resultado en nuevas y más profundas investigaciones relacionadas con afectaciones a los animales provocadas por el estrés por calor (Chen *et al.*, 2022). De estas investigaciones se conoce que los cerdos comienzan a experimentar estrés por calor cuando se exponen a temperatura ambiental elevada, superior a la de su zona termoneutral, que en el caso de cerdos en etapa de crecimiento y finalización está dentro de un rango de 16 – 24 °C (Noblet *et al.*, 1994; Coffey *et al.*, 1995).

Los cerdos en crecimiento y finalización son muy susceptibles a estrés por calor debido a que carecen de glándulas sudoríparas funcionales, alta producción de calor metabólico y acumulación de grasa (Dallaire *et al.*, 1996). El estrés por calor puede inducir diferentes cambios en la fisiología, metabolismo y comportamiento, que pueden debilitar al sistema inmunológico, y afectar la salud y rendimiento productivo en los cerdos (Bernabucci *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2022).

En los animales con estrés por calor suele observarse una redirección de la sangre hacia la periferia, con el objetivo de disipar calor, lo que provoca vasoconstricción en el tracto gastrointestinal (Lambert, 2009). Lo anterior resulta en una reducción del flujo sanguíneo y nutrientes en el intestino, y conduce a hipoxia en epitelio de intestino, que compromete su función e integridad (Xia *et al.*, 2022).

La mucosa y microbiota intestinal son otros componentes importantes de la barrera intestinal que se ven alterados por el estrés por calor (Liu *et al.*, 2009). Se cree que la regulación de la microbiota intestinal podría mediar los efectos negativos del estrés por calor, por medio de: eliminación de patógenos, metabolización de nutrientes no digeridos, regulación del sistema inmunológico, fortalecimiento de la barrera intestinal y mitigación de estrés oxidativo (Macpherson *et al.*, 2017; He *et al.*, 2019).

Existen diferentes estrategias nutricionales que actúan de forma directa o indirecta sobre la regulación de la microbiota intestinal, pero que además tienen

efectos positivos para la salud de los animales, entre las cuales se cuenta la suplementación con prebióticos, probióticos, postbióticos, vitaminas, minerales y extractos herbales (Yue *et al.*, 2020).

Los probióticos son cepas vivas de microorganismos que benefician y ayudan a restaurar el equilibrio de la microbiota intestinal, recuperar la integridad y salud intestinal, y a mejorar la absorción y utilización de nutrientes (Al-Fataftah y Abdelqader, 2014; Liao y Nyachoti, 2017; Markowiak y Śliżewska, 2018). Existen diferentes especies de bacterias utilizadas como probióticos que ofrecen beneficios en la producción porcina, tales como, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces* y *Enterococcus* (Markowiak y Śliżewska, 2018; Barba-Vidal *et al.*, 2019).

Debido a sus diferentes mecanismos de acción, *Bacillus subtilis* podría ayudar a mediar la microbiota intestinal durante el estrés por calor (Su *et al.*, 2020). De acuerdo con Foligné *et al.* (2012) y Elshaghabee *et al.* (2017), estas bacterias producen proteínas antimicrobianas tales como bacteriocinas y surfactinas, e inducen la producción de diferentes citoquinas asociadas a la inflamación. *B. subtilis* germina principalmente en yeyuno e íleon, y ha demostrado mantener una relación favorable en el equilibrio de la microbiota intestinal y mejorar el rendimiento productivo en animales (Kyriakis *et al.*, 1999; Alexopoulos *et al.*, 2004; Kritas y Morrison, 2005). Además, se ha demostrado que la suplementación con *Bacillus* incrementa significativamente el conteo de *Lactobacilli* gastrointestinal y reduce el de *E. coli* patógeno (Adami y Cavazzoni, 1999; Hosoi *et al.*, 1999). Otra ventaja de utilizar *Bacillus subtilis* como probiótico, es que se ofrece en forma de esporas que son resistentes a las condiciones ambientales surgidas durante el tránsito por el tracto gastrointestinal, tales como alta temperatura, bajo pH, presencia de ácidos biliares y pancreatina (Huang y Adams, 2004; Guo *et al.*, 2006).

Se planteó la hipótesis de que las dietas adicionadas con probiótico podrían ayudar a mitigar el impacto del estrés por calor en cerdos. Por ello, el objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la adición del probiótico *Bacillus subtilis* DSM 32540 sobre el rendimiento y función del epitelio intestinal en cerdos estresados por

calor. El presente estudio, se realizó con el objetivo de evaluar el efecto del probiótico sobre el rendimiento productivo, temperatura intestinal, frecuencia respiratoria, integridad del epitelio intestinal, actividad antioxidante y concentración de aminoácidos en suero sanguíneo.

2. ANTECEDENTES

2.1. Alta temperatura ambiental en la producción porcina

La elevación en la temperatura ambiental (TA) ha provocado pérdidas económicas en la última década a nivel global y han sido de gran preocupación, en zonas tropicales y templadas, en las que el incremento en la TA se convierte en un problema durante los meses de verano (Ross *et al.*, 2015). Se prevé que la temperatura global podría aumentar entre 0.8 a 2.6 °C para el 2050 (IPCC, 2013). Este aumento en la TA tendría gran impacto en la producción ganadera, afectando principalmente el bienestar, comportamiento productivo y salud de los animales (Campos *et al.*, 2017).

Más del 50% de la porcicultura a nivel mundial se practica en regiones con clima tropical o subtropical, en las que en los últimos años se incrementado la demanda y consumo de carne de cerdo por habitante (FAO, 2010). Así también, en países como Estados Unidos, Brasil y Australia, entre otros, las pérdidas económicas en la producción porcina por esta causa han sido considerables (St-Pierre *et al.*, 2003). Cuando los cerdos son expuestos a alta TA, mantienen su homeotermia a través de adaptaciones fisiológicas, metabólicas y conductuales que afectan negativamente su crecimiento (Renaudeau *et al.*, 2011).

Estas adaptaciones por la TA elevada impactan en la producción animal reduciendo el consumo voluntario de alimento, mismo que ocurre como un intento del animal para reducir la producción de calor metabólico (Baumgard y Rhoads, 2013); como resultado se afecta el rendimiento del crecimiento, y se reduce la ganancia diaria de peso (Renaudeau *et al.*, 2010).

Además, se observa que los cerdos que fueron criados en condiciones de estrés por calor (EC) presentan menor peso y cambios en la composición de la canal; las canales presentan mayor porcentaje de grasa y tejido adiposo (Collin *et al.*, 2001), se presenta mayor retención de agua, cambian sus propiedades organolépticas y aumenta la concentración de ácido láctico en la canal (Ross *et*

al., 2015; González-Rivas *et al.*, 2020). Esta respuesta, confirma que el EC altera el metabolismo para la partición y uso de nutrientes y energía (Baumgard y Rhoads, 2013); además de que puede involucrar alteraciones en la sensibilidad a insulina en el organismo animal (Sanz-Fernández *et al.*, 2015).

2.2. Estrés por calor y sus efectos negativos en cerdos

Existen diversos estresores que afectan negativamente la producción porcina (Ringseis y Eder, 2022), siendo el EC uno de los más desafiantes en cuanto pérdidas económicas y productividad (Renaudeau *et al.*, 2011).

El EC se define como una serie de cambios en el comportamiento, procesos fisiológicos, inmunológicos y metabólicos en animales expuestos a alta TA (Horowitz *et al.*, 2004; Cervantes *et al.*, 2016). Estas alteraciones dificultan que el cerdo pueda mantener homeostasis, provocando un rendimiento menor en comparación con aquellos que se encuentran en termoneutralidad (TN; Horowitz *et al.*, 2004; Morales *et al.*, 2016; Gourdine *et al.*, 2019). El EC se presenta cuando la TA sobrepasa el rango de TN del cerdo (16 - 25 °C) y la humedad relativa es alta (Holmes y Close, 1977).

Los cerdos son animales susceptibles al EC, debido a que carecen de glándulas sudoríparas funcionales. Como consecuencia, su pérdida de calor mediante evaporación se ve comprometida y su única alternativa es el jadeo (Baumgard y Rhoads, 2013; Cottrell *et al.*, 2015). Además, conforme los cerdos crecen y pasan de la etapa de crecimiento a finalización, se vuelven más susceptibles al aumento de TA, ya que el valor crítico máximo de su zona TN disminuye a 21 °C (Ringseis y Eder, 2022).

El impacto más severo del EC suele observarse en los primeros 10 días de exposición a TA elevada (Cervantes *et al.*, 2016), en este período se observan diversos cambios en su comportamiento, tales como, reducción en el consumo voluntario de alimento y actividad física; además se incrementan sus constantes fisiológicas de frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca, y temperatura corporal

(Wilson y Crandall, 2011; Pearce *et al.*, 2013; Cervantes *et al.*, 2016). Varios de estos cambios tienen como objetivo reducir el calor producido dentro del cuerpo y fomentar la pérdida de calor (Bernabucci *et al.*, 2009).

Así, la constante exposición a altas temperaturas impacta de manera negativa en el rendimiento de los cerdos. En principio, la reducción en el consumo voluntario de alimento se traduce en una reducción en la producción de calor, debido a los procesos de digestión y metabolismo, pero también implica un menor consumo de nutrientes y, en consecuencia, una menor ganancia de peso (Huynh *et al.*, 2005; Pearce *et al.*, 2013; Renaudeau *et al.*, 2014).

2.2.1. Tracto gastrointestinal

En el tracto gastrointestinal, se lleva a cabo la digestión del alimento y la absorción de nutrientes; además se contribuye al equilibrio hídrico, y a la realización de algunas funciones inmunológicas (Ringseis y Eder, 2022). El intestino delgado y el intestino grueso tienen una superficie luminal formada por distintos tipos de células epiteliales cubiertas por capas de mucosa llamada barrera intestinal (Ringseis y Eder, 2022).

La barrera intestinal actúa como defensa física y funcional entre la microbiota intestinal y el torrente sanguíneo, facilitando la absorción de nutrientes, produciendo moléculas antimicrobianas e inmunes y evitando la translocación de microorganismos patógenos y comensales, y moléculas proinflamatorias como: toxinas, antígenos, fármacos y alérgenos que se encuentran en el lumen intestinal (Turner, 2009; Gallo y Hooper, 2012).

Como se mencionó, la barrera intestinal se encuentra formada por una capa de células epiteliales que incluyen enterocitos, células caliciformes formadoras de moco, células de Paneth que sintetizan péptidos antimicrobianos, células enteroendócrinas productoras de hormonas, y células madre intestinales encargadas de la proliferación celular (Camilleri, 2021). Las células epiteliales están estrechamente unidas a través de proteínas de unión estrecha (PUE) que bloquean

el paso de materiales a través del espacio que existe entre células vecinas (paso paracelular; Ringseis y Eder, 2022). En su conjunto, las PUE incluyen a las proteínas transmembrana llamadas claudinas, ocludinas, tricelulinas y otras moléculas de adhesión, que se encuentran unidas a moléculas de andamiaje llamadas zonoccludinas (ZO; *tight junction protein*), las cuales interactúan con las fibras de actina en el citoesqueleto de las células epiteliales (Suzuki, 2020).

El epitelio intestinal está cubierto por una capa de moco (mucina), que cubre la zona apical de las células del epitelio intestinal en el lumen. El lumen alberga la microbiota intestinal, que previene la adhesión de bacterias entéricas patógenas (Ringseis y Eder, 2022). Por debajo de las células que cubren el epitelio, se ubica la lámina propia, en la que se pueden encontrar diversas moléculas inmunológicas como citoquinas, inmunoglobulinas, proteasas y péptidos antimicrobianos. Además, están presentes células de respuesta inmune innatas y adaptativas, tales como células dendríticas, linfocitos, células plasmáticas, neutrófilos, macrófagos, mastocitos (Gallo y Hooper, 2012; Ringseis y Eder, 2022). En la Figura 1 se representan los principales los elementos de la barrera intestinal.

Las PUE y mucina son los componentes principales para mantener homeostasis y salud intestinal (integridad intestinal); si la barrera intestinal pierde su continuidad o integridad, entonces podría incrementarse la permeabilidad a diversos elementos como toxinas, metabolitos y microorganismos de la luz intestinal, y esto asociarse a disbiosis en la microbiota (Karl *et al.*, 2017).

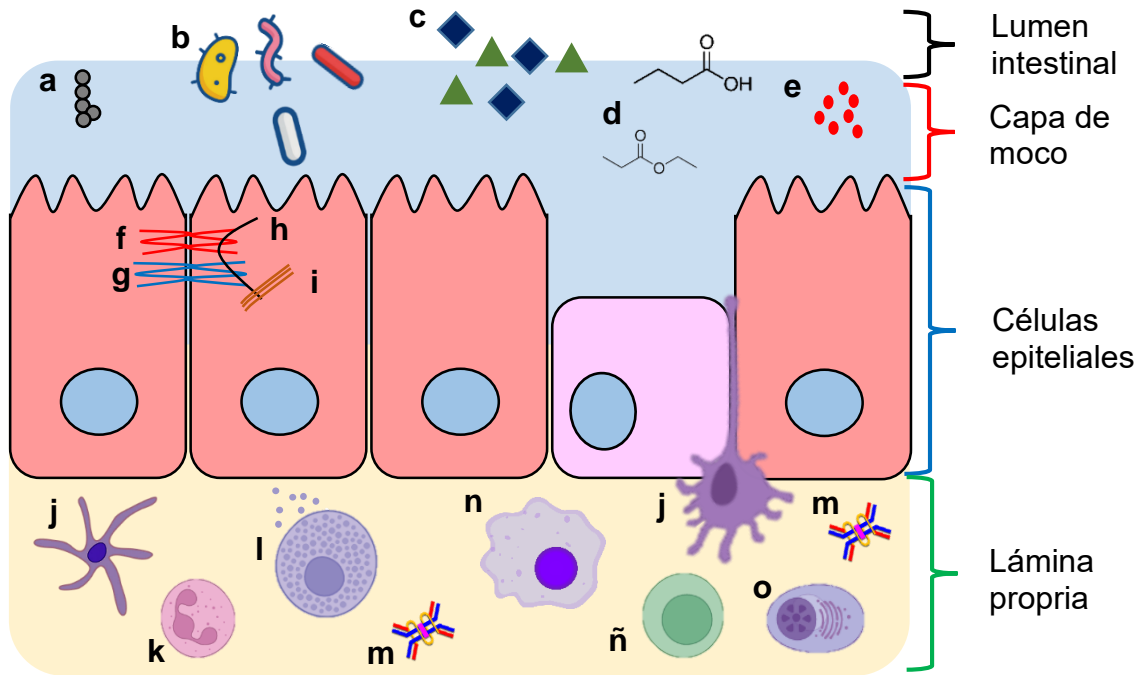


Figura 1. Componentes de la barrera intestinal (Adaptado de Natividad y Verdu, 2013). **a** Lipopolisacárido, **b** bacterias comensales y patógenas, **c** alérgenos, **d** ácidos grasos volátiles, **e** proteínas antimicrobianas, **f** ocludinas, **g** claudinas, **h** ZO-1, **i** actina, **j** célula dendrítica, **k** neutrófilo, **l** mastocito, **m** IgA, **n** macrófago, **ñ** célula T, **o** célula plasmática.

2.2.2. Epitelio intestinal

En general, se sugiere que el EC puede provocar daños y cambios en el tracto gastrointestinal, especialmente la fisiología y morfología del intestino delgado y la integridad de su barrera, el cual se asocia con afectaciones en la producción, salud y bienestar de los cerdos (Mayorga *et al.*, 2020). En primer lugar, la incapacidad del organismo para mantener su temperatura corporal dentro del rango normal de su especie, provoca redireccionamiento de la sangre hacia la periferia del cuerpo (piel), disminuyendo la irrigación en órganos internos como intestino delgado (Lambert, 2009; Xia *et al.*, 2022). En consecuencia, se reduce el aporte de oxígeno y nutrientes que llegan a intestino, lo que puede resultar en hipoxia y atrofia de

células del epitelio intestinal, y afectar la morfología y fisiología del epitelio (Lambert, 2009; Yu *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2022). De esta manera se observa reducción en la longitud de las vellosidades, descamación del epitelio, mayor profundidad en las criptas intestinales, y disminución en el grosor y espesor de la mucosa (Pearce *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2020; Vásquez *et al.*, 2022). Además, se han reportado alteraciones en la proliferación celular (Yu *et al.*, 2010), modificaciones en la expresión de transportadores de glucosa, aminoácidos y otros nutrientes (Sonna *et al.*, 2002; Cervantes *et al.*, 2016), alteraciones en la función de las PUE (Lauridsen, 2019), incremento en la síntesis de proteínas HSP, las cuales responden a estrés térmico (Sonna *et al.*, 2002; Cervantes *et al.*, 2016), e incremento en la cantidad de radicales libres presentes a nivel celular y tisular (Hall *et al.*, 2001). Todo lo anterior mencionado, puede resultar en alteraciones en la permeabilidad intestinal, y dar paso a la entrada de patógenos, endotoxinas bacterianas, lipopolisacáridos, toxinas y alérgenos hacia el torrente sanguíneo, lo que finalmente afecta el estado de salud de los animales (Yu *et al.*, 2010; Le *et al.*, 2020; He *et al.*, 2021).

2.2.3. Microbiota

El tracto gastrointestinal alberga a millones de microorganismos diversos que lo colonizan y participan en la absorción y metabolismo de nutrientes no digeridos, fortalecimiento de la barrera intestinal, reducción de pH intestinal, producción de ácidos grasos volátiles, reciclaje de sales biliares, producción de vitaminas, fermentación de la fracción fibrosa del alimento, estimulación y desarrollo del sistema inmunológico, y eliminación de patógenos (Macpherson *et al.*, 2017; Barba-Vidal *et al.*, 2019). Una eubiosis en el tracto gastrointestinal tiene efecto directo sobre la salud y producción del huésped (He *et al.*, 2021).

En los cerdos, la microbiota intestinal se compone principalmente de dos filos principales: *Firmicutes* y *Bacteroidetes* (Le Sciellour *et al.*, 2019). A lo largo del ciclo productivo de los cerdos, su microbiota varía dependiendo de la etapa de

crecimiento en donde se encuentran, además, se incrementa la diversidad de microorganismos que la componen (Wang *et al.*, 2019).

El equilibrio de la microbiota se altera por diversos factores, tales como cambios ambientales, metabólicos y/o nutricionales, los cuales favorecen la proliferación de microorganismos patógenos (Suva *et al.*, 2016). Esta alteración en la microbiota intestinal se traduce en trastornos funcionales, nutricionales, y de respuesta inflamatoria (Levy *et al.*, 2017). Se ha demostrado que el EC puede provocar alteraciones significativas en la microbiota intestinal, especialmente en los dos filos que la componen: aumentando la abundancia de *Firmicutes* y disminuyendo la de *Bacteroidetes* (Pearce *et al.*, 2013; Le Sciellour *et al.*, 2019). Específicamente, el EC disminuye la abundancia de la familia *Lactobacillaceae* (Le Sciellour *et al.*, 2019), de especies de *Prevotella*, *Streptococcus* (He *et al.*, 2019; Xia *et al.*, 2022), *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* (Hu *et al.*, 2022; Xia *et al.*, 2022) y otras especies de bacterias, que contribuyen a mantener la integridad de la barrera intestinal y a la protección contra patógenos (Ringseis y Eder, 2022). Por otro lado, se ha demostrado que los cerdos que padecen estrés calor tienen mayor abundancia de especies patógenas oportunistas como: *Halomonas spp.* (He *et al.*, 2019), *Staphylococcus spp.* (Xia *et al.*, 2022), así como de los géneros: *Streptococcus* y *Acinetobacter* (Xiong *et al.*, 2022) *Campylobacter*, *Veillonella* y *Lachnospira* (Hu *et al.*, 2022).

2.3. Estrategias para promover la salud intestinal

Actualmente, el objetivo principal de la nutrición consiste en administrar los nutrientes que requieren los animales para su crecimiento y desarrollo; pero para ello también es importante tomar en cuenta el mantenimiento de la salud y combatir o disminuir enfermedades (Markowiak y Śliżewska, 2018).

Como se describió anteriormente, la disbiosis intestinal inducida por el EC puede resultar en daño al epitelio e integridad intestinal, que provoca deterioro en el crecimiento, salud, y bienestar de los animales (Markowiak y Śliżewska, 2018).

Por lo tanto, estrategias nutricionales que mitiguen o contrarresten esta disbiosis son necesarias para aminorar el daño causado por el EC, en especial la integridad y composición de la microbiota intestinal (Cottrell *et al.*, 2015).

En los últimos años, el empleo de antibióticos en la dieta de los animales, inclusive en cerdos en EC, ha sido como promotor de crecimiento, y anteriormente, eran la primera opción para controlar el crecimiento excesivo de patógenos; sin embargo, su uso no regulado e indebido ha generado resistencia microbiana, pérdida de eficacia de medicamentos y afección a la salud (Ma *et al.*, 2021; Sun *et al.*, 2023). En este sentido, han surgido varios productos como alternativas ante los antibióticos que han dado resultados positivos y beneficiosos (Olmos y Paniagua-Michel, 2014)

Algunas alternativas para contrarrestar las consecuencias del EC y uso de antibióticos pudieran ser prebióticos, probióticos, y simbióticos, los cuales permiten regular la población patógena y minimizar la resistencia microbiana (Sun *et al.*, 2023).

Los prebióticos son componentes de alimentos que estimulan la proliferación y actividad de uno o varios microorganismos que se encuentran presentes en tracto gastrointestinal (Gibson y Roberfroid, 1995; FAO, 2007). Pueden tener un gran potencial para modificar la microbiota intestinal, sin embargo, estas modificaciones no son fáciles de predecir (Markowiak y Śliżewska, 2018). Algunos prebióticos, tales como carbohidratos no digeribles, fructooligosacáridos, galactooligosacáridos y mananooligosacáridos, se han utilizado como suplemento en el alimento de los animales como sustrato de crecimiento para bacterias probióticas específicas (Ringseis y Eder, 2022). Por otra parte, los simbióticos son una combinación de probióticos y prebióticos, cuyo objetivo principal es mejorar la supervivencia de los microorganismos del tracto gastrointestinal (Gibson y Roberfroid, 1995). Sin embargo, el uso de ambos aún no ha sido explorado para mejorar los parámetros productivos de los cerdos (Ringseis y Eder, 2022).

Se ha demostrado que la suplementación con prebióticos en lechones destetados tempranamente incrementa la presencia de *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, y *Lactobacillus*, microorganismos benéficos para el tracto gastrointestinal, además de que favorecen las características morfológicas y función de las vellosidades intestinales (Smiricky-Tjardes *et al.*, 2003; Price *et al.*, 2014). Resultados similares fueron observados por Nemcová *et al.* (1999), quienes reportaron que la suplementación de un simbiótico a base de *Lactobacillus paracasei* y fructooligosacáridos aumentaron la población de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en el intestino, y disminuyó la colonización de bacterias patógenas de los géneros *E. coli*, *Enterobacteriaceae* y *Clostridium*.

La suplementación con prebióticos y simbióticos en cerdos con EC aún no ha sido estudiada. Sin embargo, hay algunas investigaciones que muestran que la adición de prebióticos y simbióticos contribuye a atenuar las afecciones causadas por el EC en pollos de engorda (Sohail *et al.*, 2012; Ashraf *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2013). Sohail *et al.* (2012) y Ashraf *et al.* (2013) observaron que los mananoligosacáridos mejoraron el peso corporal, y combinado con una mezcla de bacterias probióticas (simbiótico) mejoraron la función de la barrera intestinal, aumentaron la altura de vellosidades, la relación vellosidad-cripta (V:C) y la cantidad de células caliciformes productoras de moco. Song *et al.* (2013) demostraron que los celooligosacáridos contribuyeron a mejorar el rendimiento productivo de los animales, así como las características morfológicas de su epitelio intestinal. También se incrementó la población de *Lactobacillus*, se redujo la permeabilidad paracelular y la población de *E. coli* y *Clostridium* en yeyuno.

La suplementación con microorganismos probióticos se ha investigado y utilizado en humanos para la prevención y tratamiento de diversas afecciones del tracto intestinal como colitis ulcerosa, intolerancia a la lactosa, síndrome de intestino irritable y úlceras (Markowiak y Śliżewska, 2017). En cambio, el uso de probióticos en la alimentación de los animales, ha sido principalmente para modular su microbiota intestinal (Markowiak y Śliżewska, 2018). En la producción animal, los probióticos pueden incluir una o varias cepas microbianas, entre las que destacan

Lactobacillus, *Bifidobacterium* y *Butyricoccus*, los cuales, son miembros esenciales de la microbiota de la mayoría de los animales de granja y reconocidas por beneficiar la salud intestinal (Xia *et al.*, 2022).

El EC altera el equilibrio intestinal, provocando disminución en la colonización de bacterias benéficas; asimismo, se especula que esta disminución podría ser el primer paso a la alteración de la microbiota, y posteriormente asociarse a inflamación intestinal (Markowiak y Śliżewska, 2018; Xia *et al.*, 2022). Sin embargo, otros factores también influyen en la regulación de su composición, tales como la dieta, restricción calórica, la genética y raza del cerdo, y el ambiente (de Moraes *et al.*, 2017; Mackos *et al.*, 2017).

2.4. Probióticos como alternativa ante el estrés por calor

Los probióticos son cepas vivas de microorganismos que han sido seleccionados para brindar beneficio a la salud del huésped (FAO, 2009). El uso de estos microorganismos en cerdos tiene como objetivos mantener un intestino saludable mediante la regulación de la microbiota intestinal, reducir la colonización por patógenos, incrementar la digestibilidad de nutrientes y mejora el sistema inmunológico y bienestar de los animales (Liao y Nyachoti, 2017; Barba-Vidal *et al.*, 2019).

Los microorganismos probióticos se clasifican en tres grupos principales: productores de ácido láctico (*Streptococcaceae* y *Lactobacillaceae*), levaduras (*Saccharomyces*), y *Bacillus* spp. (Liao y Nyachoti, 2017; Jinno *et al.*, 2022).

En cerdos se han utilizado principalmente microorganismos de los géneros *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, y *Saccharomyces* (Kumar *et al.*, 2012; Yirga, 2015; Markowiak y Śliżewska, 2018). En la mayoría de los estudios, estos probióticos se han suplementado en etapas críticas de la producción del cerdo, en destete y en maternidad (Barba-Vidal *et al.*, 2019).

En cerdos bajo condiciones de EC, las investigaciones son limitadas. Labussière *et al.* (2022) suplementaron *Saccharomyces cerevisiae var boulardii* CNCM I-1079 en cerdos en finalización con EC y observaron mayor consumo de alimento, retención de energía y mejora en la composición de la microbiota intestinal. Otro ejemplo, es el estudio de Gan *et al.* (2013), quienes utilizaron dos cepas, *Lactobacillus acidophilus* y *Saccharomyces cerevisiae*, en lechones destetados en EC y observaron disminución en la abundancia relativa de mRNA que codificaba para las proteínas de choque térmico Hsp70, Hsp27 en hígado, riñones y bazo. El aumento de estas proteínas es un efecto comúnmente asociado al EC (Kiang y Tsokos, 1998).

En comparación con otros microorganismos, se ha demostrado que el género *Bacillus* forma esporas y son termoestables, esto lo hace fácil de manipular para su almacenamiento y procesamiento como aditivo alimenticio (Jinno *et al.*, 2022). *Bacillus* es un género bacteriano muy diverso, y existen antecedentes que respaldan su uso de varias de sus especies como probiótico (Sorokulova, 2013). Algunos de los *Bacillus* más utilizados son: *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. coagulans*, *B. cereus*, *B. clausii* (Elshaghabee *et al.*, 2017). Sin embargo, en los últimos años, la especie *Bacillus subtilis* ha llamado la atención debido a sus características y mecanismos de acción para utilizarlo como suplemento probiótico ante situaciones de estrés (Suva *et al.*, 2016).

2.5. *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis es una bacteria aerobia Gram-positiva perteneciente al filo de *Firmicutes*. Esta bacteria tiene forma de bastón que mide menos de 1 µm de diámetro y entre 2-6 µm de largo (Errington y Aart, 2020). Tiene una temperatura óptima de crecimiento en un rango de 30 a 35 °C y en un plazo corto de tiempo, su reproducción y crecimiento son rápidos (alrededor de 48 h; Errington y Aart, 2020). Además, es capaz de formar cuerpos fructíferos que contienen endoesporas, las cuales, sobreviven en condiciones de temperatura extremas (Errington y Aart, 2020). Además de estas características, es considerada un probiótico multifuncional

ideal por su potencial para prevenir el crecimiento de bacterias patógenas (Olmos *et al.*, 2020). Normalmente como probiótico se produce y administra en forma de endosporas que ingresan al tracto gastrointestinal y se activan de forma rápida (Su *et al.*, 2020). Otra característica de las endosporas es su estabilidad y resistencia ante condiciones de estrés, debido a que pueden sobrevivir en estado de anabiosis y a que cuando hay disponibilidad de nutrientes, vuelven a germinar. Lo anterior favorece su estabilidad en la temperatura, y pH ácido del estómago, y así se mantienen viables para colonizar el intestino (Setlow, 2006). También se ha demostrado que *B. subtilis* puede almacenarse por periodos largos de tiempo sin refrigeración (Olmos y Paniagua-Michel, 2014).

B. subtilis es utilizado en la producción animal como suplemento para ayudar a mejorar la función y microbiota intestinal (Su *et al.*, 2020); y en cerdos, se ha observado que promueve el rendimiento productivo y mejora la salud (Alexopoulos *et al.*, 2004; Markowiak y Śliżewska, 2018).

B. subtilis se distingue por tener una amplia gama de características como: capacidad de hidrolizar y utilizar diferentes metabolitos, tolerancia a la variación de pH, temperatura y salinidad, y capacidad para secretar numerosas enzimas (Errington y Aart, 2020). Además, al ser una bacteria aerobia, esto hace que contribuya a consumir oxígeno existente en el intestino (ambiente anaerobio) que promueve la reproducción de bacterias dominantes en la microbiota, manteniendo el equilibrio en ella (Su *et al.*, 2020).

Se han determinado posibles mecanismos de acción por parte de *B. subtilis*, los cuales incluyen el efecto antimicrobiano mediante síntesis de péptidos antimicrobianos, efecto inmunomodulador, la competencia con patógenos, efecto antiinflamatorio en el intestino y la estimulación del crecimiento de otras bacterias probióticas (Leser *et al.*, 2008).

B. subtilis es conocido por dedicar entre 4 y 5% del genoma a la síntesis de antibióticos y producir cerca de 66 péptidos antibióticos (Olmos y Paniagua-Michel, 2014). Dentro del grupo de agentes antimicrobianos, los que más destacan son

surfactina, subtilina y bacilisina, los cuales, son conocidos por destruir un amplio espectro de patógenos (Su *et al.*, 2020). Estos péptidos son parte del sistema de defensa antimicrobiano de los mamíferos, por lo que no hay preocupación por resistencia microbiana (Suva *et al.*, 2016).

Otra forma de defensa por parte de *B. subtilis* contra los patógenos es mediante la estimulación de inmunidad específica e inespecífica (Suva *et al.*, 2016). Las esporas de *B. subtilis* intervienen en la activación de macrófagos y linfocitos, y, además, pueden modular la inducción de citosinas proinflamatorias (Olmos y Paniagua-Michel, 2014; Sebastián y Keerthi, 2014; Suva *et al.*, 2016). Por otro lado, el *quorum sensing* de *B. subtilis* es capaz de activar vías de supervivencia (Akt y MAP quinasa) en enterocitos de intestino delgado (Fujiya *et al.*, 2007). También se ha registrado que induce proteínas de choque térmico, que protegen a los enterocitos de pérdida de función de la barrera y lesiones, por lo cual, ayuda a mantener una homeostasis intestinal y salud del huésped (Suva *et al.*, 2016). Además, ha sido demostrado que cuando existe pérdida de PUE, *B. subtilis* es capaz de mejorar la función de la barrera al regular positivamente la expresión de las PUE como claudina 1, ocludina y ZO-1, y reducir el daño del epitelio regulando negativamente la expresión de citosinas inflamatorias (Gong *et al.*, 2016)

3. HIPÓTESIS

La adición de un probiótico a base de *Bacillus subtilis* a dietas para cerdos en estrés por calor resulta en la mejora del comportamiento productivo; integridad del epitelio intestinal; concentración de aminoácidos y actividad antioxidante en suero.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Analizar el efecto de la adición de un probiótico a base de *Bacillus subtilis* a dietas para cerdos en estrés por calor en el comportamiento productivo; características morfológicas y expresión de proteínas de unión estrecha del epitelio intestinal; la concentración de aminoácidos y actividad de enzimas antioxidantes en suero sanguíneo.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de alimentar a cerdos en estrés por calor con una dieta adicionada con probiótico a base de *B. subtilis* sobre su temperatura intestinal.
- Evaluar el efecto de la adición del probiótico a base de *B. subtilis* sobre las variables productivas de ganancia diaria de peso, consumo diario de alimento y conversión alimenticia en los cerdos en estrés por calor.
- Analizar el efecto de suplementar con un probiótico a base de *B. subtilis* a los cerdos en estrés por calor, sobre las características morfológicas del epitelio intestinal: altura de vellosidades, profundidad de la cripta y relación altura de vellosidad / profundidad de cripta.
- Evaluar la expresión de RNA mensajero de las proteínas de unión estrecha (claudina 2 y 3, ocludina y zonoccludina 1) en cerdos en estrés por calor alimentados con una dieta adicionada con probiótico a base de *B. subtilis*.
- Analizar la concentración sérica de aminoácidos esenciales y no esenciales de cerdos en estrés por calor alimentados con una dieta adicionada con probiótico a base de *B. subtilis*.
- Determinar la actividad de enzimas antioxidantes (catalasa, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa) en suero de cerdos en estrés por calor alimentados con una dieta adicionada con probiótico a base de *B. subtilis*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Lugar del experimento

El trabajo se realizó en el Laboratorio de Fisiología y Metabolismo Animal del Instituto de Ciencias Agrícolas, UABC. Este Instituto se localiza en carretera a Delta s/n en el Ejido Nuevo León, en Mexicali, Baja California; y su situación geográfica corresponde a 32° 24' latitud Norte y 115° 11' longitud Oeste, con una altitud de 8.2 msnm.

5.2. Instalaciones y distribución

El ensayo se realizó durante los meses de agosto a diciembre del año 2021. La TA en ese año en el estado de Baja California fluctuó entre 21 y 33 °C en el verano, y entre 13 y 26 °C durante el otoño (CONAGUA, 2021). El Laboratorio de Fisiología y Metabolismo Animal cuenta con una nave techada, dividida en dos salas. La sala de TN cuenta con un equipo de aire acondicionado, en esta sala la TA se mantuvo a 22°C; y la sala de EC, no cuenta con aire acondicionado, por lo que se encontraba expuesta a las fluctuaciones naturales de TA. De acuerdo a su peso vivo inicial, los cerdos fueron alojados por parejas en corrales de piso elevado de 1.44 m², equipados con bebedero de chupón y comederos de un solo orificio, a través de ellos se suministró el agua y alimento *ad libitum*.

Las variables de TA y la humedad relativa, al interior de ambas salas, fueron registradas cada hora con un higrómetro (Thermotracker Inc., E.U.A.) durante todo el período experimental.

5.3. Animales, dietas y procedimiento experimental

Los cerdos utilizados en el presente estudio fueron manejados de acuerdo a los lineamientos establecidos en la Norma Oficial Mexicana para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999, 2001).

Para el procedimiento experimental, fueron utilizados 80 cerdos de cruce terminal (Landrace x Hampshire x Duroc); la edad promedio de los cerdos fue de dos meses, y su peso inicial de 21.6 ± 3.4 kg. Los cerdos fueron distribuidos en bloques completos al azar (dos cerdos por unidad experimental) con 10 réplicas en cada grupo; para el bloqueo se consideró el peso vivo inicial, edad y sexo de los animales. Los tratamientos fueron los siguientes: 1) TN, cerdos alojados en una sala con temperatura controlada a 22 °C, y alimentados con una dieta testigo (TN-T); 2) TN, alimentados con la misma dieta, adicionada con probiótico (TN-P); 3) EC, cerdos alojados en una sala expuestos a las variaciones de TA del verano en Mexicali, alimentados con la dieta testigo (EC-T); 4) EC, alimentados con dieta adicionada con probiótico (EC-P). La dieta testigo fue formulada de acuerdo con el NRC (2012) para cubrir los requerimientos nutricionales de cerdos comerciales en el rango del peso corporal de 25-50 kg (Cuadro 1). En la dieta, se incluyeron trigo y pasta de soya como ingredientes mayoritarios, y se suplementaron los aminoácidos sintéticos lisina, metionina y treonina para cumplir sus requerimientos de acuerdo con su digestibilidad ileal estandarizada (NRC, 2012). La dieta con suplementación del probiótico fue elaborada a partir de la dieta testigo, a la cual se le agregó 0.05% de *Bacillus subtilis* DSM 32540, a concentración de 2×10^9 UFC/g. Este nivel suplementario fue el recomendado por el fabricante.

Los animales fueron pesados al inicio del experimento y semanalmente. Además, durante los 21 días de duración del experimento, se registró diariamente el consumo de alimento y con el peso corporal, se estimaron la ganancia diaria de peso, eficiencia alimenticia en cada semana y al final del período experimental. El pesaje de animales y alimento se realizó en una báscula digital (EQM 200, Torrey, México) con capacidad de 200 kg y precisión mínima de 500 g.

Cuadro 1. Composición de las dietas experimentales.

Ingrediente, %	Dieta	
	Testigo	Probiótico
Trigo	76.48	76.48
Pasta de soya, 48 %	20.00	20.00
L-Lisina • HCl	0.39	0.39
L-Treonina	0.14	0.14
DL-Metionina	0.14	0.14
Probiótico	-	0.05
<i>(Bacillus subtilis DSM 32540, 2x10⁹ UFC/g)</i>		
Almidón de maíz	0.05	-
Carbonato de calcio	1.25	1.25
Fosfato dicálcico	0.80	0.80
Sal iodada	0.35	0.35
Premezcla de vitaminas y minerales ^a	0.40	0.40

^a Por kg de dieta suministró: vitamina A, 4,800 UI; vitamina D3, 800 UI; vitamina E, 4.8 UI; 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.

Simultáneamente se realizó un ensayo adicional para determinar la temperatura corporal en el intestino (TI), y la frecuencia respiratoria de los cerdos. En el ensayo se emplearon 10 cerdos (25.0 ± 2.6 kg) de cruce terminal (Landrace x Hampshire x Duroc), cinco hembras y cinco machos, y a cada uno de ellos se les adaptó quirúrgicamente una cánula tipo “T” en íleon distal (Sauer y Ozimek, 1986). Posterior a su cirugía, los cerdos se alojaron de forma individual y estuvieron en recuperación por 14 días en condiciones TN (24 °C). Después de la etapa de recuperación, los animales fueron distribuidos completamente al azar, bloqueados

por su peso vivo y sexo, para recibir 1200 g diarios de la dieta testigo o la dieta adicionada con probiótico.

Durante el ensayo, los cerdos estuvieron en condiciones de EC por 7 días. A cada cerdo se le introdujo un termógrafo (Thermotracker BT, iButtonLink Technology, Whitewater, W) a través de la cánula, programado para leer la temperatura intestinal cada 10 minutos durante 7 días. Los termógrafos se encontraban dentro del íleon en una bolsa de tela cerrada (2 x 3 cm) atada al tapón de la cánula. Además, se les midió la frecuencia respiratoria de los cerdos a las 0700 h (la temperatura más baja del día) y a las 1700 h (la temperatura más alta del día).

5.4. Colecta de muestras

Al final del experimento los cerdos fueron ayunados por 12 horas antes del sacrificio que se realizó el día 22. Ocho cerdos de cada tratamiento (n= 24) fueron sacrificados por aturdimiento con un bastón eléctrico (Aturdidor Best & Donovan, Cincinnati, Ohio, EEUU) durante 3 segundos con voltaje de 630 V. Posteriormente se realizó el desangrado (Cervantes *et al.*, 2016). Durante el sangrado se colectó sangre en tubos estériles, sin anticoagulante (BD Vacutainer, Franklin Lakes, NJ, EEUU), estas muestras se utilizaron para análisis de AA y actividad enzimática en suero sanguíneo. Enseguida, se retiraron las vísceras y se colectaron muestras de duodeno, yeyuno e íleon.

Se colectaron muestras de mucosa de yeyuno e íleon para análisis de expresión de PUE, utilizando portaobjetos estériles para raspar la mucosa y almacenarlas en microtubos de 2 ml. Una vez finalizado el raspado y para mantener su integridad, inmediatamente al término del raspado de mucosa las muestras colectadas se congelaron en un termo que contenía nitrógeno líquido.

Para analizar la histomorfología intestinal, se colectaron fragmentos de 30 cm (aprox.) de cada segmento del intestino delgado que fueron lavadas con solución salina. Posteriormente, se realizaron cortes longitudinal y transversal de 10 cm por

segmento del intestinal, los cuales, se fijaron con formol bufferado al 10% dentro de tubos de 50 ml, que fueron mantenidos a temperatura ambiente hasta que se procedió con el análisis histológico.

Para salvaguardar la integridad del material biológico recolectado, toda la colecta de muestras desde el sacrificio hasta la toma de la última muestra de intestino delgado siempre tuvo una duración menor a 10 minutos. Las muestras de mucosa, tejido y sangre se llevaron al Laboratorio de Biología Molecular y Nutrigenómica del Instituto de Ciencias Agrícolas, UABC. Las muestras de mucosa que se encontraban en nitrógeno líquido fueron mantenidas en un ultra congelador a -80 °C para su posterior análisis.

Los tubos con sangre fueron centrifugados (Megafuge 1.0 Centrifuge, Baxter Scientific Heraeus Instruments, Thermo Scientific, CA, EEUU) durante 10 minutos a 3000 x g y a 4 °C. Al final se colectó el suero en dos criotubos de 2 ml utilizando pipetas de transferencia estériles y desechables. De las muestras de suero se emplearon 1 ml para análisis de AA en suero, y 2 ml para análisis de actividad enzimática, todos los sueros fueron almacenados en congelación a -20 °C hasta su procesamiento.

5.5. Análisis de histomorfología intestinal

Para el análisis histomorfológico se utilizaron las muestras de las tres secciones de intestino preservadas en formol. Se utilizó el método de parafinación estándar, y tinción con hematoxilina y eosina (H&E; Luna, 1968).

Para procesar las muestras, se realizaron cortes transversales y longitudinales de cada segmento intestinal. Los cortes se acomodaron en una cápsula histológica y se identificaron con el número de animal y segmento intestinal, antes de ser trasladadas dentro de un recipiente plástico con formol bufferado. El siguiente proceso fue llevado a cabo por el anatomopatólogo M.C. Alfonso de la Mora Valle en Laboratorio Hema Diagnóstico Veterinario SC en Mexicali, Baja California.

Para su procesamiento histológico, los tejidos en las cápsulas se deshidrataron en baños con concentraciones crecientes de etanol en un procesador de tejidos automático con sistema de vacío. Posteriormente, las muestras fueron aclaradas con xilol, embebidas en parafina. Después, las muestras se cortaron en un microtomo para obtener segmentos de 4 μm de espesor (aprox.). Al hacer los cortes, éstos caían y flotaban en un baño María con agua entre 40 y 45 °C y, posteriormente se colectaron y colocaron en portaobjetos. Los portaobjetos con los cortes fueron desparafinados con xilol e hidratados con una serie de soluciones a concentraciones decrecientes de etanol. Se concluyó el procedimiento con la tinción con hematoxilina-eosina, H&E. Los cortes teñidos se sellaron con resina sintética y se cubrieron con un cubreobjetos, dejando reposar antes de observarlos en el microscopio.

Los cortes histológicos se observaron con un microscopio óptico de la marca Primo Star Zeiss (Zeiss, México). Se tomaron fotografías con una cámara digital VE-LX1000 de la marca VELAB montada en el microscopio para visualizar las vellosidades y criptas de las tres secciones de intestino delgado con el objetivo 4X.

5.6. Medición de vellosidades intestinales

Se midió la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas en las imágenes de cada segmento del intestino delgado en cada animal, las cuales fueron cargadas en una computadora. Para las mediciones se utilizó el software Image J2 (Curtis *et al.*, 2017), con una escala en la que se convirtieron las mediciones de píxeles a milímetros.

Para establecer la escala de medición se abrió la imagen de una regla observada bajo el microscopio que tenía marcados los mm, posteriormente, se utilizó el comando Ctrl + O para seleccionar la imagen y descargarla en el programa. Para establecer la escala, se seleccionó la longitud de un mm a otro (distancia en píxeles), con la opción “Línea” en la barra de herramientas. Posteriormente, con la opción de “Establecer escala”, dentro de la sección de “Analizar” de la barra de

herramientas, se registró un 1 en la distancia conocida, mm en la unidad de longitud, y se marcó la opción “Global” (Figura 2).

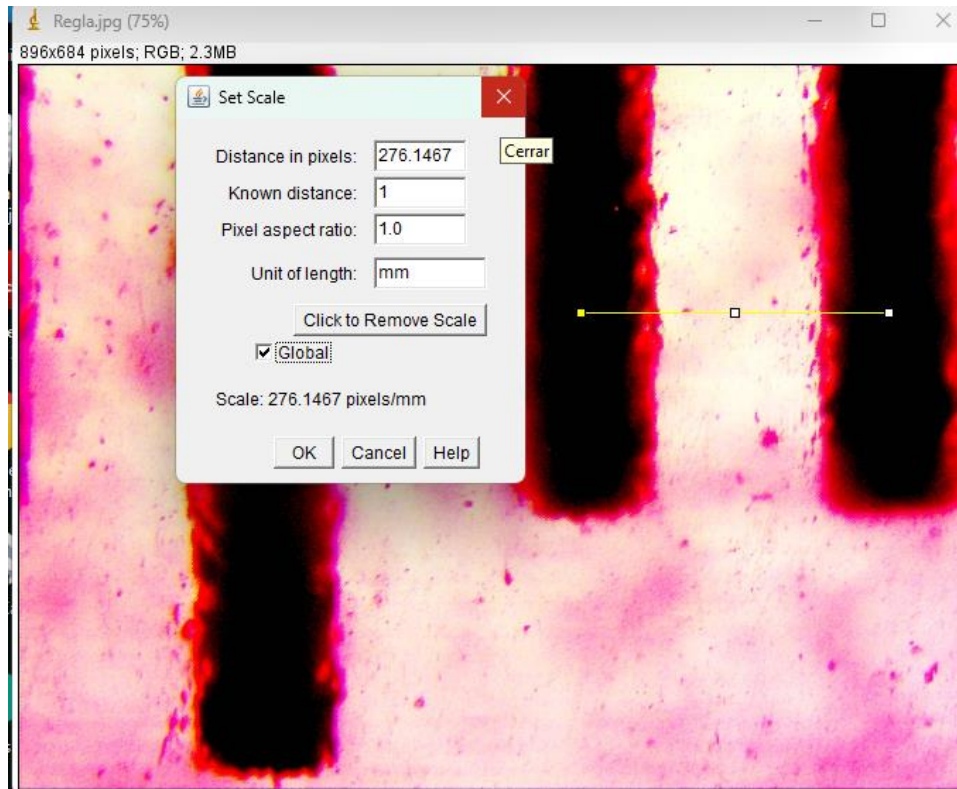


Figura 2. Ejemplo de “Establecer escala” en el programa Image J2.

Una vez que se estableció la escala, se realizó la medición de longitud de las vellosidades (Figura 3), se utilizó el comando Ctrl + M, abriendo una lista con las mediciones realizadas que fueron copiadas a un archivo de Excel (Microsoft Office, 2013) para su análisis estadístico posterior. Al menos se consideraron para su medición 10 vellosidades íntegras y uniformes con forma de dedo, y sus dos criptas correspondientes, por cada muestra de segmento de cada animal. Con estas dos variables se estimó la relación V:C.

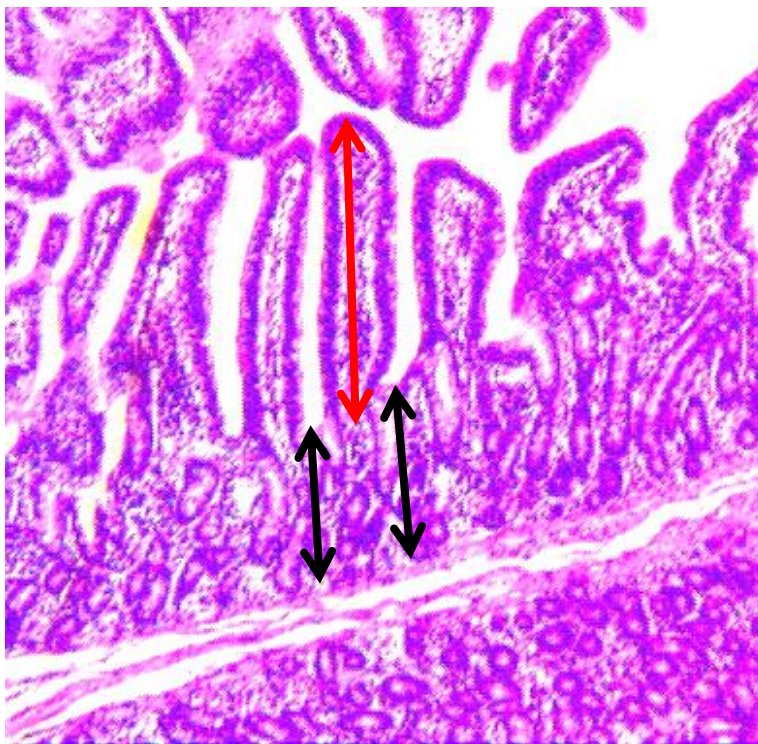


Figura 3. Ejemplo de medición de la altura (flecha roja) y profundidad de las criptas (flecha negra) de una vellosidad.

5.7. Extracción total de RNA y purificación

El análisis de expresión del RNA mensajero de las PUE en mucosa intestinal se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Nutrigenómica de este Instituto. Las muestras de mucosa que se encontraban congeladas (-80 °C), se pulverizaron en nitrógeno líquido con un mortero congelado.

Con las muestras pulverizadas, se realizó la extracción de RNA total con el kit comercial Direct-zol RNA Microprep Kit, marca Zymo Research (R2052, Zymo Research, Irvine, CA, EEUU), siguiendo el protocolo descrito por el proveedor. La extracción comenzó con 50 mg del tejido pulverizado colocado en un microtubo con 550 µl de reactivo TRIzol Reagent (Invitrogen, Corp.). La muestra se homogenizó y se incubó en hielo por dos minutos, posteriormente se centrifugó (Micro21R, Thermo Scientific, CA, EEUU) a 10,000 x g durante 2 minutos, en caso de no formarse bien

la pastilla al fondo del tubo, se centrifugó un minuto extra. Se recuperó el sobrenadante en otro microtubo, sin tocar la pastilla de ácido nucleico formada en el fondo del tubo. Después, se le añadieron 500 µl de etanol al 100% y se agitó. La mezcla fue transferida a una columna con tubo de colección y se centrifugó durante 1 min a 10,000 x g. A continuación, se desechó el sobrenadante que se encontraba en el tubo colector y se añadieron 400 µl de buffer de prelavado para RNA (Prewash buffer) a la columna que se centrifugó nuevamente un min a 10,000 x g, y se desechó el sobrenadante, este paso se realizó dos veces. Después, se agregaron 700 µl de buffer de lavado (RNA Wash Buffer) a la columna y durante 2 minutos se centrifugó a 10,000 x g. A continuación, la columna fue transferida a un tubo de 1.5 ml libre de RNasa, se le añadieron 30 µl de agua libre de nucleasas a la columna para recuperar el RNA y se centrifugó durante 1 min a 10,000 x g. La columna se desechó y el RNA purificado se almacenó a -80°C.

La integridad del RNA total se evaluó por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, y su concentración se determinó con un espectrofotómetro (Genesys 50, Thermo Fisher Scientific) a 260 y 280 nm, definiendo la pureza del RNA cuando la relación de A260/A280 quedara dentro del rango de 1.8-2.0 (Sambrook y Russell, 2001).

5.8. Transcripción reversa

El RNA recién purificado fue tratado con DNAasa antes de iniciar la transcripción reversa. A 2 y 3 µl de RNA total se le agregaron 0.50 U de DNasa I (Invitrogen), 6 µl de buffer de transcripción reversa al 5X y 20.50 µl de agua libre de nucleasas. Esta reacción se llevó a cabo por 15 minutos a TA y posteriormente a 70°C por 5 minutos para inactivar la enzima.

Después, se añadió 1 µl de hexaprimers al azar (50 ng/µl, Thermo Fisher Scientific) y 1 µl de nucleótidos trifosfatados (dNTP's a concentración de 10 µM cada uno). La reacción se incubó por 5 minutos a TA y se reposó en hielo por un minuto antes de añadir 3 µl de agua libre de nucleasas, 2 µl del buffer de transcripción

reversa al 5X y 1 μ l de inhibidor de ribonucleasa (40 U/ μ l, RiboLock RNase Inhibitor, Thermo Fisher Scientific). Esta mezcla fue incubada por 2 minutos a 42°C y luego se añadió 1 μ l de enzima de transcriptasa reversa (200 U/ μ l; RevertAid H Minus RT, Thermo Fisher Scientific). La retrotranscripción se incubó a 42°C durante 50 min y, posteriormente a 70°C por 15 minutos para inactivar la enzima y detener la reacción en hielo. Los productos de reacción (cDNA) se almacenaron a -20°C. Los cDNA se cuantificaron con el espectrofotómetro (Genesys 50, Thermo Fisher Scientific) y se prepararon diluciones a concentración de 50 ng/ μ l.

5.9. PCR cuantitativo (qPCR)

Se diseñaron oligonucleótidos específicos de cada PUE (Claudina 2, Claudina 3, Ocludina, y Zonoccludina 1), y de proteína ribosomal 4 (RPL4) de acuerdo a sus secuencias reportadas en Genbank. Se utilizó como gen de referencia el gen de RPL4 para normalizar las variaciones en el mRNA. Las secuencias de los oligonucleótidos se presentan en el Cuadro 2.

La expresión relativa de las PUE en yeyuno e íleon, se analizó por reacción en cadena de polimerasa cuantitativa (qPCR). Para llevar a cabo su amplificación y cuantificación, se empleó el kit comercial Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas Corp., Glen Burnie, MD, EEUU). Las reacciones de amplificación se realizaron con un termociclador de tiempo real CFX96 Touch, versión 3.0 (Bio-Rad, Herefordshire, England).

El volumen final de cada reacción de qPCR fue de 25 μ l, éstas incluyeron 8.5 μ l de agua libre de nucleasas, 12.5 μ l de SYBR Green Mix, 3 μ l de oligo Mix (5 μ M de cada oligonucleótido) y 1 μ l de cDNA con una concentración de 50 ng/ μ l. Todas las muestras al igual que el gen de referencia se analizaron por duplicado.

Cuadro 2. Secuencia de los oligonucleótidos para análisis de expresión de mRNA derivados de proteínas de unión estrecha (claudina 2, claudina 3, ocludina y zonoccludina-1) y RPL4.

mRNA	Oligo-nucleótidos	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplicon (pb)
Claudina 2, (GenBank: NM_001161638.1)	Sentido	ATCTAGCGCCATCTCCTCGT	319
	Antisentido	GGAGCGATTTCTTGCAGTG	
Claudina 3, (GenBank: NM_001160075.1)	Sentido	TCCTCGTGTCCGTCTATCCG	385
	Antisentido	TGTGATAATGCTGCTGCCGA	
Ocludina, (GenBank: NM_001163647.2)	Sentido	ATTTATGACGAGCAGCCCCC	274
	Antisentido	ACGCCTCCAAGTTACCACTG	
Zonoccludina-1, (GenBank: XM_021098860.1)	Sentido	TGGCGCTACAAGTGATGACC	289
	Antisentido	CGCTTGTGGTGAGTAGGGAG	
RPL4, Proteína Ribosomal L4 (GenBank: DQ84576.1)	Sentido	GCGTAAAGCTGCTACCCTCA	221
	Antisentido	GAATGGTGTTTCGGCGCATT	

En cada ensayo se utilizaron tres blancos, por duplicado que contenían lo siguiente:

- 1) Reactivos de PCR sin DNA
- 2) Reactivos de PCR sin oligo Mix
- 3) Reactivos de PCR sin SYBR Green Mix

El programa de amplificación de las reacciones de qPCR fue el siguiente:

- 1) Desnaturalización inicial y activación del ADN polimerasa a 95 °C durante 5 minutos.

- 2) Amplificación con 40 ciclos: desnaturalización a 95°C por 15 segundos, alineación de oligonucleótidos a 58°C por 15 segundos, y extensión de las cadenas a 72°C por 30 segundos.
- 3) Curva de desnaturalización de 65°C a 95°C.

La fluorescencia del SYBR Green fue medida al final de cada ciclo de amplificación y cada 0.5 °C durante la curva de desnaturalización.

La expresión relativa de los mRNA de las PUE fue calculada de acuerdo a Livak y Schmittgen (2001), con el gen de RPL4 para normalizar el resultado de expresión; se consideró la ecuación $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los resultados obtenidos se utilizaron para comparar los tratamientos TN-P, EC-T y EC-P con el tratamiento TN-T.

5.10 Análisis enzimático

Se midió la actividad enzimática de superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT) en las muestras de suero sanguíneo, empleando kits comerciales para pruebas ELISA de la marca Cayman Chemical.

Antes del análisis, las muestras de suero fueron descongeladas en frío (sobre una cama de hielo) y se centrifugaron a 10,000 x g por 15 minutos. Posteriormente, se removió lo más posible la capa blanca (leucocitos) que se formó en la parte superior de las muestras. Para el análisis de CAT, las muestras de suero no se diluyeron. En los análisis de GPX se diluyeron las muestras en una relación 1:2 con buffer de muestra (incluido en el kit), y en el análisis de SOD, se diluyeron en una relación 1:5 con buffer de muestra.

5.10.1. Actividad de catalasa

Para analizar la actividad de la enzima CAT (EC 1.11.1.6; oxidoreductasa 2H₂O₂) el primer paso fue diluir y/o reconstituir los reactivos del kit, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se utilizó el plato estéril de 96 pozos que incluye el kit

para hacer la reacción. Todas las muestras, los estándares y el control positivo se analizaron por duplicado.

En cada pozo a utilizar se le agregaron 100 µl de buffer de ensayo, 30 µl de metanol y 20 µl de muestra. En los estándares y control positivo se agregaron a la reacción sus reactivos correspondientes. En el plato fueron utilizadas las primeras dos columnas exclusivamente para el estándar de formaldehído y control positivo:

- 1) Pozos de la A – G para estándar de formaldehído con 20 µl de una dilución de buffer de muestra y diferentes concentraciones de formaldehído (0, 5, 15, 30, 45, 60 y 75 µM)
- 2) Pozos H para control positivo con 20 µl catalasa control

La reacción inició agregando 20 µl de peróxido de hidrógeno y se incubó por 20 minutos a TA en agitación. Después, se añadieron 30 µl de hidróxido de potasio y 30 µl de CAT Purpald. La reacción se dejó incubando por 10 minutos a TA en agitación. Pasado el tiempo correspondiente, se le agregó 10 µl de periodato de potasio catalasa a cada muestra y se incubó por otros 5 minutos. Por último, se leyó la absorbancia (Abs) a 540 nm en el lector de ELISA (Multiskan EX, Thermo Scientific) y se imprimieron los resultados.

Para determinar la actividad de catalasa, se calcularon los promedios de las Abs de los estándares (pozos A-G de las columnas 1 y 2) y de las muestras. Después, se restó el promedio de la Abs del estándar A con la misma (A-A, B-A, C-A...) y las muestras (Muestra – A) para obtener la Abs corregida. Se graficó esta Abs corregida de los estándares en función de su concentración final de formaldehído y se calculó la concentración de formaldehído de las muestras, utilizando la siguiente ecuación obtenida de la regresión lineal de la curva estándar, sustituyendo la Abs corregida:

$$\text{Formaldehído } (\mu\text{M}) = \left(\frac{\text{Abs} - (\text{y-intercepto})}{\text{pendiente}} \right) \times \frac{0.17 \text{ ml}}{0.02 \text{ ml}}$$

Por último, se calculó la actividad de CAT usando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad de CAT} = \frac{\mu\text{M de la muestra}}{20 \text{ minutos}} \times \text{Dilución de la muestra} = \text{nmol/min/ml}$$

5.10.2. Actividad de glutatión peroxidasa

Para analizar la actividad de la enzima GPX (EC 1.11.1.9), el primer paso fue diluir y/o reconstituir los reactivos del kit, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En este análisis las reacciones fueron llevadas a cabo en microtubos de 1.5 ml. Todas las muestras, el blanco (background) y el control positivo se analizaron por duplicado.

En los microtubos se añadieron 50 μl de buffer de ensayo, 50 μl de mezcla de co-sustrato, 50 μl de NADPH y 20 μl de muestra. Para el blanco, se añadieron 70 μl de buffer de ensayo, 50 μl de mezcla de co-sustrato y 50 μl de NADPH. Para el control positivo, se añadieron 50 μl de buffer de ensayo, 50 μl de mezcla de co-sustrato, 50 μl de NADPH y 20 μl de GPX diluido (control). La reacción inició añadiendo 20 μl de hidroperóxido de cumeno y se homogenizó la mezcla. Posteriormente se leyeron las Abs a 340 nm con el espectrofotómetro (Genesys 50, Thermo Fisher Scientific) cada minuto, hasta obtener 5 puntos del tiempo. La Abs inicial debía estar en el rango de 1.2 – 0.5.

Para determinar la actividad de GPX, se graficaron los valores de la Abs en función del tiempo en el que se midió para obtener la pendiente de la curva. Se graficaron los valores de la Abs de las muestras, el blanco (background) y controles positivos. Posteriormente se corrigió la tasa Abs/min, restando la pendiente que se obtuvo de la muestra menos la pendiente del blanco (background).

Por último, se calculó la actividad de GPX usando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad GPX} = \frac{\text{Abs/ min corregida}}{0.00373 \mu\text{M}^{-1}} \times \frac{0.19 \text{ ml}}{0.02 \text{ ml}} \times \text{Dilución de muestra} = \text{nmol/min/ml}$$

5.10.3. Actividad de superóxido dismutasa

Para analizar la actividad de la enzima SOD (EC 1.15.1) el primer paso fue diluir y/o reconstituir los reactivos del kit, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se utilizó un plato estéril con capacidad de 96 pozos que incluye el kit. Todas las muestras y el estándar se analizaron por duplicado.

En cada pozo se le agregaron 200 µl de detector de radicales y 10 µl de muestra en cada pozo. En el estándar se agregaron a la reacción los reactivos correspondientes. En el plato se utilizaron las primeras dos columnas exclusivamente para el estándar SOD: Pozos de la A – G para estándar SOD con 10 µl de una dilución de buffer de muestra y diferentes concentraciones de estándar SOD (0, 0.005, 0.010, 0.020, 0.030, 0.040 y 0.050 U/ml).

La reacción inició añadiendo 20 µl de xantina oxidasa a todos los pozos, se mezcló con cuidado y se incubó por 30 minutos en agitación a TA. Posteriormente, se leyó la Abs a 440 nm y a 460 nm en el lector de ELISA (Multiskan EX, Thermo Scientific) y se imprimieron los resultados.

Para determinar la actividad de SOD, se calcularon los promedios de Abs del estándar (pozos A-G de las columnas 1 y 2) y de las muestras. Después, se dividió el promedio de la Abs del estándar A con la misma (A/A, A/B, A/C...) y las muestras (A/Muestra) para obtener la Abs corregida. Se graficó la Abs corregida del estándar en función de la actividad final de SOD y se calculó la actividad de SOD en las muestras, utilizando la siguiente ecuación de la regresión lineal de la curva estándar, sustituyendo la Abs corregida:

$$\text{SOD (U/ml)} = \left(\frac{\text{Abs} - (\text{y-intercepto})}{\text{pendiente}} \right) \times \frac{0.23 \text{ ml}}{0.01 \text{ ml}} \times \text{Dilución de la muestra}$$

5.11. Análisis de aminoácidos en suero sanguíneo

Los tubos con 1 ml de suero se liofilizaron en una liofilizadora Labconco (Llames y Fontaine, 1994). Al terminar el proceso de liofilización, las muestras de

suero se enviaron al laboratorio de análisis químicos de la Universidad de Missouri, USA, en donde se determinó la concentración de AA mediante cromatografía líquida de alta resolución de intercambio iónico (*HPLC*), mediante el método 98.30 de la AOAC (2005).

5.12. Análisis estadístico

Los análisis de varianza de los datos obtenidos fueron realizados de acuerdo con el diseño experimental de Bloques Completos al Azar con un arreglo factorial 2x2, analizando los factores de: TA, la dieta (D) y su interacción (TAxD). Las diferencias de medias se evaluaron con un nivel de significancia de $P < 0.05$. Cuando se encontró significativa la interacción ($P < 0.05$), se construyeron dos contrastes no ortogonales para analizar el efecto del probiótico dentro de cada TA (TN-T vs. TN-P y EC-T vs. EC-P). El programa estadístico utilizado fue Statistix 10 (Statistix Analytical Software, Tallahassee, FL, USA).

6. RESULTADOS

6.1. Temperatura ambiental y humedad relativa

En la sala TN el promedio de TA fue de 21.7 °C y la humedad relativa de 68%. La temperatura mínima dentro de la sala TN fue de 17.8 °C a las 0700 h y la máxima de 26.5 °C a las 1600 h. La máxima humedad relativa se alcanzó a las 0800 h con 80.3%, y la mínima de 47% a las 1500 h (Figura 4). Dentro de la sala EC el promedio de TA fue de 28.0 °C y la humedad relativa de 46%. La temperatura mínima dentro de la sala EC fue de 19.8 °C a las 0600 h y la máxima de 36.1 °C a las 1500 h. La humedad relativa máxima se alcanzó a las 0500 h con 69.0% y la mínima de 21.5% a las 1500 h (Figura 5). El promedio de los índices de temperatura y humedad calculados fueron de 74 para TN y 84 para EC (Figura 6).

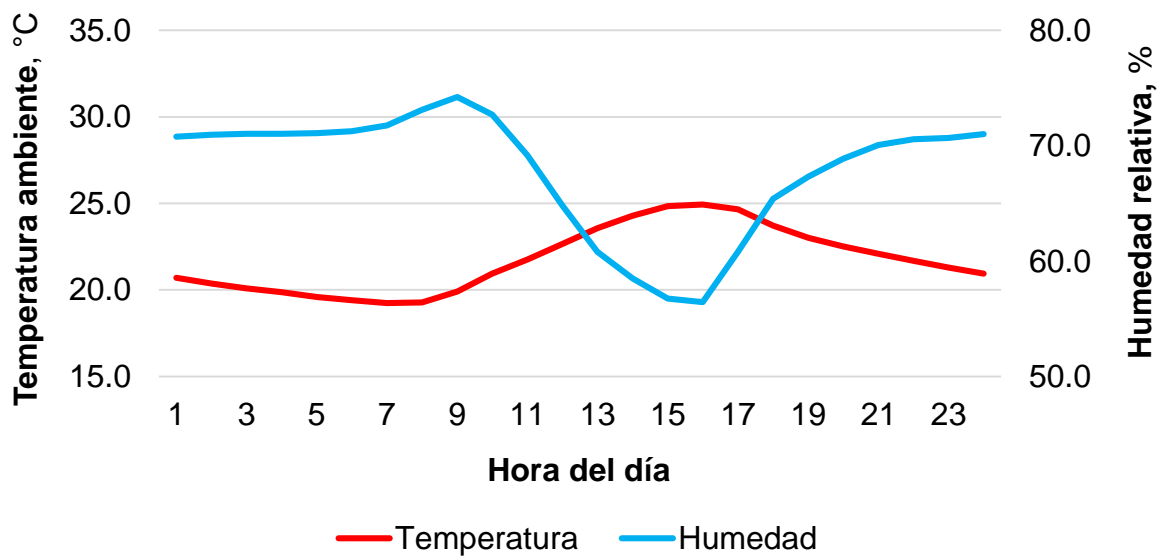


Figura 4. Promedio de la temperatura ambiental (°C) y humedad relativa (%) de los 21 días de experimentación de la sala en TN.

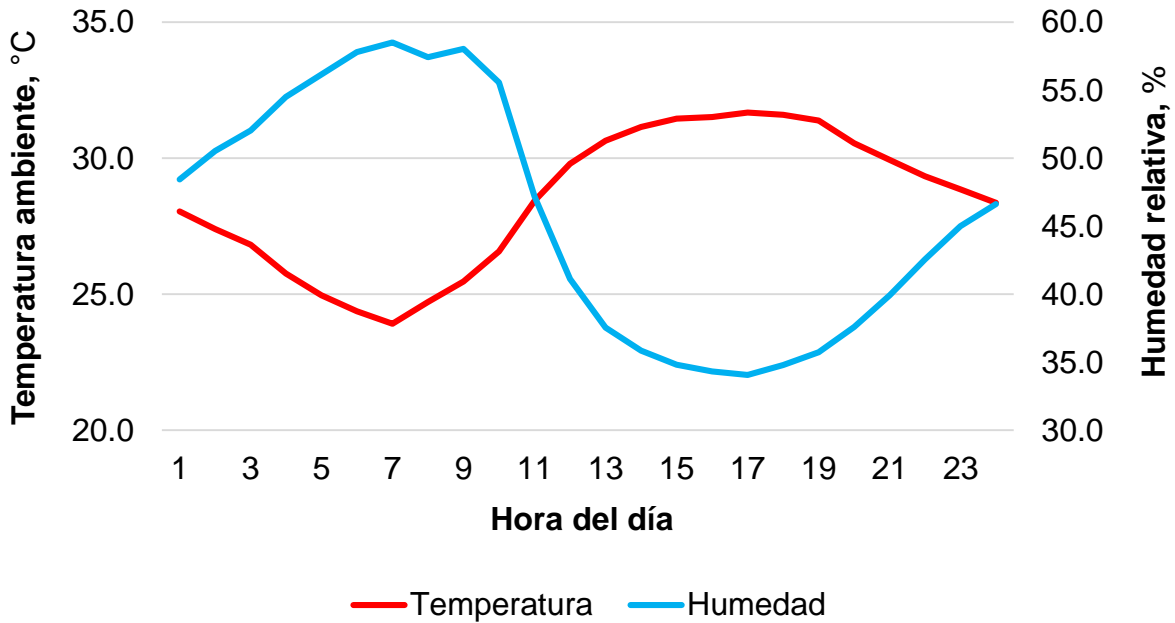


Figura 5. Promedio de la temperatura ambiental (°C) y humedad relativa (%) de los 21 días de experimentación de la sala en EC.

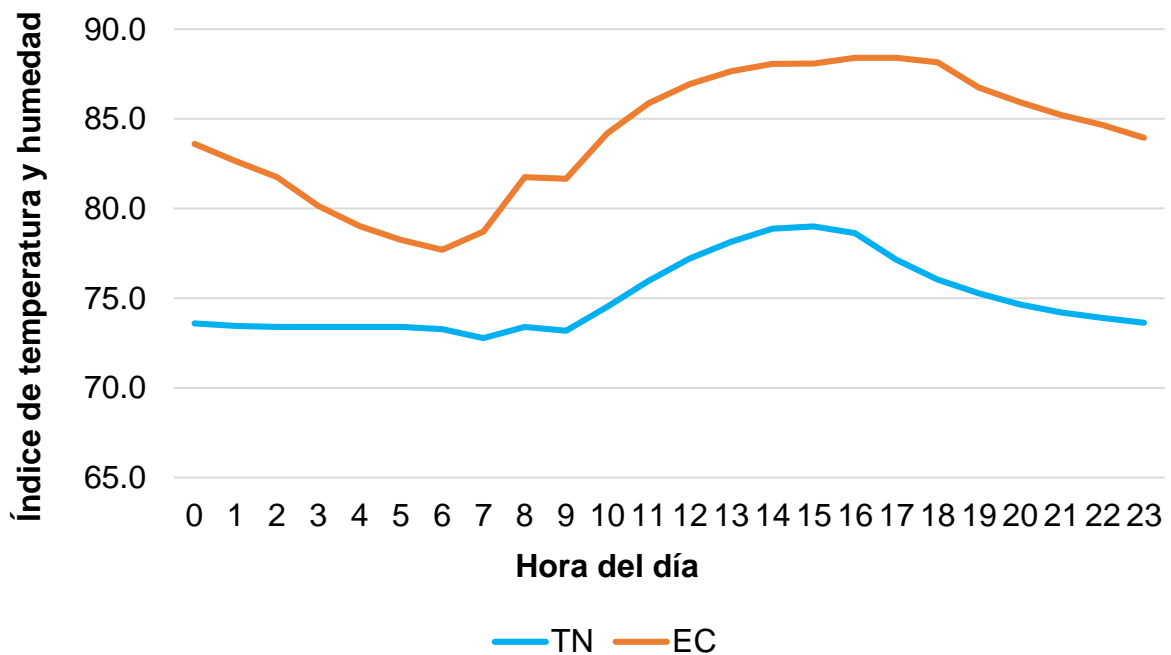


Figura 6. Promedio del índice de temperatura y humedad durante las 24 h del día en las salas (TN y EC) de los cerdos.

6.2. Temperatura intestinal

La TI promedio de los cerdos EC-T fue de 40.8 °C y la de EC-P fue de 40.6 °C (Figura 7). La temperatura intestinal de los cerdos no fue diferente de las 0400 h hasta las 1330 h ($P>0.05$). Sin embargo, se observó que, a partir de las 1400 h hasta las 0330 h del día siguiente, la temperatura de los cerdos EC-P se redujo hasta 0.4 °C ($P<0.05$).

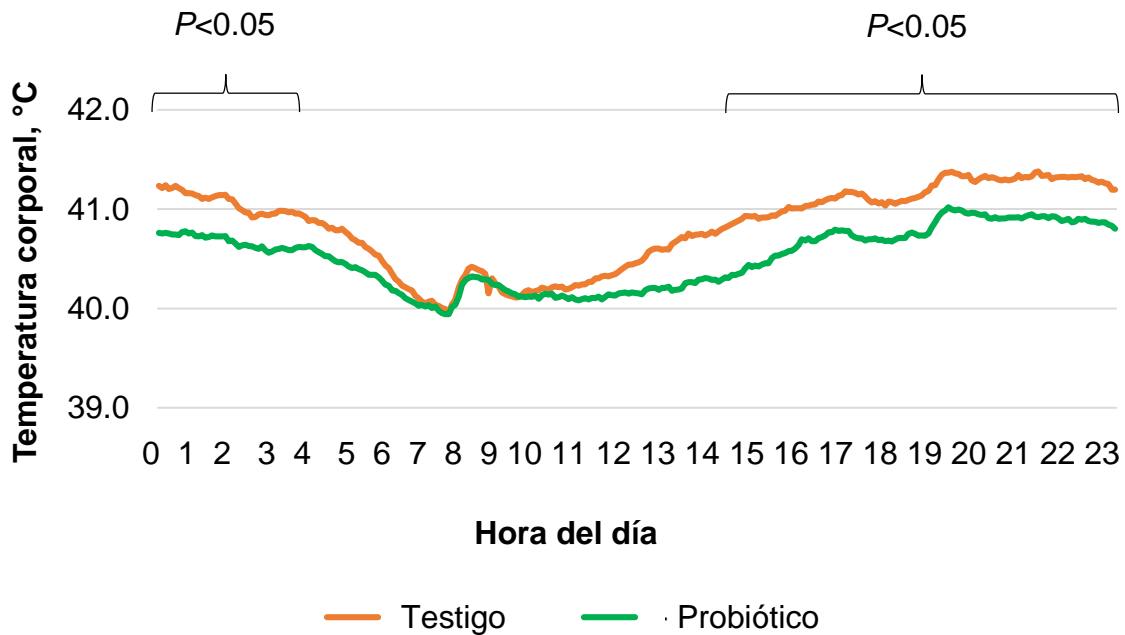


Figura 7. Temperatura intestinal (°C) de los cerdos en EC con y sin probiótico.

6.3. Frecuencia respiratoria

El tipo de dieta, dieta testigo y testigo adicionada con probiótico, no modificó la frecuencia respiratoria de los cerdos en EC a las 0700 h ($P>0.05$), ésta fue de 61 y 57 eventos por minuto. Esta variable tampoco fue diferente entre los cerdos cuando se evaluó a las 1700 h ($P>0.05$), la frecuencia respiratoria fue de 96 y 97 eventos por minuto respectivamente. Sin embargo, la frecuencia respiratoria de los cerdos a las 1700 h fue significativamente mayor ($P<0.01$) a la que presentaron a las 0700 h.

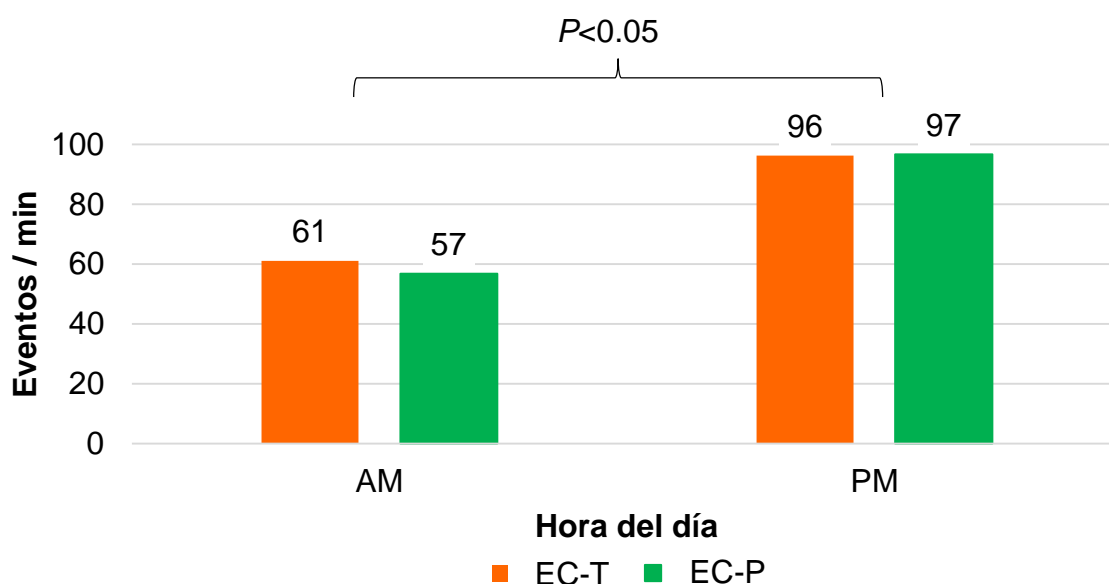


Figura 8. Frecuencia respiratoria (eventos/minuto) de los cerdos en condiciones de EC.

6.4. Comportamiento productivo

Los resultados del comportamiento productivo de los cerdos se muestran en el Cuadro 3. La TA elevada afectó negativamente ($P<0.01$) las variables de ganancia diaria de peso (30% menos), consumo diario de alimento (22% menos) y relación consumo:ganancia (15% más). El probiótico adicionado a las dietas, provocó que los cerdos aumentaran su ganancia diaria de peso en promedio 0.070

kg en TN y 0.057 kg en EC, y la relación consumo:ganancia aumentó 9% en TN y 11% en EC. No se observó interacción entre TA y adición del probiótico a las dietas para ninguna variable de comportamiento productivo en los cerdos ($P>0.05$).

Cuadro 3. Comportamiento productivo de los cerdos alimentados con una dieta testigo (T) o adicionada con probiótico (P) en condiciones TN o EC.

Variable	TN		EC		EEM	Contrastes, valores de P		
	T	P	T	P		TA	D	TAxD
Peso vivo inicial, kg	21.8	22.0	21.6	21.8	3.4	0.460	0.510	0.690
Ganancia diaria de peso, kg/d	0.730	0.800	0.499	0.556	0.047	0.001	0.008	0.781
Consumo diario de alimento, kg/d	1.366	1.374	1.046	1.099	0.041	0.001	0.284	0.447
Consumo : Ganancia	1.933	1.768	2.223	2.000	0.150	0.001	0.011	0.695

Contrastes: TA, efecto de temperatura ambiente; D, efecto de dieta; TAxD, interacción temperatura ambiente y dieta.

6.5. Histomorfología

Los resultados de características histológicas del epitelio intestinal se presentan en el Cuadro 4. En duodeno, se observó interacción entre la TA y la dieta ($P<0.05$), los cerdos en EC-P mostraron la mayor altura de vellosidades, y ésta fue en promedio 60 μm más alta que en los cerdos de EC-T que presentaron la menor altura de vellosidades. Además, el EC disminuyó en promedio 73 μm la profundidad de las criptas ($P<0.01$) en comparación con aquellos en TN; y la suplementación del probiótico también la redujo en promedio 48 μm ($P<0.01$). En la relación V:C se observó disminución de 14% por el EC ($P<0.01$) y aumento de 14% en aquellos cerdos adicionados con probiótico en la dieta ($P<0.01$).

En yeyuno, la altura de las vellosidades de los cerdos en EC se incrementó en promedio 38 μm ($P<0.01$). Se observó interacción entre la TA y la dieta en la profundidad de la cripta ($P<0.05$), en ambos casos, tanto TN y EC, el probiótico redujo la profundidad en promedio 101 μm y 59 μm , respectivamente. El EC aumentó 9% la relación V:C en comparación con TN ($P<0.01$) y la adición del probiótico aumentó 21% esta relación ($P<0.01$).

En íleon, los cerdos en EC mostraron reducción en la altura de vellosidades ($P<0.01$) y profundidad de la cripta ($P<0.01$), en promedio 40 μm para ambas variables. La adición de probiótico aumentó en promedio 39 μm la altura de las vellosidades ($P<0.01$) y redujo en promedio 48 μm la profundidad de la cripta ($P<0.01$). Se observó una interacción entre temperatura y adición de probiótico a la dieta en la relación V:C ($P<0.01$), la mayor relación fue en los cerdos EC-P, mientras EC-T fue 24% menor.

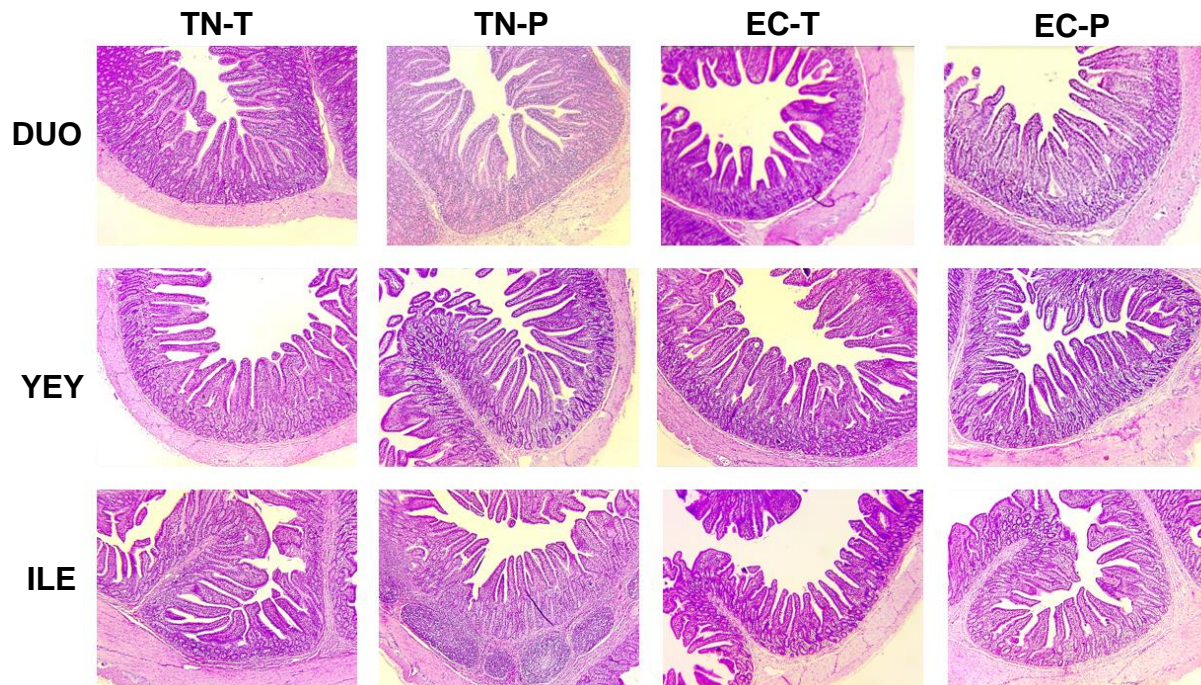


Figura 9. Microfotografías con objetivo 4X teñidas de H&E de las secciones de duodeno, yeyuno e íleon de cerdos alimentados con una dieta testigo (T) o adicionada con probiótico (P) en condiciones TN o EC.

Cuadro 4. Histomorfología de las vellosidades de intestino delgado de los cerdos alimentados con una dieta testigo (T) o adicionada con probiótico (P) en condiciones TN o EC.

Variables, μm	Tratamientos				EEM	Contrastes, valores de <i>P</i>		
	TN		EC			TA	D	TA x D
	T	P	T	P				
<u>Duodeno</u>								
Altura de vellosidades ^b	579	581	542	602	10.9	0.455	0.005	0.009
Profundidad de cripta	445	379	354	324	10.3	0.001	0.001	0.359
Relación V:C	1.4	1.6	1.6	1.9	0.04	0.001	0.001	0.634
<u>Yeyuno</u>								
Altura de vellosidades	614	601	641	634	11.5	0.009	0.370	0.811
Profundidad de cripta ^{a,b}	426	325	381	322	9.0	0.009	0.001	0.022
Relación V:C	1.5	2.0	1.8	2.0	0.05	0.001	0.001	0.237
<u>Íleon</u>								
Altura de vellosidades	505	545	447	484	8.9	0.001	0.001	0.858
Profundidad de cripta	327	293	301	239	8.0	0.001	0.001	0.388
Relación V:C	1.7	2.0	1.6	2.1	0.06	0.939	0.001	0.170

Contrastes: TA, efecto de temperatura ambiente; D, efecto de dieta; TAxD, interacción temperatura ambiente y dieta. ^a Efecto del probiótico en cerdos TN: $P < 0.05$. ^b Efecto del probiótico en cerdos EC: $P < 0.05$.

6.6. Expresión relativa de proteínas de unión estrecha

La expresión relativa de las cuatro PUE en yeyuno e íleon se presenta en la Figura 10. En yeyuno, se observó efecto de interacción entre la TA y la adición de probiótico ($P < 0.05$) en la expresión de claudina 2; en condiciones de TN, los cerdos TN-P mostraron un aumento de 169% en la expresión de esta proteína en relación

con los cerdos TN-T. Además, la adición del probiótico a los cerdos en EC redujo significativamente la expresión de esta proteína ($P<0.05$).

En íleon, la adición de probiótico no afectó la abundancia del mRNA de las cuatro PUE ($P>0.05$). Sin embargo, la exposición a EC incrementó en promedio 65% la expresión relativa de claudina 3 de los cerdos en comparación con aquellos que se encontraban en TN ($P<0.05$). Por el contrario, para el caso de ocludina, el EC redujo la expresión de la proteína en promedio 82% en los cerdos, independientemente de su dieta ($P<0.01$).

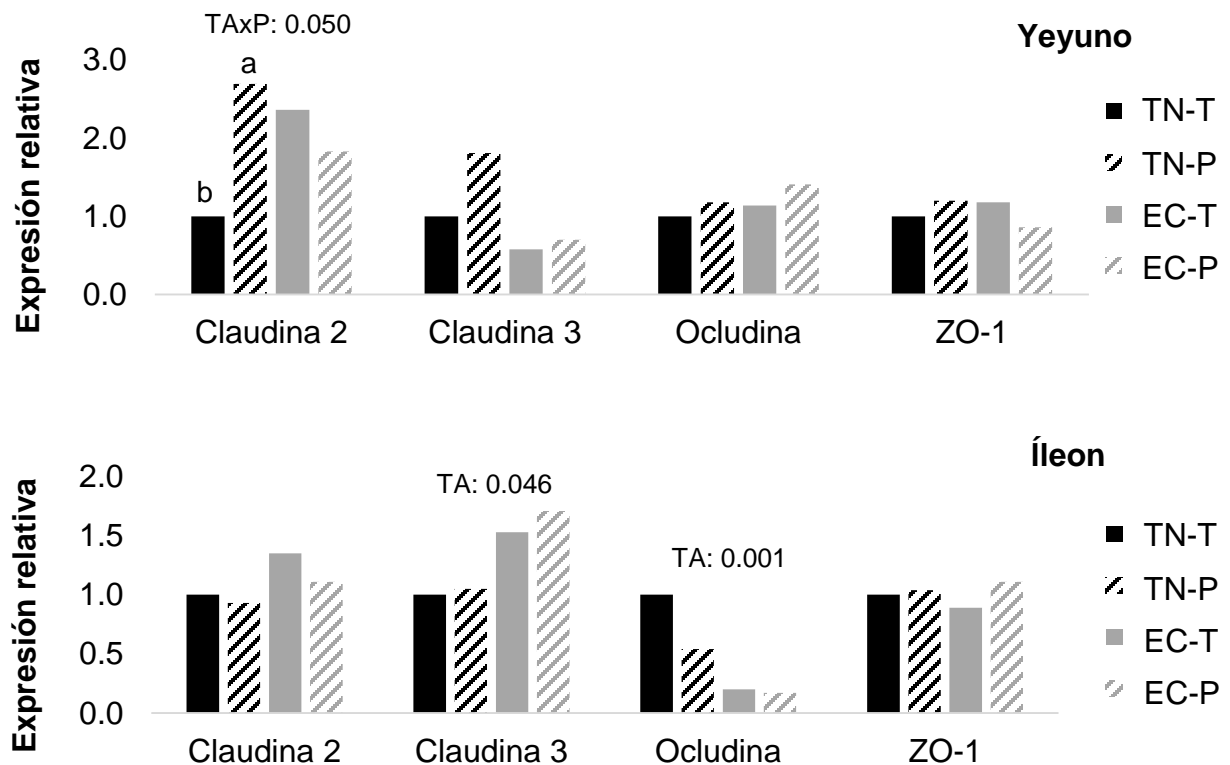


Figura 10. Efecto del probiótico en dietas para cerdos en TN o EC en la expresión relativa de proteínas de unión estrecha en yeyuno e íleon. Contrastes: TA, efecto de temperatura ambiente; D, efecto de dieta; TAxD, interacción temperatura ambiente y dieta. Medias de tratamientos con literal diferente, difieren al $P<0.05$.

6.7. Actividad antioxidante de catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPX) y superóxido dismutasa (SOD)

Los resultados de la actividad de las enzimas antioxidantes en suero sanguíneo se muestran en el Cuadro 5 y en la Figura 11. La actividad antioxidante de las enzimas analizadas se afectó de manera diferente por la TA y dieta. La actividad de CAT no se afectó por la TA ni por la adición de probiótico en la dieta ($P>0.05$).

La interacción entre el probiótico en la dieta y la TA fue significativa para GPX, siendo significativa la comparación TN-T vs TN-P y SOD teniendo significancia con EC-T vs EC-P. Los cerdos del tratamiento TN-P redujeron 50% la actividad de GPX en comparación con los TN-T ($P<0.05$). Mientras que, la actividad de SOD aumentó 33% en los cerdos EC-P en comparación con los del tratamiento EC-T ($P<0.05$).

Cuadro 5. Actividad enzimática en suero sanguíneo de los cerdos alimentados con una dieta testigo (T) o adicionada con probiótico (P) en condiciones TN o EC.

Variables	TN		EC		EEM	Contrastes, valores de <i>P</i>		
	T	P	T	P		TA	D	TA x D
CAT , nmol/min/ml	125.0	141.6	125.0	120.3	8.4	0.224	0.495	0.222
GPX , nmol/min/ml ^a	403.4	201.1	452.6	629.5	70.7	0.002	0.859	0.011
SOD , U/ml ^b	3.2	2.9	3.0	4.0	0.3	0.094	0.224	0.035

Contrastes: TA, efecto de temperatura ambiente; D, efecto de dieta; TAxD, interacción temperatura ambiente y dieta. ^a Efecto del probiótico en cerdos TN: $P<0.05$. ^b Efecto del probiótico en cerdos EC: $P<0.05$.

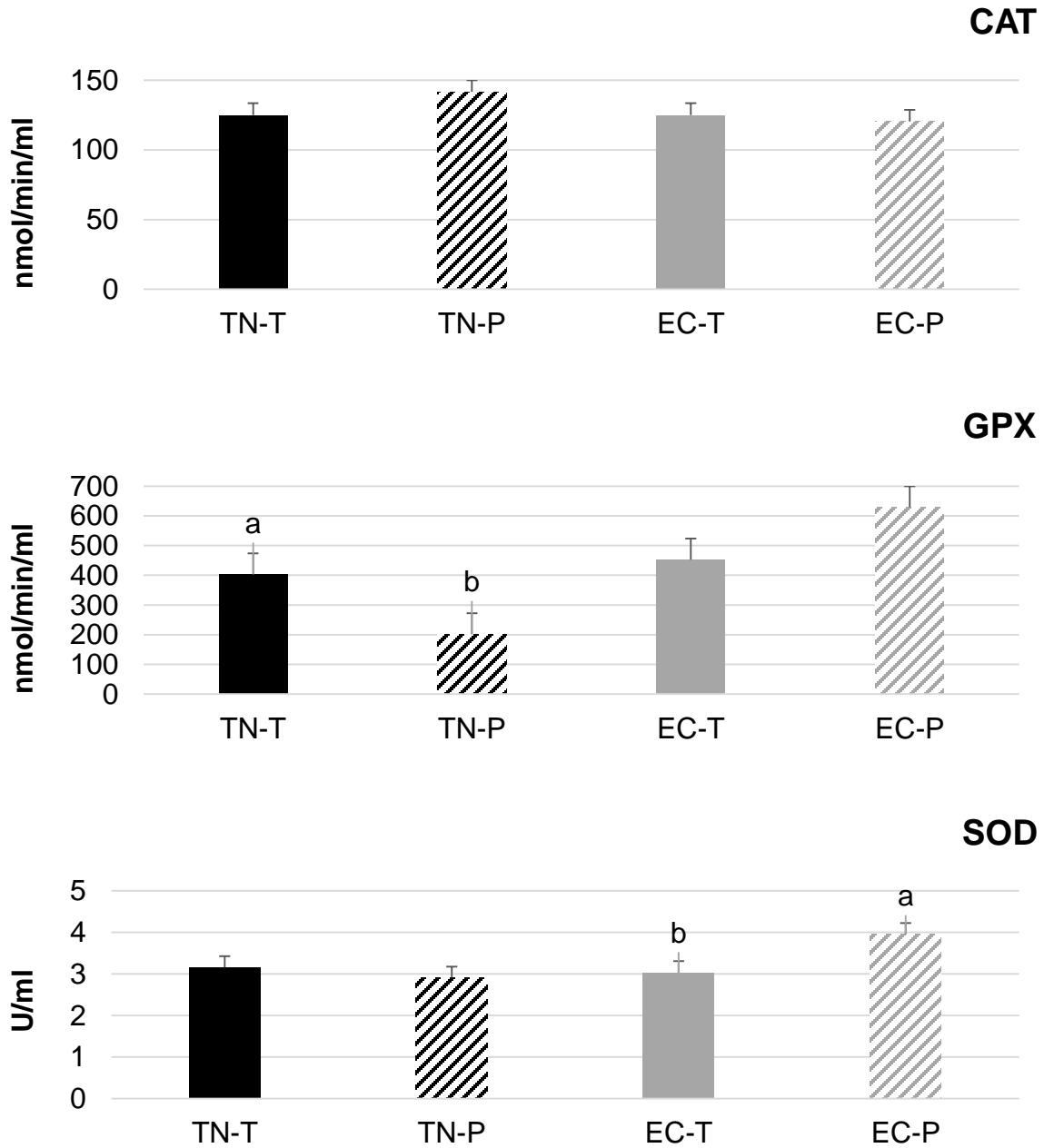


Figura 11. Actividad enzimática de CAT, GPX y SOD en suero sanguíneo de cerdos alimentados con o sin probiótico en condiciones de EC o TN. Contrastes: TA, efecto de temperatura ambiente; D, efecto de dieta; TAxD, interacción temperatura ambiente y dieta. Medias de tratamientos con literal diferente, difieren al $P < 0.05$.

6.8. Concentración de aminoácidos en suero

La composición de AA esenciales y no esenciales en suero sanguíneo de los cerdos del presente experimento se muestran en los cuadros 6 y 7, respectivamente. Los AA esenciales, Arg, His, Leu, Lis, Met, Fen y Tre, presentaron menor concentración en el suero de los cerdos en EC en comparación con los cerdos que se mantuvieron en condiciones TN ($P>0.05$). La adición de probiótico a la dieta de los cerdos incrementó la concentración sérica de Fen ($P>0.05$) independientemente de la TA a la que se encontraran los cerdos. Se observó una interacción entre TA y adición de probiótico a la dieta de los cerdos en la concentración sérica de Trp ($P>0.05$), su concentración fue menor en los cerdos EC-P y mayor en los cerdos TN-P.

La concentración sérica de los AA no esenciales Ala, Asn, Asp, Ser y Tir, se redujo ($P < 0.05$) por efecto de la TA elevada; pero la concentración del resto de los AA no esenciales se mantuvo sin cambio. Sin embargo, no se observó efecto de la adición de probiótico a la dieta sobre la concentración sérica de AA no esenciales de los cerdos ($P>0.05$).

Cuadro 6. Concentración de aminoácidos esenciales ($\mu\text{g/ml}$) en suero sanguíneo de los cerdos alimentados con una dieta testigo (T) o adicionada con probiótico (P) en condiciones TN o EC.

Variables, $\mu\text{g/ml}$	Tratamientos				Contrastes, valores de <i>P</i>			
	TN		EC		EEM	TA	D	TAxD
	T	P	T	P				
Arg	38.482	41.118	29.308	34.894	2.961	0.019	0.184	0.625
His	15.748	15.948	10.422	10.492	0.892	0.001	0.882	0.943
Ile	15.142	21.704	16.374	15.312	1.928	0.200	0.173	0.066
Leu	25.222	30.944	21.832	22.006	2.470	0.024	0.250	0.278
Lis	42.510	39.524	14.818	24.176	3.531	0.001	0.380	0.100
Met	8.324	9.754	5.072	4.902	0.732	0.001	0.402	0.290
Fen	17.434	20.808	9.260	11.508	1.125	0.001	0.024	0.623
Tre	28.702	29.100	13.884	15.570	1.845	0.001	0.580	0.732
Trp ^a	19.518	23.778	10.094	9.976	1.046	0.001	0.065	0.05
Val	36.170	37.976	31.430	30.638	3.008	0.062	0.999	0.672

Contrastes: TA, efecto de temperatura ambiente; D, efecto de dieta; TAxD, interacción temperatura ambiente y dieta. ^a Efecto del probiótico en cerdos TN: $P < 0.05$.

Cuadro 7. Concentración de aminoácidos no esenciales ($\mu\text{g/ml}$) en suero sanguíneo de los cerdos alimentados con una dieta testigo (T) o adicionada con probiótico (P) en condiciones TN o EC.

Variables, $\mu\text{g/ml}$	Tratamientos				Contrastes, valores de <i>P</i>			
	TN		EC		EEM	TA	D	TAXD
	T	P	T	P				
Ala	92.134	91.966	70.776	61.652	9.610	0.016	0.635	0.648
Asn	12.228	12.150	6.890	6.972	1.336	0.001	0.999	0.953
Asp	5.746	7.386	3.152	3.338	0.782	0.001	0.260	0.367
Glu	35.300	32.080	32.522	31.646	5.178	0.760	0.698	0.824
Gln	73.612	76.220	72.566	69.650	8.448	0.658	0.986	0.748
Gly	56.670	59.214	72.476	56.626	6.664	0.336	0.333	0.187
Pro	60.300	62.244	47.314	38.560	6.469	0.120	0.606	0.421
Ser	23.900	29.558	15.208	14.968	2.988	0.001	0.378	0.338
Tir	20.226	20.704	14.256	14.282	1.885	0.005	0.895	0.906

Contrastes: TA, efecto de temperatura ambiente; D, efecto de dieta; TAXD, interacción temperatura ambiente y dieta.

7. DISCUSIÓN

El continuo aumento de la TA y la frecuencia de días calurosos en regiones tanto tropicales como templadas, han causado gran problema en la producción porcina (Lorenz *et al.*, 2019; Ringseis y Eder, 2022). Como consecuencia, cuando la TA excede la zona TN de los cerdos (16 – 24°C) y su capacidad para disipar el calor a través de la respiración, o jadeo no puede prevenir el aumento de la temperatura corporal, ocurre el EC (Noblet *et al.*, 1994; Horowitz *et al.*, 2004). Los cerdos suelen tener una alta susceptibilidad al EC debido a su falta de glándulas sudoríparas funcionales, su alta y rápida acumulación de grasa y, en especial, a su alta producción de calor metabólico (Dallaire *et al.*, 1996).

Por otro lado, los probióticos son cepas de microorganismos vivos que pueden ejercer efectos benéficos al huésped (Markowiak y Śliżewska, 2018). Especialmente en intestino delgado se ha visto que los probióticos modulan la población de la microbiota, mantienen homeostasis en la mucosa y la integridad de la barrera intestinal, lo que se relaciona con una mayor absorción y disponibilidad de nutrientes (Liao y Nyachoti, 2017; Markowiak y Śliżewska, 2018; Barba-Vidal *et al.*, 2019). Como consecuencia, los cerdos adicionados con probiótico en condiciones TN, han demostrado tener mejor salud intestinal, rendimiento del crecimiento (Yirga, 2015) y bienestar (Barba-Vidal *et al.*, 2019). Con dichos antecedentes podemos suponer que pudieran ser una estrategia nutricional ante el EC.

Entre los microorganismos probióticos se encuentra *Bacillus subtilis*, que es una bacteria no patógena utilizada para mejorar la función intestinal de los animales (Su *et al.*, 2020). *B. subtilis* se adiciona en forma de esporas, que se distingue por tolerar las sales biliares, temperaturas extremas y pH bajo del estómago (Elshagabee *et al.*, 2017; Errington y Aart, 2020). Se ha observado que en cerdos promueve el crecimiento (Alexopoulos *et al.*, 2004; Modesto *et al.*, 2009; Kritas *et al.*, 2015), la inmunidad intestinal y la digestibilidad de los nutrientes al secretar enzimas hidrolíticas (Hu *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2019; Su *et al.*, 2020).

De acuerdo a lo anterior, la propuesta de esta investigación fue analizar si la adición de un probiótico en la dieta a base de *B. subtilis* podría ayudar a mitigar algunos de los efectos negativos causados por la exposición a EC.

En el presente experimento, ambas salas registraron variaciones de TA y humedad relativa. La sala en TN se mantuvo dentro del rango de confort de los cerdos en crecimiento, con TA promedio de 19 – 25 °C e ITH de 73 - 79. Por el contrario, aquellos cerdos alojados en la sala EC estuvieron 21 días expuestos a TA superior a los 25 °C a partir de las 0900 h hasta las 0500 h del siguiente día, siendo a las 1500 h, la hora más caliente con promedio de 36 °C y un ITH de 86. La temperatura confort de los cerdos en crecimiento tiene un rango de 16 a 24°C y la exposición por encima de los 25 °C, así como alta humedad relativa, causan alteraciones en la fisiología y comportamiento (Huynh *et al.*, 2005; Pearce *et al.*, 2013). También, de acuerdo a Xin y Harmon (1998), a partir de 80 en ITH, los cerdos en crecimiento se encuentran en condiciones de EC. Las diferencias ambientales a las que se encontraban la sala EC, en comparación con la sala TN, y los parámetros de TN para los cerdos de esta edad y peso, indican que los cerdos dentro de la sala EC efectivamente se encontraban bajo EC la mayor parte del día, especialmente durante la tarde.

El metabolismo de los cerdos se mantiene constante en la zona TN (Gourdine *et al.*, 2021). Sin embargo, cuando la TA aumenta por encima de los 25 °C, los cerdos dependen principalmente de la pérdida de calor por evaporación (jadeo), aumentando la frecuencia respiratoria en un intento de mantener su temperatura corporal constante (Huynh *et al.*, 2005). Algunos trabajos han demostrado que el aumento de la temperatura corporal (+ 1.0 – 2.0 °C) de los cerdos en EC, tiene un patrón similar al aumento de la TA (Yu *et al.*, 2010; Morales *et al.*, 2016; 2018), lo que demuestra incapacidad para regular su temperatura corporal en estas condiciones. En el experimento, a los cerdos en EC se les midió la frecuencia respiratoria a las 0700 h y 1700h, resultando mayor la frecuencia a las 1700 h, la hora más caliente del día, con el doble de eventos por minuto en comparación con la mañana (0700 h). Algo parecido sucedió con la temperatura intestinal, a las 0700

h se registró un promedio de 40.0 °C y conforme el día iba avanzando, ésta aumentó hasta 41.3 °C alrededor de las 2000 h. Este aumento de eventos en la respiración y en la temperatura corporal se han observado en estudios previos (Pearce *et al.*, 2013; Morales *et al.*, 2022), lo cual puede ser una estrategia para disipar el calor y adaptarse al EC.

Por otro lado, a los cerdos en EC que se les adicionó el probiótico en la dieta (EC-P) registraron menor temperatura intestinal de hasta 0.4 °C en un horario de 1400 h hasta las 0330 h del día siguiente. Estos resultados sugieren que la adición de probiótico a la dieta puede ayudar a reducir la temperatura intestinal en cerdos en EC en respuesta a la modulación de la microbiota intestinal, lo que se podría asociar a una reducción de la inflamación a nivel local (Bongers *et al.*, 2023). Esto último pudiera respaldarse con los datos de Wang *et al.* (2018), quienes suplementaron *B. subtilis* a pollos de engorda bajo condiciones de EC y mostraron mayores concentraciones en hígado de IL-10, una citosina antiinflamatoria, y menores de IL-6, citosina proinflamatoria. Sin embargo, estas citosinas en intestino delgado no fueron medidas en el presente experimento, por lo tanto, no podemos confirmar esta suposición.

Un efecto importante observado en los cerdos bajo condiciones de EC, es la reducción del consumo voluntario de alimento (Baumgard y Rhoads, 2013; Cervantes *et al.*, 2016; Morales *et al.*, 2014; 2018; Serviento *et al.*, 2020; Vásquez *et al.*, 2022) lo que se ha asociado con un mecanismo para reducir la producción de calor por la digestión. En consecuencia, varios autores han reportado que se produce pérdida de peso o reducción en la ganancia de peso en los cerdos (Renaudeau *et al.*, 2011; Morales *et al.*, 2014; Serviento *et al.*, 2023; Vásquez *et al.*, 2022). En el presente estudio se observaron ambos efectos en los cerdos en EC, el consumo voluntario de alimento se redujo 22% y la ganancia diaria de peso 30% en comparación con aquellos en TN. Se ha indicado que en EC, los cerdos reorganizan el uso de nutrientes para llevar a cabo cambios fisiológicos que le ayuden a enfrentarse al calor (Morales *et al.*, 2014; Cervantes *et al.*, 2017). Además, se

disminuye la disponibilidad y absorción de nutrientes, debido a la restricción alimenticia y daño en la integridad intestinal (Lambert, 2009; Morales *et al.*, 2016).

Por otra parte, el probiótico no afectó el consumo voluntario de alimento, sin embargo, aumentó la ganancia diaria de peso 10% en TN y 11% en EC y, en consecuencia, se aumentó la conversión alimenticia de los cerdos. En coincidencia con los resultados del experimento, autores como Alexopoulos *et al.* (2004), Balasubramanian *et al.* (2016) y Gracia *et al.* (2023) han reportado que la suplementación con *B. subtilis* en la dieta mejora la ganancia diaria de peso, pero no el consumo voluntario de alimento de cerdos en crecimiento en condiciones TN. La mejora de la ganancia diaria de peso y la eficiencia alimenticia observados en el presente experimento debido a la suplementación con *B. subtilis* pudieran estar asociados a una recuperación de la integridad intestinal que mejora la disponibilidad y absorción de los nutrientes.

7.1. Histomorfología intestinal

El EC provoca cambios en el funcionamiento e integridad del intestino delgado, los cuales pueden perjudicar gravemente la salud, rendimiento y bienestar de los cerdos (Cui y Gu, 2015). Cuando se eleva la TA, el organismo intenta perder calor, y la sangre se redistribuye hacia la periferia del cuerpo, reduciendo el flujo sanguíneo esplácnico (Lambert, 2009). En consecuencia, puede haber hipoxia en el epitelio intestinal como resultado de la reducción del flujo sanguíneo, también se reduce el flujo de nutrientes, comprometiendo la integridad y función intestinal (Yan *et al.*, 2006). El daño a la integridad intestinal deriva en una menor área y superficie para absorción de nutrientes, y, por lo tanto, el peso corporal y crecimiento de los cerdos se afectan negativamente (Baumgard y Rhoads, 2013). Así, se incrementa la pérdida de células epiteliales que resulta en acortamiento de las vellosidades, aumento en profundidad de las criptas y la relación entre ambas (Yu *et al.*, 2010; Pearce *et al.*, 2013; Vásquez *et al.*, 2022; Morales *et al.*, 2022). En general, la morfología del intestino delgado es un factor importante en el mantenimiento de la función intestinal; especialmente la relación entre la altura de las vellosidades y la

profundidad de la cripta es considerada el parámetro más importante para la salud y recuperación intestinal (Montagné *et al.*, 2003). Una relación V:C alta indica que la vellosidad es suficientemente madura y funcionalmente activa, además, una cripta poco profunda indica una constante renovación celular (Jayaraman *et al.*, 2013).

Por otra parte, los probióticos como *B. subtilis* se utilizan para mejorar la función intestinal (Su *et al.*, 2020). La mejora en la integridad y salud intestinal se atribuye al conjunto de metabolitos que produce *B. subtilis* como: enzimas hidrolíticas y antioxidantes, péptidos antimicrobianos e inmunomoduladores (Elshaghabee *et al.*, 2017).

Como era de esperarse, la morfología del epitelio intestinal de los cerdos del presente experimento se vio alterada por el EC. En yeyuno la altura de las vellosidades aumentó, posiblemente por una adaptación al calor después de los 21 días de exposición en un intento de reparar el epitelio. En íleon, se observaron vellosidades más cortas (-11 %) en comparación con las de TN. También, se observó que la profundidad de la cripta se disminuyó en los tres segmentos. En cambio, la morfología de los cerdos adicionados con probiótico mejoró en la mayoría de las variables analizadas. Específicamente, aumentó la altura de las vellosidades de duodeno e íleon, y redujo la profundidad de las criptas de los tres segmentos; como consecuencia, la relación V:C aumentó. Estos resultados demuestran que la adición del probiótico a las dietas en cerdos puede contribuir a reducir el daño a la integridad intestinal provocado por el EC, y que la mejoría de la morfología intestinal es un indicador de un epitelio maduro y funcional que pudiera resultar en incremento en la disponibilidad y absorción de nutrientes.

Estos resultados coinciden con los de otros autores que probaron *B. subtilis* sobre la histomorfología en cerdos y pollos de engorda (Samanya y Yamauchi, 2002; Jayaraman *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014; Deng *et al.*, 2020). Samanya y Yamauchi (2002) analizaron alteraciones histológicas en pollos alimentados con *B. subtilis* var. *Natto*, y observaron que las aves presentaron mayor altura de vellosidades, área y mitosis celular en duodeno. Por otra parte, Jayaraman *et al.*

(2013) probaron la suplementación con *B. subtilis* PB6 en pollos de engorda con enteritis inducida por una mezcla de patógenos (*Eimeria* y *C. perfringens*), y observaron que el probiótico aumentó 30% la longitud de las vellosidades y la relación V:C en el duodeno de los pollos en tanto el grupo testigo (sin enteritis inducida) como en el grupo con enteritis inducida. En investigación con cerdos, Deng *et al.* (2020) observaron que adicionar 0.1% de *B. subtilis* en la dieta, aumentaba la altura de vellosidades y la relación V:C en íleon; y Lee *et al.* (2014) observaron que adicionar 0.45% de *B. subtilis* LS 1 mejora la altura de las vellosidades y la relación V:C en los tres segmentos del intestino delgado.

7.2. Expresión relativa de proteínas de unión estrecha

Como se mencionó anteriormente, la integridad y función intestinal se ven comprometidos por el EC y, en consecuencia, la permeabilidad intestinal se altera. La permeabilidad transcelular y paracelular, dependen estrechamente de que diversos componentes de la barrera intestinal eviten el paso de materiales o microorganismos exógenos no deseados hacia la lámina propia y torrente sanguíneo (Chelakkot *et al.*, 2018). La permeabilidad paracelular permite el flujo pasivo de moléculas a través del espacio entre dos células epiteliales adyacentes (Turner, 2009). Este flujo paracelular es regulado por proteínas llamadas uniones estrechas, como claudinas y ocludinas. Estas proteínas forman poros de varios tamaños que permiten la entrada a diferentes moléculas y forman una barrera ante materiales nocivos y extraños provenientes del lumen intestinal (Turner, 2009). Además, se encuentran vinculadas al citoesqueleto mediante otras proteínas llamadas ZO (“zonula occludens” o “tight junction proteins”), de las que se conocen tres tipos: ZO-1, ZO-2 y ZO-3 (Salvo-Romero *et al.*, 2015). La función principal de las ZO es regular la permeabilidad paracelular, la adhesión, formación y estabilización de las PUE, así como, regular la comunicación hacia el interior de la célula para regular procesos celulares (Umeda *et al.*, 2006).

Anteriormente se discutió que el EC reduce la integridad intestinal en respuesta a hipoxia e inflamación, en consecuencia, se alteran las PUE y ZO. En

momentos de estrés, las claudinas y ocludinas se redistribuyen o relocalizan (Turner, 2006; 2009); esta redistribución también se ha observado como consecuencia del estrés oxidativo (Musch *et al.*, 2006). Pearce *et al.* (2013) y Vásquez *et al.* (2022), demostraron que la exposición aguda al EC aumenta la expresión de claudina 2, claudina 3 y ocludina en íleon. Esta regulación positiva pudiera ser una respuesta inmediata de restauración de la barrera intestinal para compensar el aumento en la permeabilidad observada en los primeros días de exposición (Dokladny *et al.*, 2006; Pearce *et al.*, 2013).

Los resultados del presente estudio demuestran que la expresión de Claudina 3 aumenta en respuesta al EC. Sin embargo, después de tres semanas de exposición al calor, se observó una reducción en la expresión de ocludina. Este resultado pudiera asociarse con la recuperación de la barrera y epitelio intestinal, y como un indicador de adaptación de los cerdos ante 21 días de exposición al calor, o EC crónico.

7.3. Actividad de enzimas antioxidantes

El EC provoca estrés oxidativo a nivel celular, lo que resulta de una alteración en la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales, y en la cadena transportadora de electrones y síntesis de ATP en mitocondrias (White *et al.*, 2012; Emami *et al.*, 2021). En respuesta a esta alteración, existe un aumento en la fuga de electrones, que conduce a niveles elevados de radicales libres como: anión superóxido y peróxido de hidrógeno (Kikusato y Toyomizu, 2013). En consecuencia, se alteran la función y estructura de moléculas importantes como proteínas y ADN (Ngoula *et al.*, 2020).

Para mantener un estado redox estable, un sistema de enzimas antioxidantes regula la cantidad de radicales libres a nivel celular, convirtiéndolos en moléculas inertes (Emami *et al.*, 2021). Este sistema antioxidante incluye a las enzimas SOD, CAT y GPX. Al aumentar los niveles de superóxido, la primera enzima de defensa es SOD, encargada de amortiguarlo y convertirlo en peróxido de hidrógeno (H₂O₂),

la cual, es una molécula más estable que puede difundirse por la célula (Emami *et al.*, 2021). Posteriormente, CAT es la encargada de mantener bajo control los niveles altos del peróxido de hidrógeno, convirtiéndolo en agua y oxígeno molecular (Surai *et al.*, 2019). GPX tiene la misma función que CAT, de reducir el peróxido de hidrógeno, sin embargo, esta enzima tiene un sistema diferente que utiliza el glutatión reducido, dando como resultado glutatión oxidado y agua (Lubos *et al.*, 2011). Diversos antecedentes han demostrado que la producción y actividad de las tres enzimas antioxidantes se ve comprometida durante el EC, que resulta en el aumento de estrés oxidativo (Yang *et al.*, 2014; Lv *et al.*, 2020; Pardo *et al.*, 2021; Pérez-Bustillo, 2021).

Se ha demostrado que algunos probióticos pueden producir antioxidantes, eliminar radicales libres (Gan *et al.*, 2014; Hou *et al.*, 2015) y, en consecuencia, podrían utilizarse para aliviar el estrés oxidativo producido por el EC. Para el caso de *Bacillus*, algunas especies son conocidas por ejercer actividad antioxidante, produciendo varias enzimas (Lin y Chang, 2000; Amanatidou *et al.*, 2001). Dentro de ese grupo de especies se encuentra *B. subtilis* que es conocido por producir SOD, CAT y otros metabolitos antioxidantes (Lowen y Switala, 1987; Murphy *et al.*, 1987). Además, *B. subtilis* posee un mecanismo de adaptación contra concentraciones altas de peróxido de hidrógeno (Arias-Padró *et al.*, 2021).

En el presente trabajo, el probiótico en la dieta en condiciones TN disminuyó 50% la actividad de GPX, lo cual, pudiera ser respuesta de un mejor balance redox e integridad intestinal. Mientras que en condiciones de EC, aumentó 33% la actividad de SOD. De acuerdo a lo discutido, es posible que el EC haya aumentado la producción de superóxido y ante esta situación, se especula que *B. subtilis* aumentó la producción de SOD, la cual, es la primera enzima en actuar como defensa ante este anión, que es una molécula muy dañina dentro del grupo de los radicales libres. Por otro lado, la actividad de CAT no fue diferente al adicionar el probiótico a la dieta. Cabe destacar que la actividad enzimática fue colectada a los 21 días de exposición y, de acuerdo a los diferentes resultados observados como los histológicos y de expresión de PUE, se ha demostrado que los cerdos

posiblemente tuvieron una respuesta adaptativa al estrés, por lo cual, estos datos no concuerdan con diversos antecedentes.

7.4. Concentración sérica de aminoácidos

Como se ha venido discutiendo, la alta carga de calor tiene un gran impacto negativo en la barrera intestinal, función y morfología de su epitelio. Este impacto se observa como atrofia, inflamación, hipoxia, acortamiento de las vellosidades intestinales, aumento en la permeabilidad intestinal, disminución de mucosa e invasión de patógenos (Lambert, 2009; Yu *et al.*, 2010; Pearce *et al.*, 2013; Vásquez *et al.*, 2022). Este conjunto de alteraciones, provocan cambios en la digestibilidad y absorción de los nutrientes a través del epitelio intestinal que resultan en cambios en el uso de nutrientes para sobrellevar el EC y, en consecuencia, el crecimiento de los cerdos se ve afectado (Lambert, 2009; Morales *et al.*, 2016).

La disminución en la absorción de nutrientes se refleja en los cambios en su concentración sérica. Al estar afectados los sistemas de transporte, y disminuida el área de las vellosidades, la cantidad de nutrientes transportados al torrente sanguíneo disminuye, lo que resulta en una reducción en la concentración sérica de nutrientes. Morales *et al.* (2014) y (2016) reportaron cambios en la concentración de AA en suero sanguíneo de cerdos bajo condiciones de EC. Específicamente, una disminución de hasta 30% en los AA como Arg, Lis y Tre han sido reportados como resultado de mayor requerimiento de ciertos AA bajo un EC crónico (Morales *et al.*, 2016). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en el presente experimento. La concentración sérica más afectada fue la de Lis con una disminución del 33%, seguido por Tre con 25% menos. Otros AA esenciales en suero afectados fueron Arg, His, Leu, Met y Fen, los cuales se redujeron entre 10 – 20%. También, ciertos AA no esenciales disminuyeron su concentración sérica por el EC entre 10 – 20%, tales como: Ala, Asp, Asn, Ser y Tir. Esta reducción en la concentración sérica pudiera estar fuertemente relacionada a la reducción del consumo voluntario de alimento observada en los cerdos en EC. Además, se ha

demostrado que tanto las necesidades de la célula, como las interacciones entre los AA en el intestino, alteran su absorción y liberación a la sangre (Liao *et al.*, 2015).

Lisina es considerado el primer AA limitante en la alimentación de cerdos alimentados con dietas ricas en cereales y pasta de soya; este es un AA catiónico que tiene algunas propiedades químicas comunes con Arg, lo que resulta en un antagonismo por compartir los mismos transportadores en el enterocito (Liao *et al.*, 2015). En condiciones de EC severo, arginina se clasifica como AA esencial, ya que tiene un papel importante como precursor para la síntesis de las poliaminas que estimulan la proliferación y metabolismo de las células intestinales (Flynn *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2009). También se reconoce su importancia para la síntesis de óxido nítrico, cuya función es estimular la vasodilatación (Flynn *et al.*, 2002). Comparando ambos, la concentración de Arg disminuyó 11%, mientras que Lis disminuyó 33%. Descrito lo anterior, es probable que la absorción de Lis se redujera porque el requerimiento de Arg en el epitelio intestinal y su liberación al torrente sanguíneo de los cerdos en EC fuera mayor, con el fin de reparar y proliferar las vellosidades intestinales afectadas, y de reducir la constricción de los vasos sanguíneos.

Por otra parte, treonina se considera el segundo AA limitante en la alimentación de cerdos en crecimiento (Chen *et al.*, 2017). Generalmente se conoce por mediar la síntesis proteica, metabolismo energético, absorción de nutrientes, promover el crecimiento animal, mejorar la función inmune y mantener la salud intestinal (Chen *et al.*, 2017). Treonina desempeña un papel muy indispensable en la regulación del crecimiento y proliferación celular (Ochocki y Simon, 2013). También, se ha demostrado que gran porcentaje de Tre proveniente de la dieta es utilizado en el intestino, específicamente por las células caliciformes, para sintetizar la mucina que conforma parte de la barrera intestinal (Schaart *et al.*, 2005). Diversos autores han demostrado aumento de estas proteínas y células caliciformes en cerdos en EC en comparación con TN, por ejemplo, Vásquez *et al.*, (2022) observaron que cerdos en EC presentaron mayor número de células productoras de mucina en duodeno y Pearce *et al.* (2014) observaron un incremento en la

expresión de mucina en el intestino delgado. Estos antecedentes pudieran reforzar la suposición que Tre fue utilizado en el intestino delgado para sintetizar mucina en respuesta al EC para proteger la entrada de microorganismos y toxinas nocivos a través del epitelio (Chen *et al.*, 2014) y, por lo tanto, la concentración sérica de este AA se vio disminuida en los cerdos.

Anteriormente se ha discutido la información existente acerca de un mejor rendimiento en el crecimiento de los cerdos por la suplementación con probiótico (Chen *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2015). El efecto positivo de los probióticos en el crecimiento ha sido asociado a un aumento en la digestión de los nutrientes, resultado de un mejoramiento y reparación de ciertos componentes de la barrera intestinal (Gracia *et al.*, 2023). Jorgensen *et al.* (2016), Balasubramanian *et al.* (2016) y Gracia *et al.* (2023) demostraron que esta respuesta positiva también es observada al suplementar con *Bacillus* en cerdos, en los que se mejoró la digestibilidad de los nutrientes. Descrito esto, se podría suponer que *B. subtilis* podría mejorar la digestibilidad y absorción de nutrientes de los cerdos en EC del presente experimento y, por lo tanto, se observarían mayores concentraciones séricas de nutrientes. Sin embargo, *B. subtilis* no modificó las concentraciones séricas de los AA, lo cual pudiera asociarse a la disminución del consumo voluntario de alimento y a la respuesta adaptativa que se observó en algunas variables analizadas.

8. CONCLUSIONES

La exposición de cerdos en crecimiento a ambientes con temperatura elevada afecta negativamente sus variables productivas, la histomorfología del epitelio intestinal, enzimas antioxidantes y concentración sérica de aminoácidos. La adición del probiótico a base de *Bacillus subtilis* contrarrestó los efectos causados por estrés por calor sobre la temperatura intestinal, variables productivas, características e integridad del epitelio intestinal y actividad de enzimas antioxidantes.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Al-Fataftah, A.R. & A. Abdelqader. 2014. Effects of dietary *Bacillus subtilis* on heat-stressed broilers performance, intestinal morphology and microflora composition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 198: 279-285.
- Adami, A. & V. Cavazzoni. 1999. Occurrence of selected bacterial groups in the feces of piglets fed with *Bacillus coagulans* as probiotic. *J. Basic Microbiol.* 39: 3–9.
- Alexopoulos, C., I.E. Georgoulakis, A. Tzivara, C.S. Kyriakis, A. Govaris, S.C. Kyriakis. 2004. Field evaluation of the effect of a probiotic-containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores on the health status, performance, and carcass quality of grower and finisher pigs. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* 51: 306–312.
- Amanatidou, A., E.J. Smid, M.H. Bennik, L.G. Gorris. 2001. Antioxidative properties of *Lactobacillus sake* upon exposure to elevated oxygen concentrations. *FEMS Microbiology Letters* 203(1): 87–94.
- Arias-Padró, M.D., E. Caboni, K.A. Salazar Morin, M.A. Meraz Mercado, V. Olalde-Portugal. 2021. Effect of *Bacillus subtilis* on antioxidant enzyme activities in tomato grafting. *Peer J.* 9: e10984.
- Ashraf, S., H. Zaneb, M.S. Yousaf, A. Ijaz, M.U. Sohail, S. Muti. 2013. Effect of dietary supplementation of prebiotics and probiotics on intestinal microarchitecture in broilers reared under cyclic heat stress. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl).* 97: 68–73.
- Association of Official Analytical Chemistry. 2005. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18° Edición, Gaersburg, MD, USA.
- Balasubramanian, B., T. Li, I.H. Kim. 2016. Effect of supplementing growing-finishing pig diets with *Bacillus* spp. probiotic on growth performance and meat-carcass grade quality traits. *Rev. Bras. Zootec.* 45: 93–100.

- Barba-Vidal, E., S.M. Martín-Orúe, L. Castillejos. 2019. Practical aspects of the use of probiotics in pig production: A review. *Livest. Sci.* 223: 84-96.
- Baumgard L. & R.P. Rhoads. 2013. Effects of Heat Stress on Postabsorptive Metabolism and Energetics. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 1: 311–337.
- Bernabucci, U., L. Basirico, D. Pirazzi, F. Rueca, N. Lacetera, E. Lepri, A. Nardone. 2009. Liver apolipoprotein B 100 expression and secretion are down-regulated early postpartum in dairy cows. *Livest. Sci.* 125: 169-176.
- Bongers, K.S., R. Chanderraj, R.J. Woods, R.A. McDonald, M.D. Adame, N.R. Falkowski, C A. Brown, J.M. Baker, K.M. Winner, D.J. Fergle. 2023. The gut microbiome modulates body temperature both in sepsis and health. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 207: 1030–1041.
- Camilleri, M. 2021. Human intestinal barrier: effects of stressors, diet, prebiotics, and probiotics. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 12(1): e00308.
- Campos, P.H.R.F., N. Le Floc'h, J. Noblet, D. Renaudeau. 2017. Physiological responses of growing pigs to high ambient temperature and/or inflammatory challenges. *R. Bras. Zootec.* 46(6): 537–544.
- Cervantes, M., M. Cota, N. Arce, G. Castillo, E. Avelar, S. Espinoza, A. Morales. 2016. Effect of heat stress on performance and expression of selected amino acid and glucose transporters, HSP90, leptin and ghrelin in growing pigs. *J. Therm. Biol.* 59: 69-76.
- Cervantes, M., N. Ibarra, N. Vásquez, F. Reyes, E. Avelar, S. Espinoza, A. Morales. 2017. Serum concentrations of free amino acids in growing pigs exposed to diurnal heat stress fluctuations. *J. Therm. Biol.* 69:69–75.
- Chelakkot, C., J. Ghim, S.H. Ryu. 2018. Mechanisms regulating intestinal barrier integrity and its pathological implications. *Exp. Mol. Med.* 50: 1–9.

- Chen, Y.J., K.S. Son, B.J. Min, J.H. Cho, O.S. Kwon, I.H. Kim. 2005. Effects of dietary probiotic on growth performance, nutrients digestibility, blood characteristics and fecal noxious gas content in growing pigs. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 18: 1464–1468.
- Chen, G.Y. & T.S. Stappenbeck. 2014. Mucucus, it is not just a static barrier. *Sci. Signal* 7: 323.
- Chen, Y.P., Y.F. Cheng, X.H. Li, W.L. Yang, C. Wen, S. Zhuang, Y.M. Zhou. 2017. Effects of threonine supplementation on the growth performance, immunity, oxidative status, intestinal integrity, and barrier function of broilers at the early age. *Poult. Sci.* 96: 405–413.
- Cheng, S., Y. He, T. Zeng, D. Wang, J. He, Q. Xia, C. Zhou, D. Pan, J. Cao. 2022. Heat stress induces various oxidative damages to myofibrillar proteins in ducks. *Food Chemistry* 390: 133209.
- Coffey, R.D., G.R. Parker, K.M. Laurent. 1995. Feeding growing-finishing pigs to maximize lean growth rate. ASC-147, Cooperative Extension Service. Lexington, KY, USA: University of Kentucky College of Agriculture.
- Collin, A., J. Van Milgen, S. Dubois, J. Noblet. 2001. Effect of high temperature on feeding behaviour and heat production in group-housed young pigs. *Br. J. Nutr.* 86: 63-70.
- Cottrell, J.J., F. Liu, A. T. Hung, K. DiGiacomo, S.S. Chauhan, B.J. Leury and F.R. Dunshea. 2015. Nutritional strategies to alleviate heat stress in pigs. *Anim. Product. Sci.* 55(12): 1391.
- Cui, Y. & X. Gu. 2015. Proteomic changes of the porcine small intestine in response to chronic heat stress. *J. Mol. Endocrinol.* 55: 277-293.
- Curtis T., J. Schindelin, M. Hiner, B. De Zonia, A. Walter, E. Arena, K. Eliceiri. 2017. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* 18: 529.

- Dallaire, S., R. Drolet, D. Brodeur. 1996. Sow mortality associated with high ambient temperatures. *Can. Vet. J.* 37: 237–239.
- de Morais, M. B., C.S. Mello, M.S. Carmo Rodrigues, H.B.A. Filho, L. Melli, S. Tahan. 2017. Microbiota, environment, and diet. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 65: 24.
- Deng, B., J. Wu, X. Li, C. Zhang, X. Men, Z. Xu. 2020. Effects of *Bacillus subtilis* on growth performance, serum parameters, digestive enzyme, intestinal morphology, and colonic microbiota in piglets. *AMB Express* 10(1): 212.
- Dokladny, K., D. Ye, J.C. Kennedy, P.L. Moseley, T.Y. Ma. 2008. Cellular and molecular mechanisms of heat stress-induced up-regulation of occludin protein expression: regulatory role of heat shock factor-1. *Am. J. Pathol.* 172: 659–670.
- Elshaghabee, F.M.F., N. Rokana, R. D. Gulhane, C. Sharma, H. Panwar. 2017. *Bacillus* as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives. *Front. Microbiol.* 8: 1490.
- Emami, N.K., U. Jung, B. Voy, S. Dridi. 2021. Radical Response: Effects of Heat Stress-Induced Oxidative Stress on Lipid Metabolism in the Avian Liver. *Antioxidants* 10(1): 35.
- Errington, J. & L.T.V. Aart. 2020. Microbe Profile: *Bacillus subtilis*: model organism for cellular development, and industrial workhorse. *Microbiology* 166(5): 425–427.
- FAO. 2007. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Technical Meeting on Prebiotics: Food Quality and Standards Service (AGNS). FAO Technical Meeting Report.
- FAO. 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Guidelines for the evaluation of probiotics in food.

- FAO – Food and Agriculture Organization. 2010. FAO Production Yearbook 2010. FAOSTAT, Roma, Italia.
- Flynn, N., C. Meininger, T. Haynes, G. Wu. 2002. The metabolic basis of arginine nutrition and pharmacotherapy. *Biomed. Pharmacoter.* 56: 427-438.
- Foligné, B., E. Peys, J. Vandekerckhove, J. Van Hemel, J. Dewulf, J. Breton, B. Pot. 2012. Spores from two distinct colony types of the strain *Bacillus subtilis* PB6 substantiate anti-inflammatory probiotic effects in mice. *Clin. Nutr.* 31(6): 987–994.
- Fujiya, M., M.W. Musch, Y. Nakagawa, S. Hu, J. Alverdy, Y. Kohgo. 2007. The *Bacillus subtilis* quorum-sensing molecule CSF contributes to intestinal homeostasis via OCTN2, a host cell membrane transporter. *Cell. Host. Microbe.* 1: 299–308.
- Gallo, R. L. & L.V. Hooper. 2012. Epithelial antimicrobial defense of the skin and intestine. *Nat. Rev. Immunol.* 12(7): 503–516.
- Gan, F., F. Ren, X. Chen, C. Lv, C. Pan, G. Ye, K. Huang. 2013. Effects of selenium-enriched probiotics on heat shock protein mRNA levels in piglets under heat stress conditions. *J. Agr. Food Chem.* 61(10): 2385–2391.
- Gan, F., X. Chen, S.F. Liao, C. Lv, F. Ren, G. Ye, C. Pan, D. Huang, J. Shi, X. Shi, H. Zhou, K. Huang. 2014. Selenium-enriched probiotics improve antioxidant status, immune function, and selenoprotein gene expression of piglets raised under high ambient temperature *J. Agri. Food Chem.* 62 (20): 4502-4508.
- Gething, M.J. & J. Sambrook. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* 355: 33–45.
- Gibson, R.G. & M.B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125: 1401–1412.
- Gong, Y., H. Li, Y. Li. 2016. Effects of *Bacillus subtilis* on epithelial tight junctions of mice with inflammatory bowel disease. *J. Interferon Cytokine Res.* 36: 75–85

- Gonzalez-Rivas, P.A., S.S. Chauhan, M. Ha, N. Fegan, F.R. Dunshea, R.D. Warner. 2020. Effects of heat stress on animal physiology, metabolism, and meat quality: A review. *Meat Sci.* 162: 108-125.
- Gourdine, J. L., J. Riquet, R. Rose, N. Poullet, M. Giorgi, Y. Billon. 2019. Genotype by environment interactions for performance and thermoregulation responses in growing pigs. *J Anim Sci.* 97: 3699–3713.
- Gourdine, J.L., W.M. Rauw, H. Gilbert, N. Poullet. 2021. The Genetics of Thermoregulation in Pigs: A Review. *Front. Vet. Sci.* 13(8): 770480.
- Gracia, M.I., G. Cano, P. Vázquez, L.H.B. Hansen. 2023. Effect of a *Bacillus*-based probiotic on performance and nutrient digestibility when substituting soybean meal with rapeseed meal in grower–Finisher Diets. *Animals* 13(19): 3067.
- Guo, X, D. Li, W. Lu, X. Piao, X. Chen. 2006. Screening of *Bacillus* strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. *Antonie van Leeuwenhoek* 90: 139-146.
- Hall, D., G. Buettner, L. Oberley, L. Xu, R. Matthes, C. Gisolfi. 2001. Mechanisms of circulatory and intestinal barrier dysfunction during whole body hypertermia. *Am. J. Physiol* 280: 509-521.
- He, J., Y. He, D. Pan, J. Cao, Y. Sun, X. Zeng. 2019. Associations of gut microbiota with heat stress-induced changes of growth, fat deposition, intestinal morphology, and antioxidant capacity in ducks. *Front. Microbiol.* 10: 903.
- Holmes, C. W. and W. H. Close. 1977. The influence of climatic variables on energy metabolism and associated aspects of productivity in the pig. In *Nutrition and the climatic environment*. pp. 51–73.
- Hosoi, T, A. Ametani, K. Kiuchi, S. Kaminogawa. 1999. Changes in fecal microflora induced by intubation of mice with *Bacillus subtilis* (*natto*) spores are dependent upon dietary components. *Can. J. Microbiol.* 45: 59–66

- Horowitz, M., L. Eli-Berchoer, I. Wapinski, N. Friedman, E. Kodesh. 2004. Stress-related genomic responses during the course of heat acclimation and its association with ischemic-reperfusion cross-tolerance. *J. Appl. Physiol.* 97: 1496-1507.
- Hou, C., X. Zeng, F. Yang. 2015. Study and use of the probiotic *Lactobacillus reuteri* in pigs: a review. *J. Animal Sci. Biotechnol.* 6: 14.
- Huang, Y, & M.C. Adams. 2004. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 91: 253–260.
- Hu, Y.L., Y. Dun, S.H. Li, S.M. Zhao, N. Peng, Y.X. Liang. 2014. Effects of *Bacillus subtilis* KN-42 on growth performance, diarrhea and faecal bacterial flora of weaned piglets. *Asian Austral. J. Anim.* 27: 1131–1140.
- Hu, C., Y. Patil, D. Gong, T. Yu, J. Li, L. Wu. 2022. Heat stress-induced dysbiosis of porcine colon microbiota plays a role in intestinal damage: a fecal microbiota profile. *Front. Vet. Sci.* 9: 686902.
- Huynh, T., A. Aarnink, W. Gerrits, M. Heetkamp, T. Canh, H. Spoolder, B. Kemp, M. Verstegen. 2005. Thermal behaviour of growing pigs in response to high temperature and humidity. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 91: 1-16.
- IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change. 2013. *Climate change 2013: The physical science basis.* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.
- Jayaraman, S., G. Thangavel, H. Kurian, R. Mani, R. Mukkalil, H. Chirakkal. 2013. *Bacillus subtilis* PB6 improves intestinal health of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. *Poult. Sci.* 92(2): 370-374.

- Jinno, C., X. Li, Y. Liu. 2022. Dietary supplementation of *Bacillus subtilis* or antibiotics modified intestinal microbiome of weaned pigs under enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Front. Microbiol.* 13: 1664.
- Jørgensen, J.N., J. Sánchez-Laguna, C. Millán, O. Casabuena, M.I. Gracia. 2016. Effects of a *Bacillus*-based probiotic and dietary energy content on the performance and nutrient digestibility of wean to finish pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* 221: 54–61.
- Karl, J. P., L.M. Margolis, E.H. Madslie, N.E. Murphy, J.W. Castellani, Y. Gundersen, A.V. Hoke, M.W. Levangie, R. Kumar, N. Chakraborty, A. Gautam, R. Hammamieh, S. Martini, S.J. Montain, S.M. Pasiakos. 2017. Changes in intestinal microbiota composition and metabolism coincide with increased intestinal permeability in young adults under prolonged physiological stress. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 312(6): G559–G571.
- Kiang, J.G. & G.C. Tsokos. 1998. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol. Ther.* 80(2): 183-201.
- Kikusato, M. & M. Toyomizu. 2013. Crucial role of membrane potential in heat stress-induced overproduction of reactive oxygen species in avian skeletal muscle mitochondria. *PLoS One* 8: e64412.
- Kim, Y.W., S.L. Ingale, J.S. Kim, S.H. Lee, J.H. Lee, I.K. Kwon, B.J. Chae. 2014. Bacteriophage and probiotics both enhance the performance of growing pigs but bacteriophage are more effective. *Anim. Feed Sci. Technol.* 196: 88–95.
- Kritas, S.K. & R.B. Morrison. 2005. Evaluation of probiotics as a substitute for antibiotics in a large pig nursery. *Vet. Rec.* 156: 447–448.
- Kritas, S.K., T. Marubashi, G. Filioussis, E. Petridou, G. Christodouloupolos, A.R. Burriel, A. Tzivara, A. Theodoridis, M. Pískoriková. 2015. Reproductive performance of sows was improved by administration of a sporing bacillary probiotic (*Bacillus subtilis* C-3102). *J. Anim. Sci.* 93(1): 405-413.

- Kumar S, A.K. Verma, P. Singh. 2012. Effect of live *Saccharomyces cerevisiae* on immune response in early weaned crossbred piglets. *Indian J Anim Nutr* 29(4): 393-396.
- Kyriakis, S.C., V.K. Tsiloyiannis, J. Vlemmas, K. Sarris, A.C. Tsinas, C. Alexopoulos, L. Jansegers. 1999. The effect of probiotic LSP 122 on the control of post-weaning diarrhoea syndrome of piglets. *Res. Vet. Sci.* 67: 223–228.
- Labussière, E., C. Achard, S. Dubois, S. Combes, M Castex, D. Renaudeau. 2022. *Saccharomyces cerevisiae boulardii* CNCM I-1079 supplementation in finishing male pigs helps to cope with heat stress through feeding behaviour and gut microbiota modulation. *Brit. J. Nutr.* 127(3): 353-368.
- Lambert, G.P. 2009. Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. *J. Anim. Sci.* 87: E101–E108.
- Lauridsen, C. 2019. From oxidative stress to inflammation: redox balance and immune system. *Poultry Sci.*98: 4240-4246.
- Le, H.H., M. Shakeri, H.A.R. Suleria, W. Zhao, R.M. McQuade, D.J. Phillips, E. Vidacs, J.B. Furness, F.R. Dunshea, V. Artuso-Ponte. 2020. Betaine and isoquinoline alkaloids protect against heat stress and colonic permeability in growing pigs. *Antioxidants* 9(10): 1024.
- Le Sciellour, M., O. Zemb, I. Hochu, J. Riquet, H. Gilbert, M. Giorgi. 2019. Effect of chronic and acute heat challenges on fecal microbiota composition, production, and thermoregulation traits in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 97(9): 3845–3858.
- Lee, S. H., S. L. Ingale, J. S. Kim, K. H. Kim, A. Lokhande, E. K. Kim, I. K. Kwon. 2014. Effects of dietary supplementation with *Bacillus subtilis* LS 1–2 fermentation biomass on growth performance, nutrient digestibility, cecal microbiota and intestinal morphology of weanling pig. *Anim. Feed Sci. Technol.* 188: 102–110.

- Lee, C., J.H. Cha, M.G. Kim. 2019. The effects of dietary *Bacillus subtilis* on immune response, hematological parameters, growth performance, and resistance of juvenile olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Streptococcus iniae*. *J. World Aquacult. Soc.* 51: 551–562.
- Leser, T.D., A. Knarreborg, J. Worm. 2008. Germination and outgrowth of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* spores in the gastrointestinal tract of pigs. *J. Appl. Microbiol.* 104: 1025–1033
- Levy, M., E. Blacher, E. Elinav. 2017. Microbiome, metabolites and host immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* 35: 8–15.
- Liao, S.F., T. Wang, N. Regmi. 2015. Lysine nutrition in swine and the related monogastric animals: muscle protein biosynthesis and beyond. *Springerplus* 4: 147.
- Liao, S. F. & M. Nyachoti. 2017. Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization. *Anim. Nutr.* 3: 331–343.
- Lin, M.Y. & F.J. Chang. 2000. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Dig. Dis. Sci.* 45(8): 1617–1622.
- Liu, F., J. Yin, M. Du, P. Yan, J. Xu, X. Zhu, J. Yu. 2009. Heat stress-induced damage to porcine small intestinal epithelium associated with down regulation of epithelial growth factor signaling. *J. Anim. Sci.* 59: 1941-1949.
- Liu, G., H. Zhu, T. Ma, Z. Yan, Y. Zhang, Y. Geng Y. 2020. Effect of chronic cyclic heat stress on the intestinal morphology, oxidative status and cecal bacterial communities in broilers. *J. Therm. Biol.* 91: 102619.
- Livak, K. and T. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-DDCt} method. *Methods* 25: 402-408.

- Llames, C. & J. Fontaine. 1994. Determination of amino acid in feeds: collaborative study. *J. AOAC Int.* 77: 1362-1402.
- Loewen, P.C. & J. Switala. 1987. Multiple catalases in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 169(8): 3601–3607.
- Lorenz, R., Z. Stalhandske, E.M. Fischer. 2019. Detection of a climate change signal in extreme heat, heat stress, and cold in Europe from observations. *Geophys. Res. Lett.* 46(4): 8363–8374.
- Lubos, E., J. Loscalzo, D.E. Handy. 2011. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* 15(7): 1957-1997.
- Luna, L. 1968. Manual of histological staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3^o Edición. McGraw-Hill. New York, USA. pp. 15-41.
- Lv, Q., Q. Hu, W. Zhang, X. Huang, M. Zhu, R. Geng, X. Cheng, C. Bao, Y. Wang, C. Zhang, Y. He, X. Li, Z. Yi. 2020. Disturbance of oxidative stress parameters in treatment-resistant bipolar disorder and their association with electroconvulsive therapy response. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 23(4): 207-216.
- Ma, T., X. Shen, X. Shi, H.A. Sakandar, K. Quan, Y. Li, H. Jin, L.Y. Kwok, H. Zhang, Z. Sun. 2023. Targeting gut microbiota and metabolism as the major probiotic mechanism - An evidence-based review, *Trends in Food Sci.* 138: 178-198.
- Mackos, A. R., R. Maltz, M.T. Bailey. 2017. The role of the commensal microbiota in adaptive and maladaptive stressor-induced immunomodulation. *Horm. Behav.* 88: 70-78.
- Macpherson, A.J., M.G. de Agüero, S.C. Ganal-Vonarburg. 2017. How nutrition and the maternal microbiota shape the neonatal immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 17: 508-517.

- Markowiak, P. & K. Śliżewska. 2017. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on Human Health. *Nutrients*. 9(9): 1021.
- Markowiak, P. & K. Śliżewska. 2018. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathog.* 10: 21.
- Mayorga, E.J., J.W. Ross, A.F. Keating, R.P. Rhoads, L.H. Baumgard. 2020. Biology of heat stress; the nexus between intestinal hyperpermeability and swine reproduction. *Theriogenology* 154: 73-83.
- Modesto, M., M.R. D'Aimmo, I. Stefanini, P. Trevisi, S. De Filippi, L. Casini, M. Mazzoni, P. Bosi, B. Biavati. 2009. A novel strategy to select *Bifidobacterium* strains and prebiotics as natural growth promoters in newly weaned pigs. *Livestock Sci.* 122: 248–258.
- Montagne, L., J.R. Pluske, D.J. Hampson. 2003. A review of interactions between dietary fiber and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health young-non ruminant animals. *Anim. Feed Sci. Technol.* 108: 95-117
- Morales, A., F. Grageola, H. Garcia, N. Arce, B. Araiza, J. Yanez, M. Cervantes. 2014. Performance, serum amino acid concentrations and expression of selected genes in pair-fed growing pigs exposed to high ambient temperatures. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 98:928–935.
- Morales, A., M. Cota, N. Ibarra, N. Arce, J. Htoo, M. Cervantes. 2016. Effect of heat stress on the serum concentrations of free amino acids and some of their metabolites in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 94: 2835-2842.
- Morales, A., N. Ibarra, M. Chavez, T. Gomez, A. Suarez, J.A. Valle, R.L. Camacho, M. Cervantes. 2018. Effect of feed intake level and dietary protein content on the body temperature of pigs housed under thermoneutral conditions. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 102: e718–e725.

- Morales, A., V. Sánchez, B. Pérez, R.L. Camacho, N. Arce, E. Avelar, J.C. González-Vega, J.K. Htoo, M. Cervantes. 2022. Effect of DL-methionine supplementation above requirement on performance; intestinal morphology, antioxidant activity, and gene expression; and serum concentration of amino acids in heat stressed pigs. *J. Anim. Sci.* 101: 1–13.
- Murphy, P., B.C. Dowds, D.J. McConnell, K.M. Devine. 1987. Oxidative stress and growth temperature in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 169(12): 5766–5770.
- Musch, M.W., M.M. Walsh-Reitz, E.B. Chang. 2006. Roles of ZO-1, occludin, and actin in oxidant-induced barrier disruption. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 290: G222–G231.
- National Research Council. 2012. Nutrient requirements of pigs. 10^o Edición. National Academy Press, Washington, USA.
- Natividad, J.M & E.F. Verdu. 2013. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. *Pharmacol. Res* 69(1): 42–51.
- Nemcová, R., A. Bomba, S. Gancarčíková. 1999. Study of the effect of *Lactobacillus paracasei* and fructooligosaccharides on the faecal microflora in weanling piglets. *Berl. Münchener Tierärztliche Wochenschr.* 112: 225–228.
- Ngoula, F., F.A Lontio, H. Tchoffo, T.F.P Manfo, R.M Djeunang, B.N. Vemo, F. Moffo, M.N. Djuissi. 2020. Heat induces oxidative stress: reproductive organ weights and serum metabolite profile, testes structure, and function impairment in male cavy (*Cavia porcellus*). *Front. Vet. Sci.* 7.
- Noblet, J., H. Fortune, X. Shi, S. Dubois. 1994. Prediction of net energy value of feeds for growing pigs. *J. Anim. Sci.* 72: 344-354.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). 2001. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Ochoa, M.,

I edición. Diario Oficial de la Federación. Norma Oficial Mexicana, Cd. de México (DF), México, pp. 1-58.

- Ochocki, J.D. & M.C. Simon. 2013. Nutrient-sensing pathways and metabolic regulation in stem cells. *J. Cell Biol.* 203: 23–33.
- Olmos, J. & J. Paniagua-Michel. 2014. *Bacillus subtilis* a potential probiotic bacterium to formulate functional feeds for aquaculture *J. Microb. Biochem. Technol.* 6: 7.
- Olmos, J, M. Acosta, G. Mendoza, V Pitones. 2020. *Bacillus subtilis*, an ideal probiotic bacterium to shrimp and fish aquaculture that increase feed digestibility, prevent microbial diseases, and avoid water pollution. *Arch. Microbiol.* 202: 427–435.
- Pardo, Z., I. Fernández-Fígares, M. Lachica, L. Lara, R. Nieto, I. Seiquer. 2021. Impact of heat stress on meat quality and antioxidant markers in iberian pigs. *Antioxidants (Basel)* 10(12): 1911.
- Pearce, S., V. Mani, T. Weber, R. Rhoads, J. Patience, L. Baumgard, N. Gabler. 2013. Heat stress and reduced plane of nutrition decreases intestinal integrity and function in pigs. *J. Anim. Sci.* 91: 5183-5193.
- Pearce, S.C., M.V. Sanz- Fernandez, J.H. Hollins, L.H. Baumgard, N.K. Gabler. 2014. Short-term exposure to heat stress attenuates appetite and intestinal integrity in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 92: 5444-5454.
- Pérez-Bustillo, B. 2021. Adición de metionina a dietas para cerdos en estrés por calor: efecto en la actividad antioxidante e integridad del epitelio intestinal. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Baja California.
- Price, K. L., H.R. Totty, H.B. Lee, M.D. Utt, G.E. Fitzner, L. Yoon, J. Escobar, J. 2014. Use of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product on growth performance and microbiota of weaned pigs during *Salmonella* infection. *J. Anim. Sci.* 88: 3896–3908.

- Renaudeau, D., C., Anais, L. Tel., J. L. Gourdine. 2010. Effect of temperature on thermal acclimation in growing pigs estimated using a nonlinear function. *J. Anim. Sci.* 88: 3715–3724.
- Renaudeau, D., J.L. Gourdine, N.R. St-Pierre. 2011. A meta-analysis of the effects of high ambient temperature on growth performance of growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 89, 2220–2230.
- Renaudeau, D.; J. Gourdine, J. Fleury, S. Ferchaud, Y. Billon, J. Noblet, H. Gilbert. 2014. Selection for residual feed intake in growing pigs: effects on sow performance in a tropical climate. *J. Anim. Sci.* 92(8): 3568-3579.
- Ringseis, R. & K. Eder. 2022. Heat stress in pigs and broilers: role of gut dysbiosis in the impairment of the gut-liver axis and restoration of these effects by probiotics, prebiotics and synbiotics. *J. Anim. Sci Biotechnol.* 13(1): 126.
- Ross, J., B. Hale, N. Gabler, R. Rhoads, A. Keating, L. Baumgard. 2015. Physiological consequences of heat stress in pigs. *Anim. Prod. Sci.* 55: 1381-1390.
- Salvo-Romero, E.C., C. Alonso Cotoner, C. Pardo Camacho, M. Casado Bedmar, M. Vicario. 2015. Función barrera intestinal y su implicación en enfermedades digestivas. *Rev. Esp. Enfer. Dig.* 107(11): 686-696.
- Samanya, M. & K. Yamauchi. 2002. Histological alterations of intestinal villi in chickens fed dried *Bacillus subtilis var. natto*. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 133(1): 95-104.
- Sambrook, J. & D. Russell. 2001. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3^o Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sanz Fernandez, M.V., S.K. Stoakes, M. Abuajamieh, J.T. Seibert, J.S. Johnson, E.A. Horst, R.P. Rhoads, L.H. Baumgard. 2015. Heat stress increases insulin sensitivity in pigs. *Physiol. Rep.* 3(8): e12478.

- Sauer, W. C. & L. Ozimek. 1986. Digestibility of amino acids in swine: Results and their practical applications. A review. *Livest. Prod. Sci.* 15: 367–388.
- Schaart, M.W., H. Schierbeek, S.R. van der Schoor, B. Stoll, D.G. Burrin, P.J. Reeds, J.B. van Goudoever. 2005. Threonine utilization is high in the intestine of piglets. *J. Nutr.* 135: 765–770.
- Sebastian, A.P. & T.R. Keerthi. 2014. Immunomodulatory effect of probiotic strain *Bacillus subtilis* MBTU PBBMI spores in Balb/C Mice. *Int. J. Eng. Tech. Res.* 2: 258–260.
- Serviento, A.M., B. Lebret, D. Renaudeau. 2020. Chronic prenatal heat stress alters growth, carcass composition, and physiological response of growing pigs subjected to postnatal heat stress. *J. Anim. Sci.* 98: 161.
- Serviento, A.M., M. Castex, D. Renaudeau, E. Labussière. 2023. Effect of live yeast supplementation and feeding frequency in male finishing pigs subjected to heat stress. *Br. J. Nutri.* 129(11): 1855-1870.
- Setlow, P. 2006. Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *J. Appl. Microbiol.* 101(3): 514–525.
- Smiricky-Tjardes, M.R., C.M. Grieshop, E.A. Flickinger. 2003. Dietary galactooligosaccharides affect ileal and total-tract nutrient digestibility, ileal and fecal bacterial concentrations, and ileal fermentative characteristics of growing pigs. *J. Anim. Sci.* 81: 2535–2545.
- Sohail, M.U., M.E. Hume, J.A. Byrd, D.J. Nisbet, A. Ijaz, A. Sohail A. 2012 Effect of supplementation of prebiotic mannan-oligosaccharides and probiotic mixture on growth performance of broilers subjected to chronic heat stress. *Poult. Sci.* 91(9): 2235–2240.
- Song, J., L.F. Jiao, K. Xiao, Z.S. Luan, C.H. Hu, B. Shi. 2013. Cello-oligosaccharide ameliorates heat stress-induced impairment of intestinal microflora,

- morphology and barrier integrity in broilers. *Anim. Feed Sci. Technol.* 185: 175–181.
- Sonna, L., J. Fujita, S. Graffin, C. Lilly. 2002. Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J. Appl. Physiol.* 92: 1725-1742.
- Sorokulova I. 2013. Modern status and perspectives of *Bacillus* bacteria as probiotics *J. Prob. Health.* 1: 4.
- St-Pierre, N., B. Cobanov, G. Schnitkey. 2003. Economic losses from heat stress by US livestock industries. *J. Dairy Sci.* 86: 52-77.
- Su, Y., C. Liu, H. Fang. 2020. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microb. Cell Fact.* 19: 173.
- Sun, Y., S. Hürlimann, E. Garner. 2023. Growth rate is modulated by monitoring cell wall precursors in *Bacillus subtilis*. *Nat. Microbiol.* 8(3): 469–480.
- Surai, P.F., I.I. Kochish, V.I. Fisinin, M.T. Kidd. 2019. Antioxidant defense systems and oxidative stress in poultry biology: An update. *Antioxidants* 8: 235.
- Suva, M.A., V.P. Sureja, D.B. Kheni. 2016. Novel insight on probiotic *Bacillus subtilis*: Mechanism of action and clinical applications. *J. Curr. Res. Sci. Med.* 2(2): 65-72.
- Suzuki, T. 2020. Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions. *J. Anim. Sci.* 91(1): e13357.
- Turner, J.R. 2006. Molecular Basis of Epithelial Barrier Regulation: From Basic Mechanisms to Clinical Application. *Am. J. Pathol.* 169: 1901–1909.
- Turner, J.R. 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* 9(11): 799–809.
- Umeda, K., J. Ikenouchi, S. Katahira-Tayama, K. Furuse, H. Sasaki, M. Nakayama., T. Matsui, S. Tsukita, M. Furuse, S. Tsukita. ZO-1 and ZO-2 independently

determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation. *Cell* 126(4): 741-54.

- Vásquez, N., M. Cervantes, H. Bernal-Barragán, L.E. Rodríguez-Tovar, A. Morales. 2022. Short- and long-term exposure to heat stress differently affect performance, blood parameters, and integrity of intestinal epithelia of growing pigs. *Animals (Basel)*. 12:2529.
- Wang, Y., J.H. Cho, Y.J. Chen, J.S. Yoo, Y. Huang, H.J. Kim, I.H. Kim. 2009. The effect of probiotic BioPlus 2B® on growth performance, dry matter and nitrogen digestibility and slurry noxious gas emission in growing pigs. *Livest. Sci.* 120: 35–42.
- Wang, W.C., F.F. Yan, J.Y. Hu, O.A. Amen, H.W. Cheng. 2018. Supplementation of *Bacillus subtilis*-based probiotic reduces heat stress-related behaviors and inflammatory response in broiler chickens. *J. Anim. Sci.* 96(5): 1654–1666.
- Wilson, T. E. & C. G. Crandall. 2011. Effect of thermal stress on cardiac function. *Exerc. Sport Sci. Rev.* 39: 12–17.
- White, M.G., O. Saleh, D. Nonner, E.F. Barrett, C.T. Moraes, J.N. Barrett. 2012. Mitochondrial dysfunction induced by heat stress in cultured rat CNS neurons. *J. Neurophysiol.* 108: 2203–2214.
- Wu, G., F. Bazer, T. Davis, S. Kim, P. Li, J. Rhoads, M. Satterfield, S. Smith, T. Spencer, Y. Yin. 2009. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids* 37: 153-168.
- Xia, B., W. Wu, W. Fang, X. Wen, J. Xie, H. Zhang. 2022. Heat stress-induced mucosal barrier dysfunction is potentially associated with gut microbiota dysbiosis in pigs. *Anim. Nutr.* 8: 289-299.
- Xin, H. & J. Harmon. 1998. Livestock industry facilities and environment: heat stress indices for livestock. Agriculture and Environment Extension Publications 163. Iowa State University.

- Xiong, J., X.S. Liao, T. Yin, X.C. Liu, L. Bao, L.Q. Li. 2022. Alterations of the gut microbiota and short chain fatty acids in necrotizing enterocolitis and food protein-induced allergic proctocolitis infants: a prospective cohort study. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 12: 1-15.
- Yan, Y.E., Y.Q. Zhao, H. Wang, M. Fan. 2006. Pathophysiological factors underlying heatstroke. *Med. Hypotheses* 67: 609–617.
- Yang, O. O., T. Kelesidis, R. Cordova, H. Khanlou. 2014. Immunomodulation of antiretroviral drug-suppressed chronic HIV-1 infection in an oral probiotic double-blind placebo-controlled trial. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 30: 988–995.
- Yirga, H. 2015. The use of probiotics on animal nutrition. *J. Probiotics and Health* 3: 132.
- Yu, J., P. Yin, F. Liu, G. Cheng, K. Guo, A. Lu, X. Zhu, W. Luan, J. Xu. 2010. Effect of heat stress on the porcine small intestine: morphological and gene expression study. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 156: 119-128.
- Yue, B., Z.L. Yu, C. Lv, X.L. Geng, Z.T. Wang, W. Dou. 2020 Regulation of the intestinal microbiota: An emerging therapeutic strategy for inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 26(30): 4378-4393.