

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



**“EFECTO DEL ESTRÉS POR CALOR EN LA INTEGRIDAD
DEL EPITELIO INTESTINAL DEL CERDO”**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

PRESENTA

NYDIA CORINA VÁSQUEZ AGUILAR

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ADRIANA MORALES TREJO

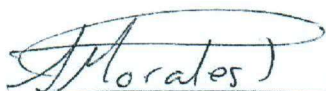
MEXICALI, BAJA CALIFORNIA

DICIEMBRE, 2018

La presente tesis “Efecto del estrés por calor en la integridad del epitelio intestinal del cerdo” realizada por la C. Nydia Corina Vásquez Aguilar, 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

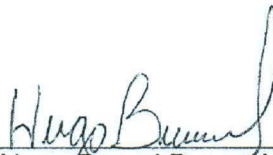
Comité Particular




Dra. Adriana Morales Trejo
Directora de Tesis



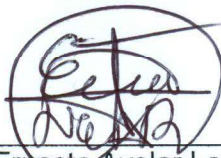
Dr. Miguel Cervantes Ramirez
Secretario



Dr. Hugo Bernal Barragan
Sinodal



Dr. Luis Edgar Rodriguez Tovar
Sinodal



Dr. Ernesto Avelar Lozano
Sinodal

Agradecimientos

Agradezco al Instituto de Ciencias Agrícolas y a la Universidad Autónoma de Baja California, por permitirme realizar mis estudios de Doctorado.

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

De forma especial agradezco a mi asesora la Dra. Adriana Morales Trejo, quien me brindó su confianza para formar parte de su maravilloso equipo y siempre estuvo pendiente de mis avances, compartió conmigo sus conocimientos y experiencia en el área de Biología Molecular; además de brindarme su tiempo, consejos y apoyo incondicional durante todo este tiempo.

Al Dr. Miguel Cervantes Ramírez, por compartir su simpatía, conocimientos y experiencia con una servidora; por quien siento un profundo respeto y una gran admiración.

Al Dr. Hugo Bernal Barragán, por su amistad, confianza a lo largo de todo este tiempo; por ser mi guía académico y por enriquecer con sus valiosas aportaciones esta investigación.

Al Dr. Ernesto Avelar Lozano, por sus valiosas aportaciones al trabajo; por su amistad, consejos y experiencia.

Al Dr. Luis Edgar Tovar, por sus críticas valiosas al presente trabajo y por su apoyo a lo largo de todo este tiempo.

Al MC. Salvador Espinoza Chávez por las facilidades en la granja experimental del ICA, UABC.

Al MC.MVZ. Armando Trejo, por permitirme usar las instalaciones del laboratorio, para la preparación de las muestras de histología

A todos mis amigos y compañeros del Cuerpo Académico de Nutrición Animal (CANA), de quienes aprendí muchas cosas, por estar en las buenas y en las malas con una servidora.

Además, quiero expresar un profundo un profundo agradecimiento a todas las personas que no cité anteriormente, pero que contribuyeron de alguna manera u otra para la realización de este trabajo de investigación.

A todos y cada uno de ustedes mi más sincero agradecimiento.

Dedicatoria

A Dios, por permitirme llegar a este momento tan especial. Por los triunfos y momentos difíciles que me han enseñado a valorarlo cada día más.

A mis amados hijos César y Valentina, quienes liberan mi mente de todas las adversidades que se presentan y quienes son mi motor para superarme y ofrecerles siempre lo mejor.

A mi esposo Gerardo Moreno por su comprensión y apoyo incondicional por tantos años.

A mis padres, Andrés Vásquez Ramírez y Elidia Aguilar Palacios; por creer en mí y por impulsarme a seguir adelante, porque en gran parte gracias a ustedes, hoy puedo ver alcanzada esta meta.

A mis hermanos Martha y Adrián, quienes siempre me han demostrado su cariño y aprecio, a través de sus consejos, palabras de aliento.

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

Abreviaturas

EC	Estrés por calor
ECA	Estrés por calor agudo
ECC	Estrés por calor crónico
GDP	Ganancia diaria de peso
CDA	Consumo diario de alimento
C:G	Consumo: Ganancia
kg	Kilogramo
T1	Tratamiento 1
T2	Tratamiento 2
T3	Tratamiento 3
HSP	Heat shock proteins
TMI	Iones metálicos de transición
e ⁻	electrones
ATP	Adenosín trifosfato
LDH	Lactato deshidrogenasa
PDK 4	Piruvato deshidrogenasa quinasa 4
SNC	Sistema Nervioso Central
SNE	Sistema Nervioso Entérico
JAM	Junctional adhesion molecules
NEFA	Ácidos grasos no esterificados
h	horas
cm	Centímetros
m	metros
TLR	Toll like receptor
GALT	Gut associated lymphoid tissue
IL	Interleucina
TNF	Factor de necrosis tumoral
ml	mililitros
ARN	Ácido ribonucleico

µm	Micrómetro
PBS	Buffer fosfato salino
PAS	Ácido peryódico de Schiff
AA	Azul de alciano
RT	Retrotranscripción
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de polimerasa cuantitativo
DNTP	Deoxinucleósido trifosfato
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
Cbp	Cuanto basta para
ng	nanogramos
kDa	KiloDalton
pb	Pares de bases
VPC	Volumen de paquete celular
Hb	Hemoglobina
BUN	Blood urea nitrogen
ZO-1	Proteína Zona occludens-1

Índice de contenido

COMITÉ PARTICULAR.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
DEDICATORIA.....	V
INDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	XI
RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	2
2.1 Estrés por calor.....	2
2.2 Efecto del EC en la producción, fisiología y salud animal....	3
2.3 Efecto del EC a nivel celular.....	5
2.4 Efecto del EC en el metabolismo de lípidos y proteínas.....	8
2.4.1 <i>Metabolismo de lípidos</i>	8
2.4.2 <i>Metabolismo de proteínas</i>	9
2.4.3 <i>Metabolismo de carbohidratos</i>	9
2.5 Intestino delgado.....	12
2.5.1 <i>Anatomía del intestino delgado en cerdos</i>	12
2.5.2 <i>Duodeno</i>	12
2.5.3 <i>Yeyuno</i>	13
2.5.4 <i>Íleon</i>	14
2.6 Histología del intestino delgado.....	15
2.6.1 <i>Mucosa</i>	15
2.6.2 <i>Submucosa</i>	17
2.6.3 <i>Muscularis propia</i>	17
2.6.4 <i>Serosa</i>	17
2.7 Barrera intestinal.....	18
2.7.1 <i>Anatomía de la barrera intestinal</i>	18
2.7.2 <i>Elementos extracelulares</i>	18
2.7.3 <i>Elementos celulares</i>	20
2.8 Componentes transmembranales de las uniones estrechas..	23

2.8.1 <i>Ocludina</i>	24
2.8.2 <i>Claudinas</i>	25
2.8.3 <i>Zonoccludinas (ZO)</i>	26
2.9 Daños y respuesta al daño intestinal.....	27
2.10 Efecto del estrés por calor en la integridad del epitelio intestinal.....	27
2.11 Efecto del estrés por calor en la morfología de las vellosidades intestinales.....	28
2.12 Permeabilidad intestinal.....	30
2.13 Sistema inmune.....	31
2.13.1 Estrés por calor y sistema inmune.....	33
3. HIPÓTESIS.....	35
4. OBJETIVOS.....	35
4.1 Objetivo general.....	35
4.2 Objetivo particular.....	35
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
5.1 Procedimiento experimental y manejo de los animales.....	36
5.2 Histología intestinal.....	38
5.3 Análisis de contenido de mucina en cortes histológicos de intestino.....	40
5.4 Detección de células intestinales en apoptosis.....	41
5.5 Extracción de ARN total.....	42
5.6 Transcripción reversa (RT).....	42
5.7 Expresión de proteínas de unión estrecha.....	43
5.8 Análisis estadístico.....	44
6. RESULTADOS.....	
6.1 Condiciones ambientales.....	45
6.2 Comportamiento productivo de los cerdos.....	45
6.3 Hemograma y química sanguínea.....	47
6.4 Alteraciones morfológicas de intestino delgado.....	49
6.5 Mucina.....	55

6.6 Apoptosis.....	59
6.7 Expresión de proteínas de unión estrecha.....	59
7. DISCUSIÓN.....	62
8. CONCLUSIONES.....	73
9. LITERATURA CITADA.....	74

Índice de cuadros y figuras

Índice de cuadros

Cuadro 1.	Dieta experimental ofrecida a los cerdos en crecimiento	37
Cuadro 2.	Oligonucleótidos empleados para el análisis de expresión de proteínas de unión estrecha y ARN ribosomal 18 S	43
Cuadro 3.	GDP, CDA y Relación consumo: ganancia de cerdos en crecimiento alojados en condiciones de Confort, ECA y ECC	45
Cuadro 4.	Resultados de análisis sanguíneos, hemograma, química sanguínea, realizados a cerdos en crecimiento en condiciones de Confort, ECA y ECC	48
Cuadro 5.	Morfometría del ID de cerdos en crecimiento en condiciones de Confort, ECA y ECC	52
Cuadro 6.	Células positivas a la tinción PAS-Azul de Alcian	55
Cuadro 7.	Núcleos apoptóticos en área de 10000 μm^2	59
Cuadro 8.	Expresión relativa de proteínas de unión estrecha	60

Índice de figuras

Figura 1.	Índice de EC para cerdos en crecimiento/engorda	3
Figura 2.	EC y producción de radicales libres	7
Figura 3.	Tracto digestivo del cerdo	12
Figura 4.	Histología del intestino delgado	14
Figura 5.	Capas del tubo digestivo interior a exterior	16
Figura 6.	Componentes celulares y moleculares de la barrera intestinal	19
Figura 7.	Representación de las uniones intercelulares	24
Figura 8.	Cambios en la morfología de íleon en cerdos expuestos a EC	29
Figura 9.	Proteínas transmembrana de las uniones estrechas	31
Figura 10.	Red de colaboración entre inmunidad innata y adaptativa	32
Figura 11.	Sitios histológicos y localización del ID empleado para análisis morfométrico	39
Figura 12.	Temperatura ambiente y humedad relativa de los periodos de Confort, ECA y ECC dentro de las sala donde se alojaron los cerdos	46
Figura 13.	a) Comparativa de altura de vellosidades y b) profundidad de las criptas por sección intestinal	50
Figura 14.	Cambios morfológicos en duodeno, debido a los tres tratamientos evaluados (a.-TN: Termoneutralidad, b.- ECA=EC agudo,c.- ECC=EC crónico), Tinción H&E	51
Figura 15.	Cambios morfológicos en yeyuno, debido a los tres tratamientos evaluados (a.-TN: Termoneutralidad, b.- ECA=EC agudo,c.- ECC=EC crónico), Tinción H&E	52
Figura 16.	Cambios morfológicos en íleon, debido a los tres tratamientos evaluados (a.-TN: Termoneutralidad, b.- ECA=EC agudo,c.- ECC=EC crónico), Tinción H&E	53
Figura 17.	Cambios en el número de células caliciformes en duodeno	56
Figura 18.	Cambios en el número de células caliciformes en yeyuno	57
Figura 19.	Cambios en el número de células caliciformes en íleon.	58
Figura 20.	Incrementos/decrementos en la expresión de Claudina-2, Ocludina y ZO-1	61

RESUMEN

Temperatura ambiental en valores superiores a los de temperatura de confort, provoca estrés por calor (EC) en los animales que, además de afectar el rendimiento productivo, podría afectar su salud intestinal. En esta investigación se evaluó el efecto del EC agudo (ECA) y crónico (ECC) en el comportamiento productivo, hemograma y química sanguínea, morfología intestinal y expresión de proteínas de unión estrecha (claudina-2, ocludina y zonoccludina-1) del intestino delgado de cerdos en crecimiento. Se emplearon 18 cerdos de 36 kg, alojados en jaulas individuales, recibiendo agua y alimento balanceado *ad libitum*, asignados a 3 tratamientos: T1, Confort (16 días en ambiente a 24 °C); T2: EC agudo (ECA, dos días de EC, 33 ± 4.8 °C) y T3, ECC (siete días de EC, 33 ± 4.8 °C). Al final de cada período los cerdos fueron sacrificados y se colectaron muestras de sangre, mucosa intestinal y porciones sagitales y transversales del intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon). El EC redujo la GDP (P=0.019) y CDA (P<0.001) de los cerdos. En ECA la GDP fue menor (P=0.019) y la relación C:G menos favorable (P<0.040) en comparación con el ECC. El ECA incrementó el conteo de linfocitos (P=0.034), eritrocitos (P=0.008) y plaquetas (P<0.001). El EC también incrementó la concentración sanguínea de urea (P=0.004), colesterol (P=0.062), calcio (P=0.003) y fósforo (P<0.001). A nivel intestinal los cerdos en ECC presentaron acortamiento en la altura de las vellosidades y profundidad de las criptas intestinales (P<0.05) en comparación con los cerdos en confort. El número de células apoptóticas en cerdos ECC se incrementó en 200 y 800% en epitelio de yeyuno e íleon respectivamente, mientras que el número de células productoras de mucina también fue mayor en duodeno y yeyuno (P<0.05) en comparación con cerdos en confort. La expresión de proteínas de unión estrecha (claudina 2 y ocludina) en íleon se redujo por efecto del EC (P<0.05). La expresión de ocludina en yeyuno e íleon, y zonoccludina-1 de los cerdos ECC fue mayor que en los cerdos ECA (P<0.05). En conclusión, además de su efecto negativo en el crecimiento animal, el EC modifica la estructura de las vellosidades intestinales, la expresión de proteínas de unión estrecha, incrementa el número de células en apoptosis y la producción de mucina.

Palabras clave: EC agudo, EC crónico, cerdos

ABSTRACT

Environmental temperatures above the thermo-neutral temperature of the animals cause HS with negative effects on productive performance of the animals, and it could alter also their intestinal health. The effects of acute (AHS) and chronic heat stress (CHS) on the productive behavior, hemogram, blood chemistry, intestinal morphology and expression of tight junction proteins (claudin-2, occludin and zonoccludin-1) of the small intestine of growing pigs were evaluated. Eighteen pigs (36 kg), housed in individual cages, and receiving water and balanced feed *ad libitum* were used and assigned to 3 treatments: T1, thermoneutral (16 days in a room at 24°C); T2: acute HS (AHS, two days of HS) and T3, CHS (seven days of HS). At the end of each period the pigs were slaughtered and samples of blood, intestinal mucosa and sagittal and transverse segments of small intestine (duodenum, jejunum and ileum) were collected. The HS reduced the ADG ($P=0.019$) y FI ($P<0.001$) of the pigs. In AHS, the ADG was lower ($P=0.019$) and the F:G ratio was higher ($P<0.040$) compared to CHS. AHS increased the count of lymphocytes ($P=0.034$), erythrocytes ($P=0.008$) and platelets ($P<0.001$). Heat stress also increased the serum concentration of blood urea ($P=0.004$), cholesterol ($P=0.062$), calcium ($P=0.003$) and phosphorus ($P<0.001$). At the intestinal level, the villus height and depth of the intestinal crypts were shorter in CHS ($P<0.05$) than in thermoneutral pigs. The number of apoptotic cells in CHS pigs increased by 200 and 800% in jejunum's and ileum epithelium respectively, the number of mucin-producing cells was also higher in the duodenum and jejunum ($P<0.05$) compared with thermoneutral pigs. The expression of tight junction proteins (claudin-2 and occludin) in the ileum was reduced by the effect of the HS ($P<0.05$). The occludin expression in jejunum and ileum, as well as zonoccludin-1 in CHS pigs was higher than in AHS pigs ($P<0.05$). In conclusion, in addition to its negative effect on animal growth, at the intestinal level, HS modifies the intestinal villi structure, the expression of tight junction proteins, and increases the number of cells in apoptosis and the production of mucin.

Keywords: acute heat stress, chronic heat stress, pigs

1. INTRODUCCIÓN

La producción intensiva de cerdos y ganado de carne en el noroeste del país decae hasta un 40% durante los meses de verano cuando se registran temperaturas que superan los 40°C. Esta temperatura supera la temperatura de confort de los animales domésticos, quienes en consecuencia padecen estrés por calor (EC; Horowitz *et al.*, 2004). El estudio del EC se ha intensificado en los últimos años como una consecuencia del calentamiento global. Actualmente, el interés en el EC se centra no solamente en conocer cómo se afecta la producción animal, sino también en analizar su efecto a nivel fisiológico intestinal para establecer nuevas medidas de manejo de los animales domésticos con la intención de reducir el problema (Pearce *et al.*, 2014).

En trabajos previos, se ha demostrado que durante el verano los cerdos tienen dificultad no solo para mantener su temperatura corporal, sino también su temperatura intestinal dentro de los límites normales para su especie (Arce *et al.*, 2013). Se ha sugerido que este problema podría tener varios efectos nocivos a nivel de epitelio intestinal, tales como: pérdida o daño directo de las vellosidades intestinales, modificación de las proteínas relacionadas con el mantenimiento de la integridad de las células de la mucosa intestinal, respuesta inflamatoria para la reparación del daño al epitelio y modificación de la flora intestinal adaptada evolutivamente a las condiciones de temperatura del intestino del cerdo, lo que podría favorecer el crecimiento de microorganismos patógenos que fácilmente dañen el epitelio. El daño epitelial podría ser más severo cuando los animales se someten a EC en forma aguda, y con el paso de los días, o en caso de exposición crónica, mostrar cierto grado de adaptación a esta condición (Pearce *et al.*, 2013,2014).

En consecuencia, el objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto del EC agudo y crónico en cerdos en crecimiento sobre sus parámetros productivos, parámetros sanguíneos e integridad del epitelio intestinal.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Estrés por calor

El EC es definido como el conjunto de alteraciones fisiológicas, metabólicas, inmunológicas y de conducta que padecen los animales cuando se exponen a condiciones de temperatura y humedad elevadas (Horowitz *et al.*, 2004; Reneaudeau *et al.*, 2010). En condiciones de EC la temperatura ambiental se encuentra por encima de un punto en donde el animal produce más calor de la digestión y/o recibe más calor del entorno; que lo que es capaz de liberar al medio que lo rodea (Huynh *et al.*, 2005).

Como se observa en la figura 1, cuando la temperatura y humedad se incrementan, desencadenan el EC, que será perjudicial para animales y humanos. Se han reportado distintas fases (normal, alerta, peligro, emergencia) de EC; definiendo la fase de peligro, como aquella en la que la temperatura crítica superior (27°C), es el límite de un cambio considerable en la producción de calor. Durante esta fase se incrementa la tasa respiratoria, el animal reduce el consumo de alimento, por consiguiente, existe una disminución en el crecimiento de cerdos en engorda y/o en la producción de leche en cerdas lactantes (Chambers, 2012).

A medida que se incrementa la temperatura interna del animal, se llega a un punto en donde es imposible incrementar mediante la respiración la pérdida de humedad (conocida como fase de emergencia), debido a que la capacidad de eliminación de calor por parte del animal se encuentra al máximo.

En consecuencia, durante gran parte del año en el norte y zonas tropicales de México, así como en gran parte del mundo, la producción animal se lleva a cabo bajo condiciones de temperatura y/o humedad elevadas, que generan EC de moderado a severo. Dichas condiciones impactan negativamente la productividad, generando pérdidas económicas a la industria pecuaria, sobre todo durante los meses de verano cuando la temperatura ambiental supera los 40° C (León *et al.*, 2005, Huynh *et al.*, 2005). Específicamente en

cerdos se ha demostrado susceptibilidad a cambios ambientales, entre los que destaca el EC (Pearce *et al.*, 2014).

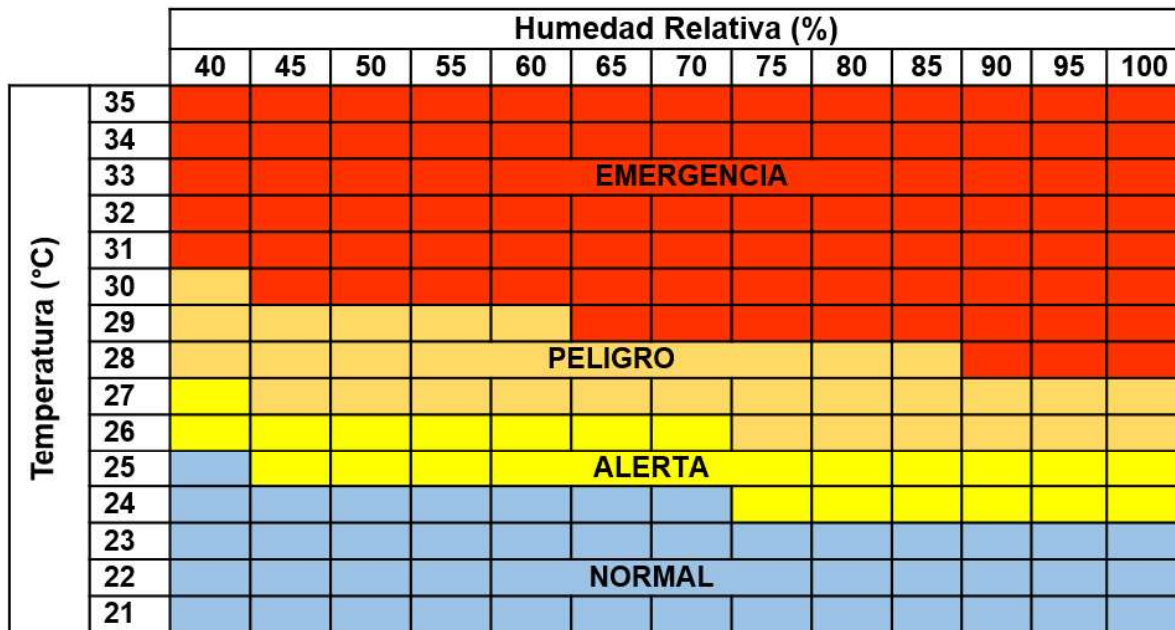


Figura 1. Índices de EC para cerdos en crecimiento/engorda (Chambers, 2012).

Actualmente, a consecuencia del calentamiento global se requieren estudios para evaluar los efectos del EC en animales y humanos, involucrando no solo el aspecto productivo, sino también a nivel fisiológico y de salud, todo ello con el objetivo de establecer medidas de manejo adecuadas para aminorar el problema.

2.2 Efecto del EC en la producción, fisiología y salud animal

El EC afecta a la ganadería al reducir parámetros productivos e incrementar los costos en el cuidado de la salud de los animales. Los animales expuestos a temperatura ambiental elevada, por arriba de su umbral de tolerancia, modifican su fisiología para mantener su temperatura corporal y superar el estrés. Estas modificaciones sugieren un desvío de nutrientes para aclimatación como medida de seguridad, en consecuencia, el crecimiento y la producción pasan a segundo término.

Algunos reportes en la literatura acerca del efecto del EC en los cerdos indican cambios en su conducta y fisiología, tales como reducción en el consumo de alimento (Nyachoti *et al.*, 2004), incremento en la temperatura corporal e intestinal (Morales *et al.*, 2015) y en la tasa respiratoria (Le Bellego *et al.*, 2002; Pearce *et al.*, 2013a). Estos cambios podrían ocasionar también consecuencias metabólicas importantes en diferentes órganos y sistemas (Zhang *et al.*, 2002).

El EC ocasiona una marcada reducción en el consumo de alimento en cerdos debido a que se reduce la producción de calor metabólico (Pearce *et al.*, 2013a). En este sentido, Le Dividich *et al.* (1998) reportaron en cerdos una disminución de entre 40 a 80 g/d en el consumo voluntario de alimento, por cada grado centígrado de incremento de temperatura ambiental, dependiendo de la raza, peso, dieta, así como del rango de temperatura ambiental estudiado.

Posteriormente, Huynh *et al.* (2005) confirmaron que el consumo de alimento en cerdos de 60 kg de peso disminuye linealmente a partir de que la temperatura ambiental alcanza los 23°C. Estos mismos autores concluyeron que el aumento en la temperatura ambiental, por encima del de la humedad relativa, afecta marcadamente la fisiología y rendimiento del animal. Otros trabajos coinciden en que uno de los principales efectos del EC agudo o crónico es una marcada reducción en el consumo de alimento (Pearce *et al.*, 2013a, Huynh *et al.*, 2005)

Se ha sugerido que al incrementar el índice temperatura-humedad, se incrementó la temperatura rectal de las vacas lecheras por encima de sus umbrales críticos se ha relacionado directamente con una disminución en el consumo de alimento, y una reducción en la producción de leche (West, 2003). Otros trabajos han demostrado que cerdos expuestos a condiciones de EC tienden a incrementar su temperatura corporal en aproximadamente 1°C por arriba de la temperatura corporal normal observada en su especie (Liu *et al.*, 2009; Pearce *et al.*, 2013a).

El sistema nervioso central es el responsable de la respuesta fisiológica a la termorregulación del cerdo, debido a que las neuronas sensibles a los cambios de temperatura se encuentran localizadas en el núcleo preóptico del hipotálamo (Downing y Miyan, 2000). Dichas neuronas son las responsables de desencadenar los procesos fisiológicos para disipar el exceso de calor (Troy *et al.*, 2010).

La vasodilatación periférica es la primera respuesta fisiológica de este proceso (Ooue *et al.*, 2007), así como el aumento del flujo sanguíneo hacia piel y extremidades, con lo cual se recupera el estado normotérmico, continuando con la disipación de calor mediante respiraciones fuertes y rápidas (jadeo), y la pérdida de calor por evaporación (Manteca, 1999). En cerdos expuestos a EC se han observado estos cambios, por ejemplo, Huynh *et al.* (2005) observaron un incremento en la frecuencia respiratoria de hasta 150 respiraciones/min. Conviene mencionar que los cerdos poseen glándulas sudoríparas queratinizadas, que les impide disipar el calor mediante la sudoración, por lo que el mecanismo para la disipación del calor se realiza direccionando el flujo sanguíneo hacia la periferia (Alarcón *et al.*, 2008). La redistribución del flujo sanguíneo hacia tejidos periféricos, ocasiona una disminución en la irrigación de sangre hacia órganos internos (p. ej., intestino), y en consecuencia hipoxia, deficiencia nutricional y susceptibilidad a infecciones en esos órganos (Pearce *et al.* 2013b). Como consecuencia, la combinación de todos estos cambios asociados a EC, también tiene un efecto inmunosupresor en los cerdos (Sutherland *et al.*, 2006).

Otro aspecto a considerar sería que el EC modifica la temperatura intestinal (Morales *et al.*, 2015) de los cerdos afectando la composición y distribución de la microflora, lo que en consecuencia pudiera favorecer la proliferación de microorganismos patógenos y brotes de enfermedades infecciosas (Liu *et al.*, 2009).

2.3 Efecto del estrés por calor a nivel celular

A nivel celular existe un grupo de proteínas, conocidas como proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en inglés: Heat Shock Proteins), las cuales representan entre el 1 y

2% de las proteínas celulares en las células eucariotas bajo condiciones fisiológicas normales.

Las HSP son proteínas inducidas por el estrés, principalmente como consecuencia de un aumento en la temperatura ambiental o de otros factores estresantes (Sonna *et al.*, 2002). Su función consiste en unirse a proteínas mal plegadas, y ayudar a restaurar su conformación nativa (Bouchama y Knochel, 2002).

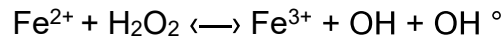
La familia de proteínas HSP es muy grande, y se pueden agrupar de acuerdo con su peso molecular, secuencia de aminoácidos (Westman y Sharma, 1998), así como por su estructura y función (Park *et al.*, 2000). Las principales proteínas de choque térmico son: HSP110, HSP90, HSP70, HSP60, y HSP27 (Arya *et al.*, 2007), cada una con funciones y localizaciones celulares independientes (Feige y Polla, 1994).

Se cree que la proteína HSP90 juega un papel crucial en la termotolerancia celular (Deb *et al.*, 2014) y la HSP70 en la crioprotección (Volloch y Rits, 1999). Ésta última frecuentemente es utilizada como biomarcador de la magnitud y duración del EC en las células (Mizzen y Welch, 1988). Sin embargo, si el daño por exposición al calor no puede repararse, a consecuencia de una catástrofe mitótica, se inducirá la apoptosis (Roti, 2008).

Una sobreexpresión de HSP70 protege las células epiteliales intestinales de agentes tóxicos y condiciones ulcerosas en la mucosa intestinal (Oyake *et al.*, 2006), en esta condición se favorece la recuperación de úlceras, ya que incrementa la proliferación celular, inhibe la apoptosis de células y acelera la síntesis proteica (Pierzchalski *et al.*, 2006).

Algunos reportes indican que la exposición al calor por tiempos prolongados, incrementa la producción de radicales libres de oxígeno e induce estrés oxidativo, lo que puede generar toxicidad (Bernabucci *et al.*, 2002; Lord-Fontaine and Averill-Bates, 2002). La sobreproducción de iones metálicos de transición (TMI) generados por incremento en la carga térmica, aumenta la tasa de liberación de hierro de la ferritina (Belhadj *et al.*, 2015). Estos iones pueden donar electrones (e^-) al oxígeno y formar el anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Agarwal y Prabhakaran, 2005). De acuerdo con la reacción

de Fenton, el H₂O₂ se reduce aún más al radical hidroxilo (OH⁻), el cuál es altamente reactivo (Liochev y Fridovich, 1999).



Un incremento descontrolado en los radicales libres provoca reacciones en cadena que se dirigen de forma indiscriminada y dañan la estructura molecular de las proteínas (Stadtman y Levine, 2000), lípidos (Rubbo *et al.*, 1994), polisacáridos (Kaur y Halliwell, 1994) y ácidos desoxirribonucleico (DNA; LeDoux *et al.*, 1999).

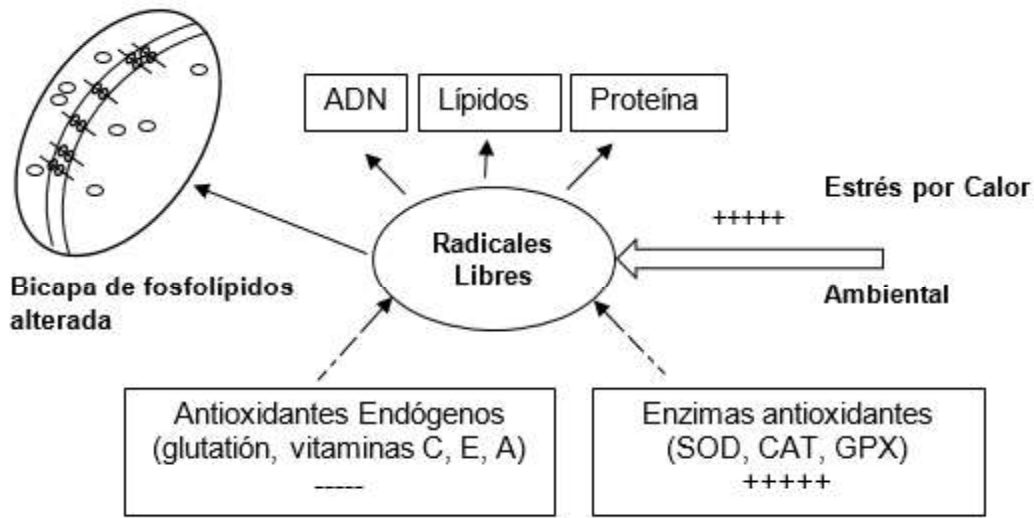


Figura 2. EC y la producción de radicales libres (Belhadj *et al.*, 2015).

En consecuencia, el incremento en los niveles de radicales libres producidos durante el EC provoca un incremento en la actividad de enzimas antioxidantes como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (Belhadj *et al.*, 2015). Así también la célula hace un mayor uso de antioxidantes endógenos como glutatión, vitaminas (E, C y A) y β-caroteno (Kumar *et al.*, 2011, Pandey *et al.*, 2012). En la Figura 2 se resumen estos mecanismos. En resumen, el EC puede considerarse citotóxico, ya que altera moléculas

biológicas, funciones celulares, induce daño celular oxidativo y activa la muerte celular mediante apoptosis y/o necrosis (Du *et al.*, 2008; Pandey *et al.*, 2012).

2.4. Efecto del estrés por calor en el metabolismo de lípidos y proteínas

El EC altera el metabolismo energético de los organismos. Se ha documentado un incremento en la retención de lípidos en las canales de rata (Schmidty and Widowson, 1967), pollo (Geraert *et al.*, 1996) y cerdo (Heath, 1983) cuando estos se expusieron a condiciones de EC. Así también, reportes en literatura han demostrado que el EC reduce la concentración de ácidos grasos no esterificados (NEFA: por sus siglas en ingles), derivados de la lipólisis y movilización de grasas, en ratas (Sanders *et al.*, 2009), cerdos (Pearce *et al.*, 2011) y ganado bovino (Schwartz *et al.*, 2009).

Algunos estudios en ratas han demostrado que el EC reduce la velocidad lipolítica *in vivo* y la actividad *in vitro* de enzimas lipolíticas (Torlinska *et al.*, 1987). Así mismo, Christon (1988), reportó en cerdos el EC incrementó la lipasa lipoproteica del tejido adiposo, lo que indicaría un incremento en capacidad de liberar ácidos grasos a partir de los triglicéridos almacenados.

2.4.1 Metabolismo de lípidos

El metabolismo de los lípidos también se ve afectado por condiciones de EC crónico. Reportes en la literatura aseveran que la oxidación de grasas en diferentes especies se reduce; por ejemplo, bajo condiciones de EC, los niveles basales de ácidos grasos no esterificados se redujeron en roedores (Sanders *et al.*, 2009), cerdos (Pearce *et al.*, 2011) y vacas lecheras (Schwartz *et al.*, 2009). Aparentemente la reducción en la actividad lipolítica del tejido adiposo funciona como mecanismo de adaptación de la generación del calor, en animales expuestos a EC. Esta observación es apoyada por Sanders *et al.*, (2009), quienes además demostraron que bajo condiciones de EC se incrementa la actividad de la lipasa lipoproteica del tejido adiposo, lo cual sugiere que los animales hipertérmicos tienen una mayor capacidad de almacenamiento de triglicéridos.

En roedores (Katsumata *et al.*, 1990), pollos (Geraert *et al.*, 1996) y en aves de corral en crecimiento (Lu *et al.*, 2007), mostraron una mayor acumulación de grasa cuando los animales fueron criados bajo condiciones de EC.

2.4.2 Metabolismo de proteínas

Algunos autores mencionan que el EC disminuye la acumulación de proteína e incrementa la ganancia de grasa corporal (Ain Baziz *et al.*, 1996; Geraert *et al.*, 1996). Yuniato *et al.*, (1997), reportaron que la acumulación de proteína disminuye en condiciones de EC en pollos, lo cual podría estar regulado a diferentes niveles, ya sea desde su transcripción (Jacob, 1995), tasa de proteólisis y/o recambio de proteína (Temim *et al.*, 2000).

La duración de exposición al EC también afecta de forma distinta a los animales hipertérmicos (Gonzalez-Esquerria y Leesson, 2005). Por ejemplo, se ha observado que la exposición corta a EC, incrementa el catabolismo de proteínas, lo cual se relaciona con los incrementos en la concentración de ácido úrico en plasma, disminución de la síntesis de proteínas, retención de nitrógeno, así como una disminución en las concentraciones plasmáticas de ácido aspártico, serina, tirosina y cisteína (Tabiri *et al.*, 2000). Así mismo a la exposición al EC crónico, se le atribuye la disminución en la síntesis de proteínas, recambio de proteínas, bajos niveles de aminoácidos en plasma (especialmente aminoácidos de cadena ramificada) y altos niveles en suero de aspartato, ácido glutámico y fenilalanina (Geraert *et al.*, 1996; Temim *et al.*, 2000).

Le Bellego *et al.*, (2002) demostraron que existió una mayor acumulación de grasa en cerdos a los que se les ofreció una dieta alta en grasa y energía en comparación con a los animales que se les ofreció una dieta alta en proteína. Además de que los incrementos del catabolismo de proteínas bajo condiciones de EC crónico es probable que produzcan glucosa mediante la vía de la gluconeogénesis.

2.4.3 Metabolismo de carbohidratos

Los carbohidratos son fuente de energía rápidamente disponible, que pueden convertirse en intermediarios metabólicos y emplearse en la síntesis de reacciones o producción de ATP. El proceso de síntesis de ATP es altamente regulado e involucra tres vías

metabólicas distintas: la glicolisis, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y fosforilación oxidativa (Horton *et al.*, 2008).

La severidad y duración del estrés podrían afectar los niveles de glucosa en sangre. Algunos reportes en literatura indican que el EC no modifica la concentración de glucosa en sangre de pollos (Lin *et al.*, 2000) y ratas (Miova *et al.*, 2013). Sin embargo, se ha observado un nivel reducido de glucosa circulante en bovinos expuestos a EC crónico (Ithon *et al.*, 1998; Settivari *et al.*, 2007; O'Brien *et al.*, 2010), y en ovinos en EC agudo (Achmadi *et al.*, 1993). Los aumentos en la entrada al "pool" de glucosa junto con el descenso de glucosa en sangre, puede sugerir una tasa más elevada de salida de glucosa a circulación sanguínea (Belhadj Slimen *et al.*, 2015); por lo cual se considera a la glucosa como combustible preferido de los animales expuestos a EC (Belhadj Slimen *et al.*, 2015).

Al incrementarse la reducción de la oxidación de ácidos grasos, los animales expuestos a EC; son más dependientes de glucosa para cubrir sus necesidades energéticas. Considerando la disminución tanto en el consumo de alimento, así como en los niveles de glucosa en sangre, estos se ven comprometidos para cubrir las variables de producción (lactancia y crecimiento; Baumgard y Rhoads, 2007). Por lo tanto, animales como vacas (Moore *et al.*, 2005), pollos (Simmons *et al.*, 1997) y conejos (Szendrő, 2008) entran en un estado de balance energético negativo.

A consecuencia de la exposición corta a EC se ha observado una reducción en la actividad del ciclo de los ácidos tricarboxílicos con menor excreción urinaria de succinato, citrato y 2-oxoglutarato (Gandhi *et al.*, 2001); así como menor abundancia del ARNm en músculo esquelético de la piruvato deshidrogenasa quinasa 4 (PDK4) y lactato deshidrogenasa quinasa (LDH; Sanders *et al.*, 2009).

De acuerdo con lo anterior Streffer (1988) ya había reportado que la relación lactato/piruvato y NADH/NAD⁺ se incrementa durante el EC, lo que indica que la entrada del piruvato al ciclo de los ácidos tricarboxílicos a través del complejo piruvato deshidrogenasa se altera en EC.

Además, Downs y Heckathorn, (1998), reportaron que el EC inactiva el complejo I de la cadena transportadora de electrones a nivel mitocondrial, lo cual produce una disociación en los componentes más pequeños, alterándose así la síntesis de ATP (Belhadj Slimen *et al.*, 2015).

El EC agudo incrementa la glicogenólisis y disminuye la gluconeogénesis (Miova *et al.*, 2013). Wheelock *et al.*, (2008) y O'Brien *et al.*, (2010) reportaron incrementos en la expresión hepática del gen de piruvato carboxilasa bajo condiciones de EC crónico; la piruvato carboxilasa es una enzima limitante que regula la velocidad en la que ingresa alanina y lactato en la gluconeogénesis.

La insulina es importante en la regulación del reparto de nutrientes en la post-absorción, ya que es un potente regulador del metabolismo de lípidos y carbohidratos (Belhadj-Slimen *et al.*, 2015).

En este contexto Tang *et al.*, (2013), reportaron una disminución en la concentración de insulina en pollos expuestos a EC crónico. Además, se han registrado incrementos en los niveles de insulina en roedores (Morera *et al.*, 2012), cerdos (Pearce *et al.*, 2011), pollos de engorda (Yuan *et al.*, 2008).

El incremento en el nivel de insulina en sangre durante el EC crónico, se relaciona con la disminución en la concentración de glucosa circulante, menor actividad lipolítica e incremento en la lipogénesis del tejido adiposo (Belhadj Slimen *et al.*, 2015). En consecuencia, el incremento en la sensibilidad a insulina podría ser un mecanismo de adaptación empleado para disminuir la producción de calor, de manera que la oxidación de la glucosa se vuelve más eficiente (Baldwin *et al.*, 1980).

En el presente trabajo se evaluó el efecto del EC en la histología e integridad del epitelio intestinal de los cerdos, por lo que se procederá a discutir acerca de la estructura y fisiología del intestino delgado, así como de las características y mecanismos de defensa del epitelio intestinal.

2.5 Intestino delgado

El intestino delgado es un órgano tubular que transporta el bolo alimenticio del estómago hacia el colon, y por tanto, este órgano es el principal responsable de la absorción de nutrientes. Las propiedades activas y pasivas de la pared o mucosa intestinal, son de vital importancia para cumplir las funciones del intestino delgado (Chen *et al.*, 2008).

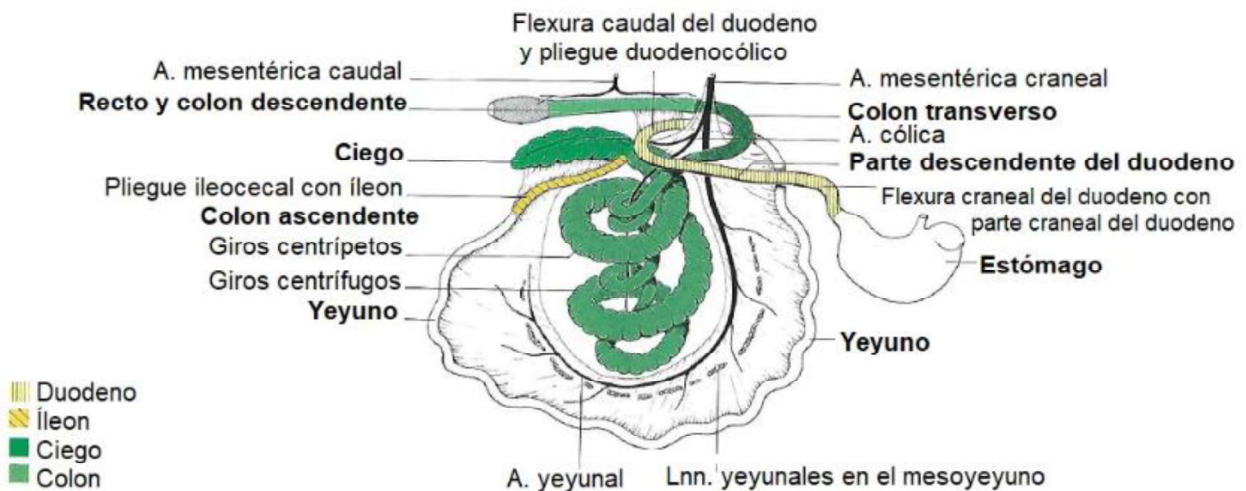


Figura 3. Representación esquemática del intestino del cerdo (König y Liebich., 2004)

2.5.1 Anatomía del intestino delgado en cerdos

El intestino delgado está conformado por tres porciones: duodeno, yeyuno e íleon. En cerdos adultos el intestino delgado tiene una longitud de 16 a 21 m, de los cuales el 4 al 5% corresponde al duodeno, del 88 al 91% al yeyuno y del 5-6% el íleon (Lewis y Southern., 2000).

2.5.2 Duodeno

El duodeno es el lugar donde la digesta del estómago se mezcla con las secreciones de intestino, hígado y páncreas. La bilis llega al intestino a través del conducto biliar que se

une al ducto pancreático principal (de Wirsung) y ambos desembocan en el duodeno a través de la ámpula hepatopancreática (de Vater), localizada a 15 cm del píloro del estómago (Lewis y Southern., 2000, Ross and Pawlina, 2011).

Se han descrito cuatro subdivisiones del duodeno:

- a) La primera porción, el bulbo duodenal, es el segmento anterior más proximal al estómago.
- b) La parte descendente o segunda, donde desembocan el conducto biliar común y los ductos pancreáticos mayor y menor.
- c) La porción horizontal o tercera.
- d) Porción ascendente o cuarta.

El duodeno termina en el ligamento de Treitz, donde gira hacia la cavidad peritoneal. El resto del intestino delgado es intraperitoneal, hasta que ingresa al colon en la válvula ileocecal (Carneiro y Junqueira, 2017).

Yeyuno e íleon están suspendidos por un mesenterio delgado en la cavidad abdominal que permite los movimientos del intestino delgado. No existe una demarcación distintiva entre yeyuno e íleon (Carneiro y Junqueiro, 2017).

2.5.3 Yeyuno

El yeyuno es largo, mide entre 14 y 19 metros de longitud y comprende un gran número de pequeñas asas (Lewis y Southern, 2000). Las asas yeyunales se encuentran unidas por un largo mesenterio y ocupan la parte caudoventral de la cavidad abdominal, y comparten este espacio con el colon ascendente. Como este último está situado a la izquierda del mesenterio, el yeyuno se localiza principalmente a la derecha, aunque algunas de sus asas pueden tener contacto con la pared izquierda del abdomen, craneal y caudalmente al colon ascendente (Climent *et al.*, 2005).

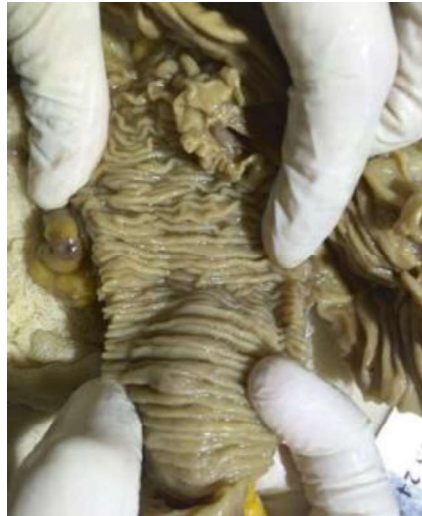


Figura 4. Histología del intestino delgado, Vista macroscópica del intestino delgado que muestra los pliegues circulares de la mucosa (Foto: Lamps, 2007).

El yeyuno ocupa la porción anterior izquierda del abdomen. El examen visual de la superficie luminal del intestino delgado revela pliegues de la mucosa, las plicas circulares (Fig.4), las cuales son más numerosas en yeyuno proximal.

La mucosa del yeyuno y del íleon está provista de nódulos linfáticos solitarios y numerosas placas de Peyer (nódulos linfáticos agrupados). Estas últimas se disponen a modo de bandas prominentes.

2.5.4. Íleon

El íleon puede ser diferenciado del yeyuno, por las capas musculares un poco más gruesas, así como por y la unión al intestino grueso. El íleon se localiza en la parte inferior derecha del abdomen y en la parte superior de la pelvis. Los pliegues circulares disminuyen en número en el intestino delgado distal y están ausentes en el íleon terminal (Carneiro y Junqueira, 2017). Aunque tienen características morfológicas distintivas, duodeno, yeyuno e íleon, comparten muchas características en común (Lewis y Southern, 2000).

El intestino delgado se continúa hacia el colon en la válvula ileocecal, conformada por dos bordes semilunares que sobresalen en el ciego. La válvula ileocecal proporciona una barrera al flujo retrógrado de contenido del colon al intestino delgado, y determina la angulación entre el íleon y el ciego, se mantiene por los ligamentos ileocecales superiores e inferiores.

La arteria mesentérica superior suministra sangre oxigenada al duodeno distal, a todo el yeyuno e íleon. Las venas siguen a la distribución arterial. La vena mesentérica superior se une a la vena esplénica para formar la vena porta.

El drenaje linfático del intestino circula paralelo a los respectivos suministros de sangre a los ganglios linfáticos de las regiones celiaca, pre-aórtica superior e inferior pre-aórtica. El drenaje linfático prosigue a la cisterna del quilo y luego a través del conducto torácico a la vena subclavia izquierda. La entrada neural simpática en el intestino delgado es transportada por el plexo celíaco y mesentérico superior, mientras que el suministro parasimpático se deriva de las ramas distales del nervio vago; estos dos siguen de cerca el flujo vía arterial a la pared del intestino (Carneiro y Junqueira, 2017).

2.6 Histología del intestino delgado

Las paredes del intestino delgado están formadas por cuatro capas, que del interior hacia el exterior son: mucosa, submucosa, muscular y serosa (Mowat y Viney, 1997).

2.6.1 Mucosa

La mucosa intestinal participa en los procesos de digestión-absorción de nutrientes y provee una barrera fisicoquímica, metabólica e inmunológica contra la entrada de compuestos xenobióticos, macromoléculas y microorganismos en el organismo (Soraci *et al.*, 2010).

La mucosa conforma el revestimiento interno del intestino delgado, y presenta una serie de pliegues o vellosidades intestinales que forman proyecciones de la mucosa, en dirección al lumen del intestino delgado, y entre ellas existen pequeñas aberturas de glándulas tubulares simples denominadas criptas (Junqueira y Carneiro, 2011).

Las vellosidades intestinales, además de contribuir para la defensa contra una infección, también tiene como función aumentar la superficie de absorción de los nutrientes previamente digeridos (Pluske *et al.*, 1997).

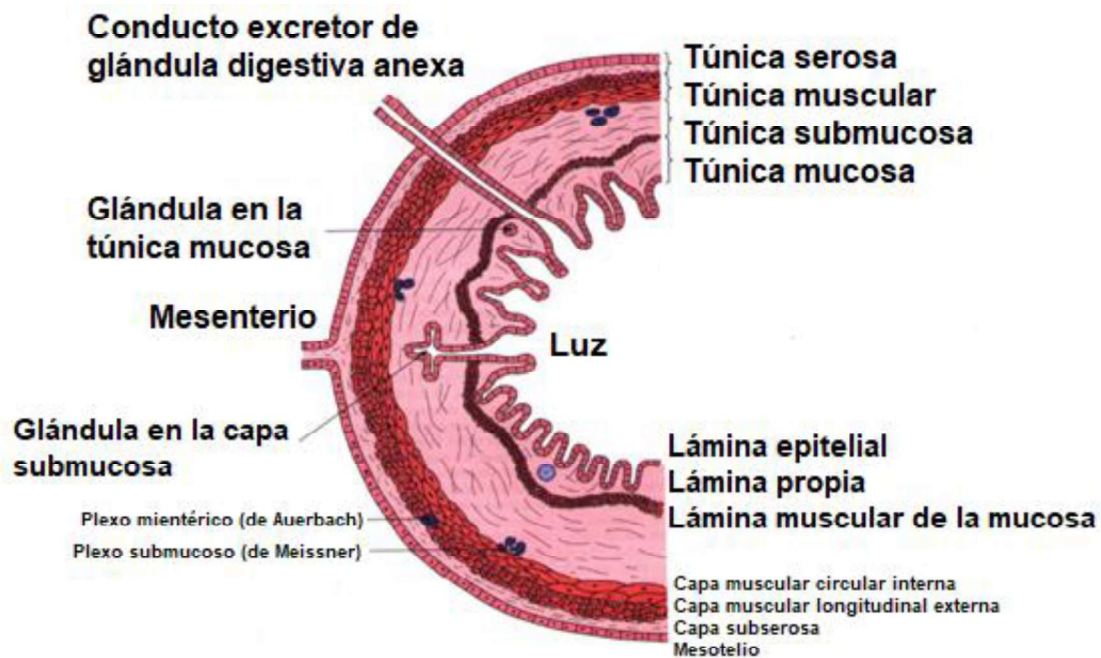


Figura. 5 Capas del tubo digestivo del interior al exterior: mucosa, submucosa, muscular y serosa o adventicia (Tomado de DiFiore, 2005).

Tanto las vellosidades como las criptas se encuentran recubiertas por una capa continua de células epiteliales (enterocitos), dispuestas en forma de monoestrato en combinación con células endocrinas, inmunes y células globulares productoras de mucus. La morfología epitelial cambia a lo largo del tracto gastrointestinal, pero básicamente consiste en una región de criptas (donde se encuentran las células madres y de Paneth, que participan en funciones de defensa) y una región apical (vellosidad) donde las células se encuentran en diferente grado de diferenciación y función (Soraci *et al.*, 2010).

Los enterocitos comienzan su diferenciación en las criptas intestinales y van migrando a lo largo de las vellosidades. Conforme migran, las células maduran y pasan de células relativamente indiferenciadas en las criptas a células altamente especializadas absortivas en las vellosidades. El largo de las vellosidades es determinado por la velocidad en la cual las células perdidas en el ápice son sustituidas por las células de las criptas (Herdt, 2014).

Cuando las células epiteliales alcanzan la madurez mueren y son liberadas al lumen intestinal. La velocidad de recambio de las células del epitelio intestinal del cerdo es muy rápida, y oscila entre 2 a 5 días (Soraci *et al.*, 2010).

2.6.2 Submucosa

La submucosa es una capa de tejido conectivo fibroso que contiene fibroblastos, mastocitos, vasos sanguíneos y linfáticos y un plexo de fibras nerviosas (plexo de Meissner) compuesto de fibras simpáticas no mielinizadas, posganglionares y células ganglionares parasimpáticas (DiFiore, 2005).

Dentro del duodeno inmediatamente distal al canal pilórico abundan las glándulas mucosas submucosas, denominadas glándulas de Brunner, las cuales se abren a las criptas intestinales y morfológicamente son parecidas a las glándulas pilóricas. Dichas glándulas secretan iones bicarbonato, glicoproteínas y pepsinogeno II (DiFiore, 2005).

2.6.3 Muscularis propia

La capa muscular o *muscularis propia*, principalmente responsable de la contractilidad, consiste en dos capas de músculo liso: una capa interna circular y una capa externa longitudinal dispuesta en un patrón helicoidal (DiFiore 2005).

2.6.4 Serosa

La serosa es la capa más externa; forma una cubierta del tejido conectivo constituida de una sola capa de células mesoteliales (DiFiore, 2005).

2.7 Barrera intestinal

En general, la función de la barrera intestinal es evitar que patógenos y moléculas pro-inflamatorias, como toxinas y otros antígenos entren a tejidos subepiteliales y de ahí a la circulación (Turner, 2009). Existen muchos factores que lesionan o alteran a la barrera intestinal en animales, por ejemplo, isquemia o sepsis (Dunlop y Malbert, 2007).

2.7.1 Anatomía de la barrera intestinal

Los elementos que conforman la barrera intestinal se clasifican en función de su naturaleza y localización anatómica en elementos extracelulares y celulares (Figura 5; Salvo-Romero *et al.*, 2015).

2.7.2 Elementos extracelulares

La luz intestinal es considerada la primera línea de defensa del tracto gastrointestinal, ya que en ésta se localizan los microorganismos y antígenos que son degradados inespecíficamente por acción del pH, secreciones gástricas, pancreáticas y biliares. A continuación se describen algunos de estos elementos.

- **Enzimas digestivas:** Proteasas, lipasas, amilasas y nucleasas, tienen acción tóxica sobre los microorganismos mediante la destrucción de la pared celular (Sarker y Gyr, 1992).
- **Microclima:** Capa de moco, agua y glicocálix de aproximadamente 100 micras de espesor, secretado principalmente por las células caliciformes con propiedades hidrófobas y tensoactivas, que previene la adhesión de bacterias entéricas al epitelio intestinal (Qin *et al.*, 2008).
- **Capa de moco agitada:** Capa que contiene secreciones mucosas ricas en péptidos antibacterianos y previene la adhesión a la mucosa y la invasión transepitelial posterior por parte de microorganismos (Bevins y Salzman, 2011, Antoni *et al.*, 2013).

- **Inmunoglobulina A secretora (IgAs):** sintetizada por células plasmáticas de lámina propia (Brandtzaeg, 1995).
- **Productos antimicrobianos:** secretados por las células de Paneth, como fosfolípidos, mucinas cargadas negativamente y péptidos con actividad frente a bacterias, levaduras, hongos, virus e incluso células tumorales, como los péptidos trébol, catelicidinas, ribonucleasas y defensinas (Bevins y Salzman, 2011).
- **Péptidos antimicrobianos:** Provocan lisis bacteriana, mediante la formación de poros en la membrana (Elphick y Mahida, 2005, Lence *et al.*, 1997).

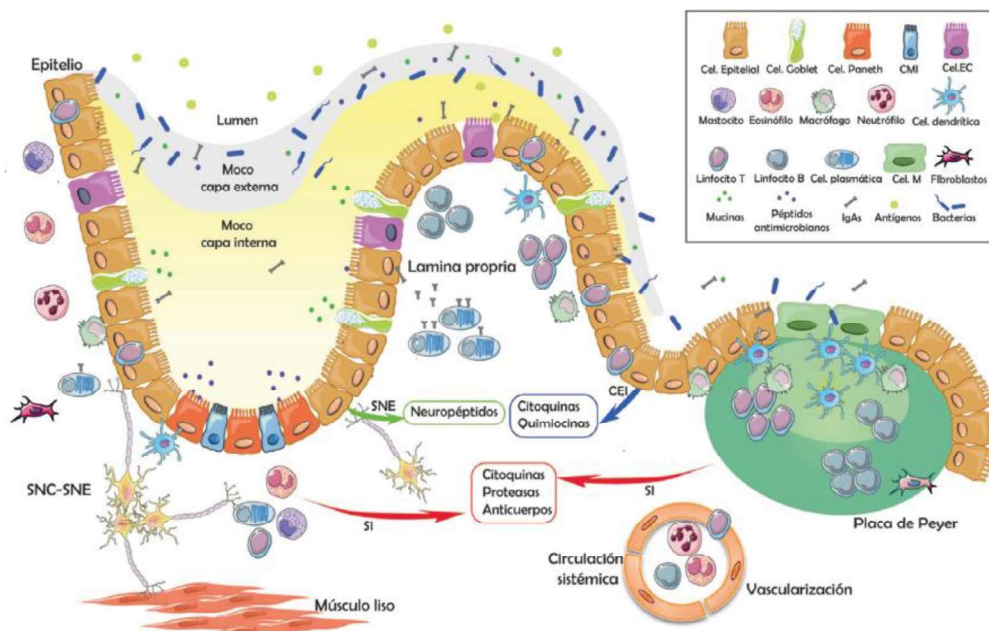


Figura 6. Componentes celulares y moleculares de la barrera intestinal (Salvo-Romero *et al.*, 2015).

- **Defensinas:** Modulan la composición de la microbiota y la conformación de la respuesta inmunitaria adaptativa (Salzman *et al.*, 2010).

- **Glicocálix:** Facilita la absorción de nutrientes, mantiene la hidratación epitelial y protege el revestimiento epitelial de las fuerzas de cizallamiento lumbinales y de las enzimas digestivas (Ugolev y De Laey, 1973).
- **Secreción de cloro y agua a la luz intestinal:** llevada a cabo por los enterocitos, impide la colonización bacteriana y ralentiza la translocación de antígenos a la lámina propia, ejerciendo un efecto de dilución sobre el contenido intestinal (Chang y Rao, 1994).
- **Peristaltismo:** ejercido por las capas musculares del intestino, evacúa el contenido luminal, disminuyendo su permanencia, y por lo tanto, el de las posibles sustancias tóxicas/patógenas presentes en la luz del intestino (Salvo-Romero *et al.*, 2015).

2.7.3 Elementos celulares

Los elementos celulares actúan de forma específica o inespecífica, a continuación se describen los principales elementos.

- **Flora intestinal:** Componente esencial de la barrera intestinal que influye en el metabolismo, proliferación y mantenimiento de la barrera epitelial (Neish, 2008). Limita la colonización por parte de agentes patógenos compitiendo por nutrientes y por el nicho ecológico, modificando el pH y produciendo sustancias antimicrobianas las cuales permiten la comunicación entre especies y la optimización de la cantidad de microorganismos benéficos (Neish, 2008), adquisición de nutrientes y regulación de energía (Palmer *et al.*, 2007), e influye en respuesta inflamatoria, reparación epitelial y la angiogénesis (Tappenden y Deutsch, 2007).
- **Epitelio intestinal:** Monocapa de células epiteliales especializadas y polarizadas que se renueva cada 3 a 5 días (Soraci *et al.* 2010).

- **Células madre epiteliales pluripotentes** residen en la base de las criptas (criptas de Lieberkuhn) y generan células que migran hacia la punta de la vellosidad donde se lleva a cabo la diferenciación final (Booth y Potten, 2000). La mayoría de las células que forman la monocapa (alrededor del 80%) son enterocitos.
- La diversidad de funciones que el epitelio intestinal lleva a cabo se pone de manifiesto por la presencia de otros tipos celulares especializadas en la secreción de moco (células caliciformes), de defensinas (células de Paneth), de hormonas y neuropéptidos (células enterocromafines) y hormonas y neuropéptidos (células enterocromafines) y células especializadas en la captación de antígenos de la luz intestinal, situados en la superficie de agregados linfoides (células M; Van Der Flier y Clevers, 2009).
- **Enterocitos:** Elementos clave en el revestimiento epitelial, adaptados para desarrollar la función digestiva y el mantenimiento de la integridad física de la barrera. También intervienen en el desarrollo de la actividad inmunológica ya que expresan receptores implicados en la respuesta inmune innata (Pott y Hornef, 2012).

En la región subepitelial se encuentra lámina propia, que alberga células del sistema inmunitario, sistema nervioso entérico y tejido conectivo.

- **Células inmunitarias del tracto gastrointestinal** conforman el denominado tejido linfóide asociado a intestino (gut-associated lymphoid tissue, GALT), que se divide en dos compartimentos: GALT organizado, inductor de la respuesta inmunitaria y GALT difuso, efector de la respuesta inmunitaria (Cerruti y Rescigno, 2008).
- **GALT organizado:** Compuesto de estructuras linfoides, principalmente folículos, placas de Peyer y ganglios mesentéricos (Cerruti y Rescigno, 2008). El epitelio que cubre las placas de Peyer contiene células M, las cuales desempeñan funciones en la monitorización de la luz intestinal y el mantenimiento de la función de la barrera intestinal. Debido a sus características únicas en la formación de

micropliegues o la reducida capa de moco, facilitan la captura de antígenos y microorganismos lumbinales y su presentación a la células inmunitarias subyacente (Corr *et al.*, 2008, Miller *et al.*, 2007).

- **GALT difuso:** Formado por dos poblaciones de leucocitos distribuidos a ambos lados de la membrana basal. Los linfocitos intraepiteliales, mayormente células T CD8+, se localizan entre las células epiteliales, por encima de la membrana basal, cuya función es supervisar y responder frente a bacterias y antígenos lumbinales (Gill *et al.*, 2011).
- **Linfocitos de lámina propia** residen junto a otros tipos leucocitos, tales como eosinófilos, células dendríticas, mastocitos y macrófagos, principalmente. Estos linfocitos constituyen una población heterogénea, siendo aproximadamente el 50 % células plasmáticas y el 30% linfocitos T, que a su vez se pueden subdividir en distintos tipos según el patrón de citoquinas secretado (Gill *et al.*, 2011).
- **Tejido conectivo** es el tejido adyacente al epitelio, en el que residen células inmunitarias, neuronas, vasos sanguíneos y fibroblastos. Los fibroblastos mantienen la matriz extracelular, principalmente mediante la secreción de colágeno y metaloproteinasas, y tienen un papel fundamental en la proliferación del epitelio intestinal, gracias a la producción del factor de crecimiento de hepatocitos (Göke *et al.*, 1998), contribuyendo activamente al mantenimiento de la función barrera intestinal.
- **Sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso entérico (SNE)**, coordinan las funciones digestivas y el mantenimiento de la homeostasis intestinal directamente a través de la liberación de neurotransmisores e, indirectamente, a través de la interacción neuro-inmunológica (Salvo-Romero *et al.*, 2010; Furness, 2000).

El SNE organizado en una red interconectada de neuronas y células gliales que se agrupan en los ganglios situados en el plexo mesentérico (de Auerbach) y el

plexo submucoso (de Meissner). El SNE está en estrecho contacto con las células epiteliales intestinales y las células neuroendocrinas, modula la respuesta inflamatoria y colabora con el sistema inmunológico en la respuesta a patógenos. El SNE se compone de neuronas sensoriales, interneuronas y neuronas motoras, que controlan el peristaltismo, los cambios locales en el flujo de sangre y la secreción de agua y electrolitos (Furness, 2000).

La participación del SNE en la función barrera es fundamental gracias al control de la actividad motora y secretora, así como en la microcirculación y la actividad inmunológica, lo que le permite participar en el control de la homeostasis intestinal. Dicha comunicación es posible mediante mediadores químicos, tales como neuropeptidos, neurohormonas, neurotransmisores, citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y otras moléculas reguladoras (Flemström y Sjöblom, 2005).

2.8 Componentes transmembranales de las uniones estrechas

Las uniones estrechas son uniones intercelulares, cuya función es el mantenimiento de la barrera y polaridad epitelial. Ellas limitan la traslocación de microorganismos y sus toxinas desde la región apical hacia la región basolateral de las membranas que limitan (Balda y Matter, 2008; Schulzke y Fromm, 2009).

Las uniones estrechas están constituidas por complejos multiproteicos de cuatro familias de proteínas transmembrana: ocludina, claudinas, moléculas de adhesión (*junctional adhesion molecules*, JAM) y tricelulina (Figura 7).

Las uniones estrechas tienen dos funciones mutuamente excluyentes: función de barrera, que previene la mezcla de proteínas de membrana entre la membrana apical y basolateral, así como una función de puerta que controla el paso paracelular de iones y solutos entre las células (Hartsock y Nelson, 2008). Dichas uniones contienen dos tipos de proteínas transmembranales: ocludinas y claudinas, que le confieren estas funciones, y proteínas citoplasmáticas asociadas que pueden unir uniones estrechas con el citoesqueleto de actina y las uniones adherentes (Hartsock y Nelson, 2008).

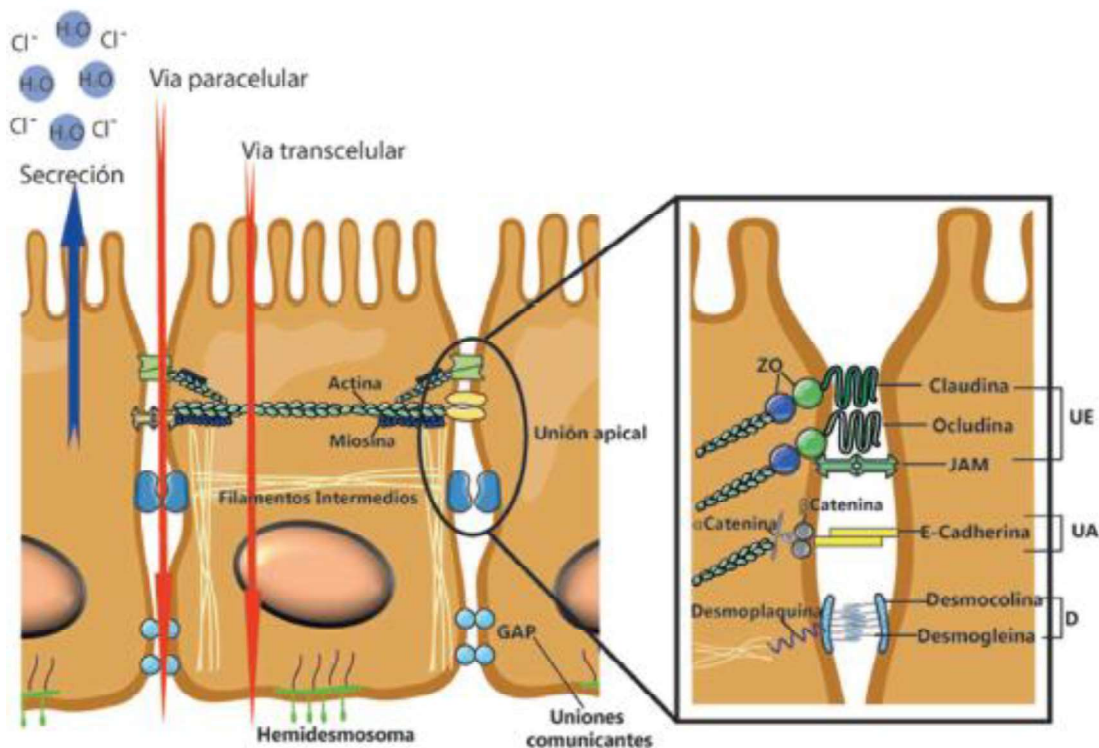


Figura 7. Representación de las uniones intercelulares (Salvo Romero *et al.*, 2015).

2.8.1 Ocludina: Las ocludinas son proteínas transmembrana de aproximadamente 65kD, formadas por 4 dominios transmembrana.

Estructura:

- Estructura 3D de la región C-terminal de la ocludina y complejo de ZO-1 PDZ3-SH3-U5-GuK/dominio CC ocludina (Tasch *et al.*, 2012).
- Dominios marvel que regulan la oligomerización *cis* vía residuos de cisteína, media la inserción dentro de membrana (Yaffe *et al.*, 2012).
- ECL2: sensible a redox, con función en la homo-oligomerización, puente disulfuro intraloop (Bellman *et al.*, 2014)
- Dominio CC de C-terminal interactúa con ZO-1 (Muller *et al.*, 2005),
- Ubiquitinación por ubiquitin ligasas E3: Nedd4-2 (Raikwar *et al.*, 2010)

- Vida media: aproximadamente 6.2 h (Ramírez *et al.*, 2013); fragmentado por MMPs

Estas pueden formar una barrera paracelular mediante la polimerización lateral en la membrana para crear una línea continua de adhesión entre células (Furuse *et al.*, 1993).

La localización de la ocludina en las uniones estrechas se encuentra regulada por la fosforilación de células epiteliales como endoteliales (Sakakibara *et al.*, 1997). La ocludina no fosforilada se localiza tanto en la membrana basolateral como en vesículas citoplásmicas, mientras que la ocludina fosforilada se localiza en las uniones estrechas (Sakakibara *et al.*, 1997).

Aspectos funcionales:

- La ocludina es un elemento regulador de las uniones estrechas, por lo cual tiene estrechas regulaciones y la fosforilación es probablemente la más importante de las modificaciones postraduccionales que contribuye a su función (Haseloff *et al.*, 2015).
- Es requerida por las células para transducir las señales de las citocinas como TNF- α e IFN- γ (Van Itallie *et al.*, 2010).
- El extremo carboxilo terminal del dominio espiral de la bobina ha mostrado ser elemento fundamental de señalización inducida por TNF- α (Buschmann *et al.*, 2013).
- Actúa como sensor de óxido-reducción en las uniones estrechas (Bellmann *et al.*, 2014)

2.8.2 Claudinas:

Las proteínas pertenecientes a la familia de las claudinas son los componentes principales de las uniones estrechas. La familia de las claudinas consiste en al menos 24 miembros que van desde 20-27 kDa (Schneeberger *et al.*, 2004, Van Itallie y Anderson, 2006).

Estructura:

Interacción cis-/trans- homo-/heterofílica con Claudinas/Proteínas Marvel asociadas a uniones estrechas (Cording *et al.*, 2011, Piontek *et al.*, 2011).

- Fosforilación: PKC, PKA, PKC atípico; por lo tanto, la entrada a las uniones estrechas, incrementa la barrera; proteína fosfatasa PP2A es eliminada de las uniones estrechas, desfosforilación por lo cual disminuye la barrera (Numbhakdi-Craig *et al.*, 2002), mientras que cAMP aumenta la fosforilación y disminuye la expresión (Ishizaki *et al.*, 2003).

Funciones:

- Estrechez paracelular (Milatz *et al.*, 2010).
- Señalización Wnt/ β -catenina propicia incrementos de claudina 3 y por lo tanto maduración de la barrera, aumenta las uniones estrechas, aumenta la barrera (Hashimoto *et al.*, 2008).
- Claudina 2 regula la permeabilidad solamente de cationes pequeños como Na⁺ y K⁺, pero no para aniones y moléculas mayores que 1800 Da, se piensa que forma canales selectivos de cationes en las uniones estrechas (Amasheh *et al.*, 2002).

2.8.3 Zonoccludinas (ZO)

ZO-1, ZO-2 y ZO-3 son miembros de la familia MAGUK (homólogos de la guanilato quinasa asociado a membranas)

Estructura:

- Con dominios de unión adherentes y proteínas de unión estrecha además del citoesqueleto de actina. La familia MAGUK se caracteriza por su dominio PDZ, dominio SH3 y dominio homólogo de guanilato quinasa (Funke *et al.*, 2005).

Funciones:

- Proteínas de andamiaje, estudios de unión *in vitro* han demostrado que ZO-1 (Fanning *et al.*, 1998, Furuse *et al.*, 1994) y ZO-2 (Ithon *et al.*, 1999) interactúan con la ocludina y una segunda unión específica de MAGUK, ZO-2 y F-actina.
- Se ha propuesto que ZO-1, es una proteína de andamiaje entre proteínas transmembrana y citoplasmáticas y probablemente forme un vínculo entre uniones estrechas y adherentes (Fanning *et al.*, 1998)
- Interactúan directamente con canales iónicos, receptores transmembrana y proteínas de transducción de señales citosólicas conocidas.

2.9 Daños y respuesta al daño intestinal

Como se explicó anteriormente, la barrera intestinal se encuentra formada por enterocitos, uniones estrechas en el epitelio intestinal, moco y macrófagos que restringen el paso de sustancias no deseadas (antígenos, bilis, enzimas hidrolíticas y endotoxinas) al ambiente interno. Por lo anterior, la pérdida de la integridad de la barrera intestinal provocará un incremento de la permeabilidad intestinal, lo que puede provocar daño local y reacciones inflamatorias sistémicas (Lambert, 2009).

Diversos estresores pueden alterar a la barrera intestinal, entre ellos se encuentra estrés psicológico (Soderholm y Perdue, 2001), ejercicio extenuante prolongado (Pals *et al.*, 1997; Lambert *et al.*, 1999), antiinflamatorios no esteroideos (Bjarnason *et al.*, 1986) y EC (Lambert *et al.*, 2002, Prosser *et al.*, 2004).

2.10 Efecto del estrés por calor en la integridad de epitelio intestinal

El tracto gastrointestinal es altamente sensible a los cambios de temperatura, ya que bajo estas condiciones los animales expuestos a EC redistribuyen su flujo sanguíneo hacia la periferia con la finalidad de disipar el calor, provocando una reducción en el flujo de sangre y nutrientes en órganos internos como el intestino; viéndose comprometida la integridad de la barrera intestinal (Pearce *et al.*, 2014).

Sengupta y Sharma, (1993) sometieron a ratas en crecimiento a condiciones de temperatura ambiental alta (37 ± 1 °C), y observaron que en las dimensiones morfométricas del intestino delgado, había una reducción significativa en el peso seco, altura de vellosidades, superficie de vellosidades y profundidad de la cripta, mientras que estudios de absorción muestran una disminución en la absorción por unidad de peso seco, longitud y área superficial de vellosidades del intestino delgado, comparados con el control.

En concordancia con trabajos anteriores, Liu *et al.* (2009) reportaron que en minicerdos sometidos a EC inducido, se observaron daños en la mucosa del intestino delgado, el cual es el responsable directo de la absorción de nutrientes. A consecuencia de este daño se observó una menor respuesta al factor de crecimiento epitelial. Dichos autores mencionan que los cambios observados podrían asociarse también a una reducción en la capacidad de los cerdos por absorber nutrientes y reflejarse en un menor desempeño productivo.

Como se ha mencionado, el epitelio intestinal regula la absorción de nutrientes y agua, a su vez que restringe la entrada de bacterias del lumen intestinal hacia torrente sanguíneo (Su *et al.*, 2011). En consecuencia, es importante para el organismo mantener la integridad del epitelio intestinal mediante uniones estrechas, uniones adherentes, desmosomas y uniones gap (Jung *et al.*, 2015).

2.11 Efecto del estrés por calor en la morfología de las vellosidades intestinales

El intestino delgado es un órgano tubular que transporta el bolo alimenticio del estómago al colon y es el principal sitio en donde se lleva a cabo la absorción de nutrientes (Chen *et al.*, 2008). Para que el proceso de absorción se realice de forma óptima, es necesario que el intestino, y específicamente las vellosidades intestinales, esté libres de factores estresantes que retrasen o dificulten su función (Duo *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2002a).

La mucosa del intestino delgado se constituye de dos estructuras fundamentales: vellosidades (proyecciones dentro del lumen) y criptas. La homeostasis de las

vellosidades intestinales y las criptas se realiza mediante el mantenimiento de las fuerzas de expansión derivadas de la presión capilar e intersticial así como por las fuerzas de contracción producidas por las células intersticiales y matrices extracelulares (Hosoyamada y Sakai, 2005).

Algunas de las alteraciones observadas en la morfología de la mucosa intestinal son la pérdida de integridad de las vellosidades, el acortamiento y cambio de forma de las vellosidades intestinales (forma de dedos a forma de lengua, Figura 8), hiperplasia de células en criptas e incremento de células mitóticas (Nabuurrs *et al.*, 1993; van Beers-Schreurs, 1998). En consecuencia, a lo anterior podrían registrarse diarreas y bajo rendimiento en cerdos recién destetados (Pluske, 2001).

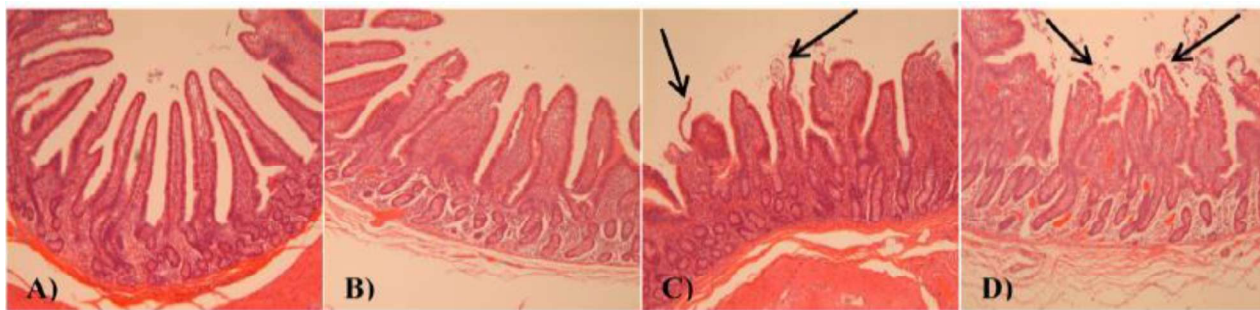


Figura 8. Cambios en la morfología del íleon en cerdos expuestos a EC (Pearce *et al.*, 2014).

El daño a las vellosidades puede ser más severo y observarse desprendimiento epitelial y necrosis, esta condición puede incrementar la permeabilidad intestinal (Lambert *et al.*, 2002) y afectar la digestión y absorción de nutrientes (Liu *et al.*, 2009).

Aunque muchos de los efectos negativos del EC en cerdos se explican por la disminución en el consumo de alimento (Pearce *et al.*, 2013a), también se ha reportado que éstos se relacionan con cambios en la morfología intestinal (Pearce *et al.*, 2014).

En la Figura 8, se muestran los cambios morfológicos del íleon a través del tiempo de exposición aguda al calor. En la fotografía A se observa el epitelio intestinal normal; en la fotografía B se presenta el epitelio después de 2 h de exposición a EC; se puede observar

una disminución en la altura de las vellosidades y mayor profundidad en las criptas. En las fotografías C y D las flechas indican los sitios de autólisis en el epitelio después de 4 y 6 h de exposición al EC (Pearce *et al.*, 2014).

2.12 Permeabilidad intestinal

El término permeabilidad intestinal se refiere al fenómeno en donde la pared intestinal actúa como barrera selectiva, permitiendo el paso de nutrientes y restringiendo el de sustancias potencialmente dañinas. Esto se logra manteniendo cerradas las uniones estrechas, lo que impide el acceso descontrolado de sustancias, toxinas, químicos, microorganismos y macromoléculas, que de lo contrario pasarían a torrente sanguíneo (Fasano, 2011).

Se han descrito dos rutas básicas de transporte de moléculas: 1.- la vía transcelular, permite el paso de moléculas a través de la membrana de las células epiteliales en la región luminal hacia la región basolateral; esta vía comprende los transportes pasivo y pasivo facilitado que no dependen de gasto energético; así como el transporte activo dependiente de hidrólisis de ATP. 2.- la vía paracelular incluye la difusión selectiva de moléculas a través de los espacios intercelulares, cuya eficiencia depende del poro formado por complejos de proteínas de uniones estrechas, también llamadas “*tight junctions*” (Chiba *et al.*, 2008).

La permeabilidad intestinal puede ser afectada por elementos externos e internos. Por ejemplo, factores alimenticios como glutamina, polifenoles y probióticos (Suzuki *et al.*, 2013); así como el alcohol y sus metabolitos, acetaldehído, pueden dañar la barrera intestinal, y este daño puede inducir patogénesis al incrementar la translocación paracelular de antígenos microbianos a través de la barrera intestinal (Punder y Pruijboom, 2015). Cuando esos elementos alcanzan la circulación portal son transportados al hígado y se distribuyen en los espacios sinusoidales, en donde estas moléculas pueden activar una serie de cascadas de señalización, inducir respuestas proinflamatorias y profibrogénicas. Dichos efectos suceden después de su interacción

con los receptores tipo Toll (*Toll-like receptors*, TLR) presentes en las células mesenquimales del hígado como las células de Kupffer. En respuesta, dichas células sintetizan y liberan mediadores proinflamatorios como IL-1 β y TNF α , así como profibrinogénicos (Tizard, 2018).

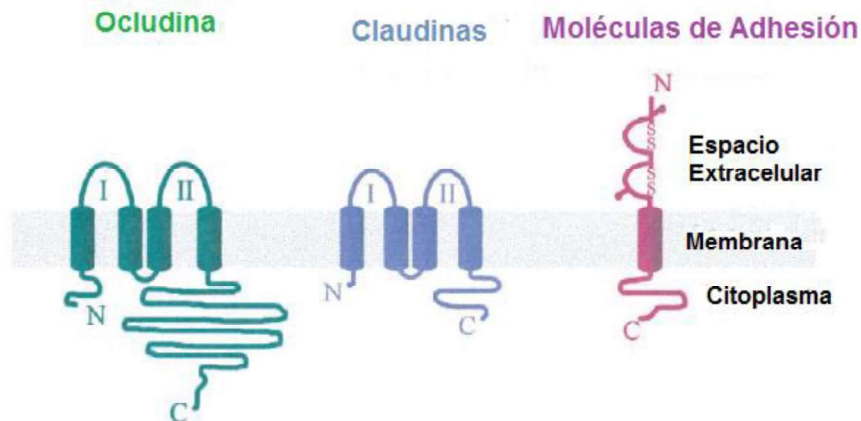


Figura 9. Proteínas transmembrana de unión estrecha (Fanning *et al.*, 1999).

Las uniones estrechas representan la mayor barrera de vía paracelular de tejidos epiteliales dependientes del número y complejidad de cadenas proteicas transmembrana dentro de las uniones estrechas (Fanning *et al.*, 1999). Como se describió anteriormente, entre las proteínas que conforman las uniones estrechas en epitelio intestinal se encuentran las claudinas, las moléculas adhesivas de unión (JAM: junctional adhesión molecules), ocludinas, cingulina y zonoccludinas.

2.13 Sistema inmune

La principal función del sistema inmune es protección o tolerar al organismo contra infecciones y neoplasias que pudieran sufrir algunas células. En este sistema participan varios elementos entre los que se puede mencionar órganos linfoides, células de

respuesta inmune, efectores inmunológicos (anticuerpos), y mediadores químicos como citocinas e interleucinas (Tizard, 2018).

En general los mecanismos de respuesta inmune se dividen en dos tipos: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa (Figura 10). La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa del organismo y describe aquellos elementos del sistema inmune que están ya presentes antes de que una infección se produzca por primera vez (Dunlop *et al.*, 2007). Esta forma de respuesta involucra la producción de péptidos microbianos, proteínas de fase aguda, citocinas proinflamatorias tales como IL1, IL-6, TNF- α , IFN- γ entre otras, por células en los sitios infectados y/o afectados (Suradhat, 2005), lo que provoca la activación de mecanismos de defensa y de células fagocitarias (células dendríticas, macrófagos, neutrófilos) en tejido cercano al sitio donde ocurre la agresión (Suradhat, 2005).

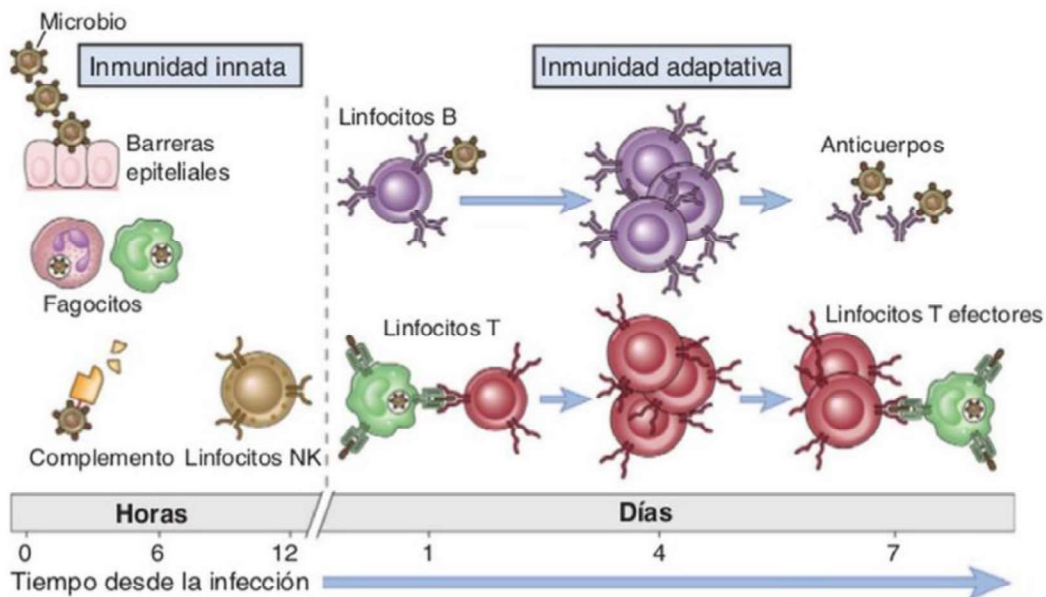


Figura 10. Red de colaboración entre la inmunidad innata y la adaptativa (tomado de Abbas *et al.*, 2008).

Los componentes de la inmunidad innata funcionan en todo momento, incluso antes de la infección al impedir el ingreso de microorganismos a través de la flora normal (Henderson y Wilson 1998), formando barreras en piel, mucosa de los tractos gastrointestinal, genitourinario, respiratorio y ocular (Dunlop *et al.*, 2007).

La inmunidad adaptativa se llama así debido a que los elementos que permiten una respuesta específica actúan después de que comience o cuando se repite una infección (Dunlop *et al.*, 2007). Los principales componentes de este tipo de inmunidad son los linfocitos T (CD4+, CD8+), linfocitos B y sus productos de secreción, como las citocinas y los anticuerpos (Abbas *et al.*, 2008).

El sistema inmune genera una diversidad de anticuerpos y receptores de linfocitos T dentro del huésped, así como la activación de linfocitos específicos en los tejidos linfoides secundarios, por lo que esta respuesta dependiente de antígeno, se denomina inmunidad adaptativa (Suradhat, 2005; Abbas *et al.*, 2008).

Los antígenos unidos a células presentadoras de antígeno en el contexto de MHC I y MHC II son dirigidos a tejidos linfoides, en donde se seleccionan los linfocitos específicos al antígeno, para expandir y diferenciar cualquier población efectora de linfocitos que proliferan e inician la inmunidad humoral, mediada por células en la fase de activación. En estos tejidos las poblaciones de memoria facilitan el reclutamiento de los mecanismos de defensa inmunológica en el caso de una exposición subsecuente a un antígeno específico (Suradhat, 2005).

2.13.1 Estrés por calor y sistema inmune

El sistema inmune está formado por una red de tejidos, células, y moléculas citocinas que trabajan para proteger al organismo de las amenazas internas y externas. Con la finalidad de aumentar su supervivencia, los animales han desarrollado una red que involucra al sistema inmune, nervioso central y endócrino, colectivamente llamado supersistema. El cerebro percibe estresores, emite alertas y capacita al organismo para las posibles consecuencias. La activación del sistema de estrés, mejora los reflejos de la función cognitiva, incrementa la tolerancia al dolor, disminuye el apetito e inhibe la inflamación

mediada por el sistema inmune. Estos cambios se completan mediante la liberación de neurotransmisores y hormonas como respuesta al estrés (Dhabhar, 2003).

Los productos del sistema inmune afectan las vías que regulan el metabolismo, la degradación de nutrientes, el comportamiento, la termorregulación y la actividad del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA). Las citocinas proinflamatorias producidas durante la respuesta de la fase aguda modifican la actividad metabólica en el hígado, resultando la producción de varias proteínas de fase aguda, haptoglobina, proteína C reactiva y proteínas complementarias (Colditz, 2002).

Las respuestas en el comportamiento inducidas por citocinas disminuyen la disponibilidad de nutrientes, deprimiendo el apetito (Dantzer, 2008). Al presentarse estrés se desvían los nutrientes del crecimiento hacia el anabolismo hepático y a los mecanismos de defensa (Colditz, 2002).

3. HIPÓTESIS

El estrés por calor agudo afecta negativamente los parámetros productivos; modifica los parámetros medidos en el hemograma y química sanguínea; provoca daño a la morfología del epitelio intestinal y cambios en la expresión de proteínas de unión estrecha en cerdos en crecimiento. Dichos parámetros podrán recuperarse parcialmente tras la adaptación de los cerdos después de una semana de exposición al estrés por calor.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Determinar los efectos negativos de estrés por calor agudo y crónico, así como la posible adaptación a las condiciones ambientales de cerdos en crecimiento sobre sus parámetros productivos, hemograma, química sanguínea e integridad del epitelio intestinal de cerdos en crecimiento.

4.2 Objetivos particulares:

Determinar los efectos de la exposición a EC agudo y crónico en cerdos en crecimiento sobre:

- Parámetros productivos
- Componentes hematológicos y química sanguínea (hemograma)
- Parámetros histológicos del intestino delgado
- Detección de mucina
- Detección de células apoptóticas en epitelio intestinal
- Expresión de proteínas de unión estrecha Claudina 2, Zonoccludina 1 y Ocludina-1 en duodeno, yeyuno e íleon.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Procedimiento experimental y manejo de los animales

El experimento se llevó a cabo en el verano de 2016, en la Unidad de Fisiología y Metabolismo de cerdos, del Instituto de Ciencias Agrícolas, en la Universidad Autónoma de Baja California (UABC) en Mexicali, BC. Los cerdos empleados en este trabajo fueron cuidados de acuerdo con las directrices establecidas en la Norma Oficial Mexicana de Cuidado Animal (NOM-062-ZOO-1999; Ochoa, 2001).

Se emplearon 18 cerdos de cruce terminal (Landrace x Yorkshire x Duroc) de 36 (\pm 3.5) kg de peso, ubicados en una sala equipada con aire acondicionado para mantener las condiciones de termoneutralidad. Los cerdos fueron alojados en corrales individuales de 1.2 x 1.2 m, equipados con comedero de acero inoxidable y bebedero de chupón. La alimentación de los animales fue *ad libitum* y consistió en una dieta elaborada con trigo y pasta de soya adicionada con lisina, treonina y metionina, formulada para cubrir los requerimientos de energía y proteína de los cerdos de este peso de acuerdo con lo indicado en el NRC (2012; Cuadro 1). El consumo de agua también fue *ad libitum*.

El experimento tuvo una duración de 23 días. Durante los primeros 16 días el aire acondicionado de la sala se mantuvo encendido y programado para mantener la temperatura a 24 ± 2 °C. En el día 17 se apagó el aire acondicionado y se mantuvo apagado durante los siguientes siete días. En esta condición los cerdos estuvieron sujetos a las fluctuaciones naturales de temperatura en el valle de Mexicali. Este diseño permitió evaluar el comportamiento de los cerdos en condiciones de confort, estrés agudo y estrés crónico. Para ello, seis cerdos fueron sacrificados previa insensibilización con descarga eléctrica el día 16 (confort); otros seis cerdos fueron sacrificados en el día 18 (EC agudo); y los últimos seis cerdos se sacrificaron el día 23 (EC crónico).

Inmediatamente después del sacrificio se tomaron dos muestras sanguíneas. Para el análisis de hemograma se colectaron aprox. 6 ml de sangre en tubos vacutainer con EDTA (BD Vacutainer, K2E/K2 EDTA; REF 368171; Franklin Lakes, NJ. USA). Y para el análisis de química sanguínea se colectaron otros 6 ml de sangre en tubos sin anticoagulante (BD Vacutainer Suero; REF 368175). El suero fue recuperado después

de su centrifugación a 1300 x g por 10 min a 4°C (Eppendorf 5810, Hamburgo, Alemania). Las muestras de sangre completa y suero fueron analizadas en un laboratorio de análisis clínicos veterinarios (VetLab, responsable MVZ Myrna Romano Osuna, Mexicali, B.C.; registro SAGARPA #353).

Cuadro 1. Dieta experimental ofrecida a los cerdos en crecimiento alojados en condiciones de confort y estrés por calor.

Ingrediente	%
Trigo	82.83
Harina de Soya	13.80
L-Lisina HCl	0.5
L-Treonina	0.15
DL-Metionina	0.07
L-Valina	0.02
Carbonato de calcio	1.28
Ortofosfato	0.70
Sal yodada	0.35
Premezcla de Vitaminas y Minerales	0.30
Total	100.00

Inmediatamente después de sacrificio, los cerdos fueron sometidos a la inspección rutinaria postmortem. Las vísceras intestinales fueron diseccionadas y abiertas con la ayuda de unas tijeras Mayo (marca Hospital, Colombia). Con la ayuda de un portaobjetos de vidrio se colectaron muestras de aprox. 0.5 g de raspado de mucosa intestinal del duodeno, yeyuno e íleon. Estas muestras fueron colocadas en microtubos Eppendorf de 2ml, previamente identificados, inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C hasta su utilización para extracción de ARN y análisis de expresión genética.

Además, se colectaron secciones de aproximadamente 5 cm de duodeno, yeyuno e íleon, mismas que se conservaron en formol bufferado al 10% en PBS. Estas muestras se

emplearon para analizar las características microscópicas del epitelio intestinal mediante las técnicas histológicas rutinarias y tinción con hematoxilina-eosina (HE) y PAS-Azul de Alcían (Wrzosek *et al.*, 2013).

Se registró el consumo de alimento y peso de los cerdos en el período de confort durante el primer día del EC, agudo y al final de la semana, para estimar el consumo en EC crónico. La temperatura ambiental y humedad relativa también fueron registradas diariamente durante todo el período experimental a intervalos de 15 minutos empleando un higrotermógrafo (Thermotracker Higro, iButtonLink, WI, USA). Estas mediciones se emplearon para calcular el índice de calor de acuerdo con la ecuación de Steadman (1979) modificada por Rothfusz (1990).

Las variables analizadas fueron:

- Temperatura y humedad ambiental e índice de calor
- Comportamiento productivo: ganancia diaria de peso, consumo de alimento y relación consumo: ganancia
- Hemograma y química sanguínea
- Morfología de intestino delgado: altura de vellosidades, profundidad de las criptas, relación altura de vellosidad: profundidad de las criptas
- Contenido de mucina en duodeno, yeyuno e íleon
- Conteo de células apoptóticas en epitelio intestinal
- Expresión de Proteínas de Unión Estrecha, Claudina 2, Zonoccludina 1 y Ocludina-1 en duodeno, yeyuno e íleon

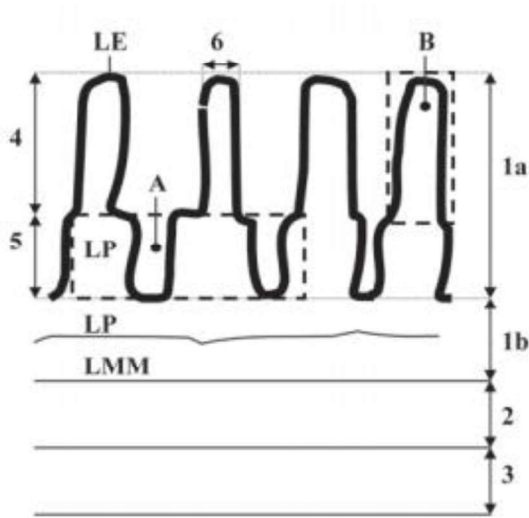
5.2 Histología intestinal

La morfología intestinal fue analizada empleando el método descrito por Moeser *et al.*, (2012). Cortes macroscópicos de las muestras de duodeno, yeyuno e íleon conservadas en formol bufferado al 10% en PBS, fueron incluidos en parafina, seccionados a 3 μm de espesor y teñidos con HE (Driscoll y Ryan, 1978). En cada portaobjetos se montaron dos cortes transversales. A estos cortes se les determinan el promedio de la altura y ancho

de las vellosidades intestinales, así como la profundidad y ancho de las criptas adyacentes.

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

Las imágenes de cada sección fueron tomadas para realizar las mediciones. Se utilizó el Software Image J2 (Curtis *et al.*, 2017), el cual permite conocer la medida de un área histológica que se encuentra en pixeles a unidades de longitud (micrómetros, en este caso).



1. Túnica Mucosa:
 - 1a. Capa glandular: Lamina epitelial+ Lámina Propia
 - 1b. Capa Subglandular: Lámina propia + Lámina muscular mucosa
2. Túnica Submucosa
3. Túnica muscular
4. Altura de vellosidad
5. Profundidad de criptas
6. Ancho de vellosidades

Figura 11. Sitios histológicos y localización del intestino delgado empleado para análisis morfométricos (De Conto *et al.*, 2010)

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

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

2) Ancho: con una línea se unieron los bordes apicales de las células epiteliales de lados opuestos, ubicadas aproximadamente en la mitad de la vellosidad.

3) Profundidad y ancho de las criptas intestinales

En la Figura 11, se ilustran los sitios histológicos en los que fueron realizadas las mediciones.

5.3 Análisis de contenido de mucina en cortes histológicos de intestino

La histoquímica de carbohidratos con las tinciones de Ácido Peryódico de Shiff (PAS)-Azul del Alcían (AA) fue realizada como la describió previamente Brunsgaard (1997). Las muestras fueron fijadas y conservadas en formol bufferado al 10% en PBS y se procesaron mediante el método convencional de inclusión en parafina para obtener muestras de 3 μm de espesor, tiñéndose con PAS-Azul de Alcían para determinar la cantidad de células caliciformes. Se consideraron diez vellosidades por laminilla de manera aleatoria de cada sección intestinal. Se fotografiaron empleando una cámara digital (Canon, Tokio) montada en un microscopio Axiostar (marca Zeiss, México) bajo el objetivo 10X. Se analizaron aquellos cuadros en donde se apreciaban áreas con tinción positiva al ácido peryódico de Shiff y azul de Alcían, los cuales reaccionaron con la mucina de las células caliciformes.

Según el aspecto tintorial de las células caliciformes, se observaron 3 poblaciones celulares: a) unas, que muestran coloración azul (por el azul de Alciano), b) otras teñidas de color magenta propia del PAS y c) otras de coloración morado oscuro debido a la combinación de las 2 tinciones, AA y PAS.

El área que se analizó incluía el material mucoso presente en la cripta luminal. Con esta técnica se tiñeron los gránulos de todas las células mucosas (incluyendo las células

caliciformes de las vellosidades y de las criptas intestinales) así como la secreción apical. Se cuantificó por área la mezcla de mucinas neutras y ácidas que presentaron tinción morado, magenta-morado, o azul-morado en las células caliciformes, empleando el sistema procesador de imágenes ImageJ2 (Curtis *et al.*, 2017).

5.4 Detección de células intestinales en apoptosis

La detección de células en necrosis y/o apoptosis, se realizó empleando el kit comercial para detección de apoptosis Annexin V-FITC (Sigma Aldrich, St. Louis Missouri, US). Las muestras embebidas en parafina fueron cortadas y adheridas a laminillas recubiertas de poli-L-lisina (Corning®, EE.UU). Dichas muestras recibieron un

1. Pre-tratamiento, que consistió en desparafinado en:

- Xilol (2 veces)
- Alcohol 100% (2 veces)
- Alcohol 70%
- Buffer de unión 1X (1.4 M NaCl y 25 mM CaCl₂).

Cada fase con una duración de 5 minutos, realizado en cámara húmeda para evitar deshidratación

2. Tinción con 50 µl de tinción de etiquetado doble

3. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente, en oscuridad

4. Lavar con 50 µl de buffer de unión 1X (3 veces)

5. Colocar 35 µl de buffer de unión 1X, colocar cubreobjetos y ver al microscopio de fluorescencia

Se tomaron fotografías de las vellosidades intestinales, empleando un microscopio de epifluorescencia Axioscop HB50 (marca Zeiss, México) y se estandarizó un área de medición de 10,000 µm², en donde se cuantificaron las células en apoptosis, las cuales se observaron fluorescentes. El análisis se realizó a través de la captura de imágenes

con una cámara digital (marca Canon, Japón) montada en el microscopio, para la cuantificación de células en apoptosis se empleó el sistema procesador de imágenes Image J2 (Curtis *et al.*, 2017).

5.5 Extracción del ARN total

La extracción del ARN de las secciones intestinales se realizó mediante la técnica descrita por Méndez *et al.* (2011), Después, cada muestra fue macerada, empleando nitrógeno líquido, para obtener aprox. 0.1 g de muestra; la cual fue inmediatamente colocada en hielo a la cual se le añadió 1 ml de Trizol Reagent (Invitrogen, USA). La muestra fue homogenizada y posteriormente centrifugada a 10,000 rpm por 10 min a 4°C.

El sobrenadante fue transferido a un microtubo Eppendorf de plástico con capacidad de 1.5 ml nuevo (previamente atemperado), para reposarlo durante 5 minutos. Se adicionaron 0.2 ml de cloroformo (Sigma Aldrich, EE.UU). La muestra se homogenizó y se dejó reposar por 3 min más. Después la muestra fue nuevamente centrifugada a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. La fase acuosa fue transferida a un tubo estéril, al que se le añadieron 0.5 ml de isopropanol (Sigma Aldrich, EE.UU), se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos y se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C. El sobrenadante fue removido y al sedimento (pastilla), se le añadió 1 ml de etanol (Sigma Aldrich, EE.UU) al 100%. Se centrifugó a 8,500 rpm a 4 °C, el sobrenadante fue descartado y se dejó secar la pastilla, la cual fue resuspendida con 20 µl de agua DEPC (agua libre de DNAsa/RNAsa). La integridad del RNA fue corroborado realizando una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, teñido con bromuro de etidio.

5.6 Transcripción reversa (RT)

Cada una de las muestras fue colocada en un tubo de 500 µl fueron colocados 5 µl de ARN de cada muestra de las diferentes secciones intestinales. Se añadieron 6 µl de buffer 5x, 0.75 µl de DNAsa de 0.1 U/µl (Invitrogen) y 18.25 µl de agua tratada con DEPC (agua libre de DNAsa/ARNsa). Este procedimiento fue realizado en frío. La reacción fue incubada a temperatura ambiente durante 15 min y luego a 5 min a 70 °C en un baño

seco. A la reacción se le añadió 1 µl de hexanucleótidos al azar a una concentración de 0.15 µg/ml (Invitrogen, EE.UU). Se adicionó 1 µl de DNTP's 10 µM e incubó a temperatura ambiente durante 5 min. La reacción fue colocada nuevamente en hielo y se le adicionó 2 µl de buffer 5x, 3 µl de DTT 0.1 M y 1 µl de inhibidor de ARNsa 10 U/µl (Thermo Scientific). La muestra fue homogeneizada y centrifugada durante 10 segundos. Finalmente la reacción se incubó a 42 °C durante 2 min. Se le añadió transcriptasa reversa 200 U/µl (RT-Superscript III, Invitrogen, EE.UU) y se incubó a 42 °C por 50 min y luego a 70°C durante 15 min. Al finalizar la reacción, el ADN complementario (ADNc) fue almacenado a -20°C para posteriormente realizar PCR y PCR cuantitativo (qPCR).

5.7 Expresión de proteínas de unión estrecha

Se analizó la expresión de los RNA mensajeros de Claudina 2, Zonoccludina 1 y Ocludina-1 en duodeno, yeyuno e íleon con oligonucleótidos específicos, de acuerdo a secuencias obtenidas de la base de datos de GenBank (Cuadro 2). El ARN ribosomal 18S se empleó como gen constitutivo para normalizar la reacción. Previo a los análisis de qPCR se realizaron pruebas de PCR punto final para estandarizar las condiciones de amplificación de cada ARN mensajero.

Cuadro 2. Oligonucleótidos empleados para el análisis de expresión de proteínas de unión estrecha y ARN ribosomal 18S, de acuerdo con su secuencia reportada en el GeneBank (NCBI, EUA).

ARNm	Secuencia del oligonucleótido	Fragmento (pb)
ARN Ribosomal 18S (AY265350.1)	Fw 5'-ATCCGAGGGCCTCACTAAAC-3' Rv 5'-TAGAGGGACAAGTGGCGTTC-3'	295
Claudina-2 (NM_001161638.1)	Fw 5'-ATCTAGCGCCATCTCCTCGT-3' Rv 5'-GGAGCGATTTCTTGAGTC-3'	319
Ocludina (NM_001163647.2)	Fw 5'-ATTTATGACGAGCAGCCCC-3' Rv 5'-ACGCCTCCAAGTTACCACTG-3'	274
Zonoccludina-1 (XM_013993251.1)	Fw 5'-TGGCGCTACAAGTGATGACC-3' Rv 5'-CGCTTGTGGTGGTAGGGAG-3'	289

Las reacciones de amplificación para los análisis de qPCR se realizaron con 1.5 µl de ADNc (50 ng/µl), 1.5 µl (0.5 µM) de cada oligonucleótido específico, 12.5 µl SYBR Green Supermix (mezcla 2x de enzima DNA polimerasa, SYBR Green y ROX 2X; Fermentas, Glen Burnie, MD, USA) y cbp 25 µl con agua libre de nucleasas. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Chromo 4 con el software MJ opticon monitor 3.1 (Bio-Rad, Herefordshire, UK). Las condiciones de amplificación para qPCR fueron: desnaturalización inicial de 95°C por 1 minuto, y 45 ciclos (95°C por 45 segundos, 56°C por 15 segundos, 72°C por 1 minuto). Al término de cada ciclo se leyó la fluorescencia de las muestras; y al final de los 45 ciclos se realizó una curva de desnaturalización de 60°C a 90°C con lectura de fluorescencia cada 0.2 °C. De cada muestra se amplificaron por duplicado los fragmentos específicos de cada mRNA a analizar, al mismo tiempo que se cuantificó la presencia del gen de referencia ARN ribosomal 18S. Los resultados de amplificación fueron analizados de acuerdo con la metodología de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrita por Livak y Schmittgen (2001); de acuerdo con estos autores, los valores de Ct de cada muestra fueron corregidos con el Ct del gen de referencia para realizar el análisis estadístico.

5.8 Análisis estadístico

El experimento se realizó según un diseño de bloques completos al azar, considerando su peso y edad. Los animales fueron aleatorizados a cada uno de los tratamientos y cada tratamiento tuvo un total de 6 repeticiones. Para el análisis estadístico se construyeron dos contrastes para evaluar el efecto del EC vs confort, y EC agudo vs EC crónico, sobre cada una de las variables analizadas. El análisis de resultados se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 19.

6. RESULTADOS

6.1 Condiciones ambientales

La temperatura ambiental y humedad relativa fueron distintas entre las condiciones de confort y EC ($P < 0.05$), pero no entre estrés agudo o crónico ($P > 0.05$). Durante el período de confort el promedio de la temperatura ambiental fue 23.3 ± 0.74 °C; con 71.1 ± 6.7 % de humedad relativa. Durante los períodos de EC (agudo y crónico) la temperatura ambiental fue en promedio de 33.0 ± 4.8 °C, con humedad relativa de 59.4 ± 17.5 % (Figura 12).

El horario más cálido fue entre las 12:00 y las 20:00 horas, cuando la temperatura ambiental fue superior a 35 °C. El promedio del índice de calor durante el período de confort fue de 75.9 ± 1.6 ; mismo que se incrementó significativamente ($P > 0.05$) durante el período de EC cuando se registró en promedio 102.2 ± 5.6 (Figura 12).

Cuadro 3. Ganancia diaria de peso, consumo diario de alimento y relación consumo: ganancia de cerdos en crecimiento alojados en condiciones de confort, EC (EC) agudo y EC crónico.

	Confort	EC Agudo	EC Crónico	Valores de P	
				Confort vs EC	EC agudo vs EC crónico
Ganancia diaria de peso (g)	823	472	728	0.019	0.019
Consumo diario de alimento (g)	1369	800	888	0.000	0.309
Relación Ganancia: Consumo	0.602	0.472	0.686	0.765	0.040

6.2. Comportamiento productivo de los cerdos

El peso de los cerdos al final de la etapa de confort fue de 44.2 kg, al final de la etapa de EC agudo, 45.2 kg; y al final del experimento 48.4 kg. Los resultados de ganancia diaria de peso (GDP), consumo diario de alimento (CDA) y relación consumo: ganancia (C: G) se muestran en el Cuadro 3. Los cerdos en condición de EC tuvieron menor GDP

($P=0.019$) y menor CDA ($P<0.001$) en comparación con los cerdos en confort. El EC agudo redujo drásticamente la GDP ($P=0.019$) y elevó la relación C:G ($P=0.040$) en comparación con el EC crónico.

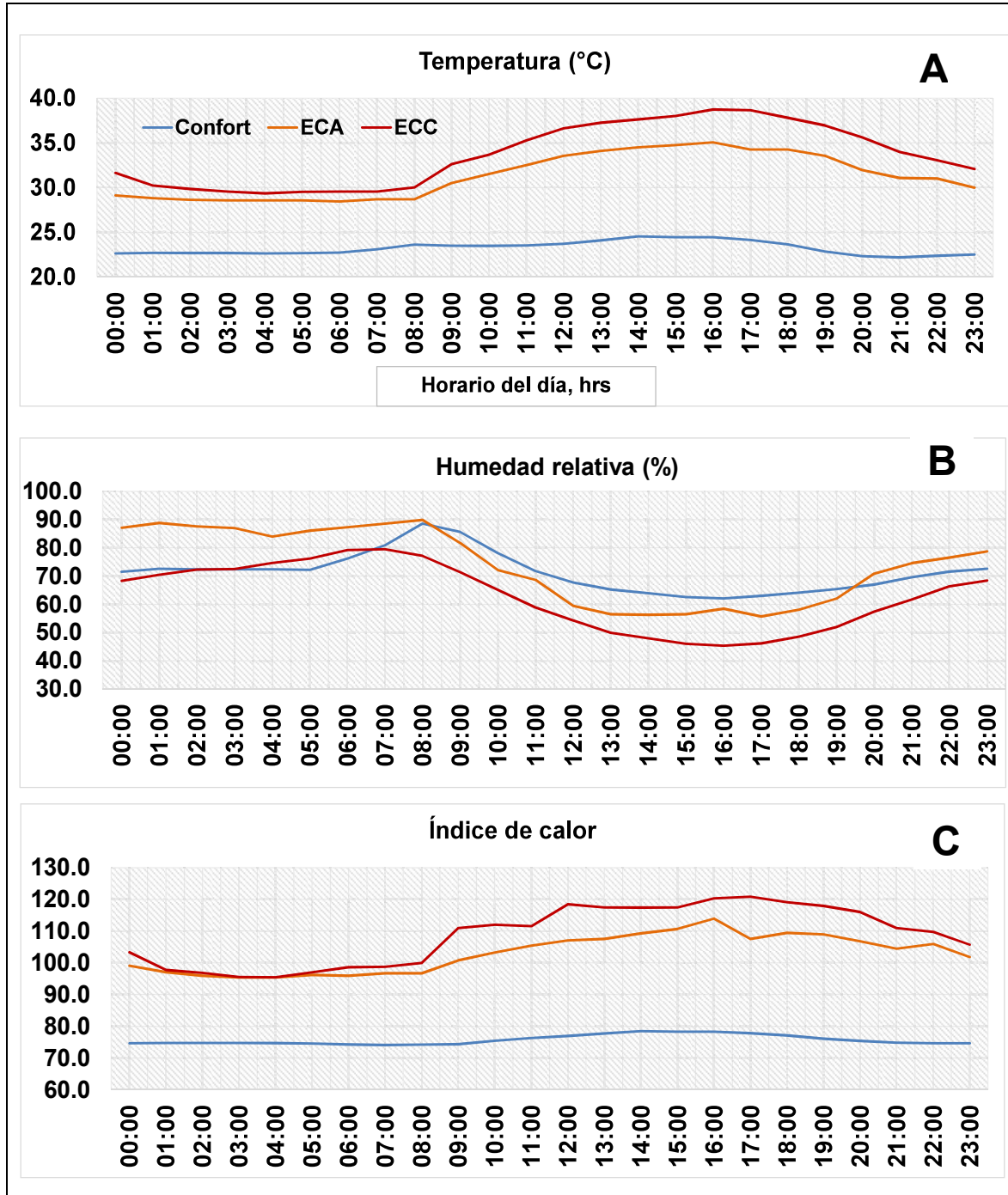


Figura 12. Temperatura ambiente (A), humedad relativa (B) e índice de calor (C) de los periodos de confort, EC agudo y EC crónico dentro de la sala en donde se alojaron los cerdos.

6.3 Hemograma y química sanguínea

El Cuadro 4 presenta los resultados de los análisis sanguíneos. No se observaron cambios en la concentración de leucocitos ni de neutrófilos; sin embargo, el número de linfocitos sanguíneos se incrementó en los cerdos en EC (5.67 vs $5.24 \times 10^9/L$; $P=0.034$) en comparación con cerdos en confort. La concentración de otros leucocitos no fue diferente ($P>0.05$). Se observó una reducción en el volumen del paquete celular (VPC) de 0.41 l/L a 0.35 l/L ($P=0.040$), conteo de eritrocitos de 6.72 a $5.65 \times 10^{12}/L$ ($P=0.008$) y hemoglobina de 131.0 g/L a 112.6 g/L ($P=0.054$) y plaquetas de 36.70 a $23.60 \times 10^{10}/L$ ($P=0.000$) en los cerdos en EC agudo en comparación con cerdos en EC crónico.

El EC incrementó la concentración de urea ($P=0.058$), BUN ($P=0.058$), ácido úrico ($P=0.015$) y triglicéridos ($P=0.007$); y redujo la concentración de calcio ($P=0.008$). Los cerdos en ECC agudo redujeron su concentración de glucosa en sangre (127.6 mg/dL a 85.5 mg/dL; $P=0.004$), colesterol (108.3 mg/dL a 83.3 mg/dL; $P=0.062$), calcio (10.37 a 9.28 mg/dL; $P=0.003$) y fósforo (10.6 a 7.7 mg/dL; $P<0.001$) en comparación con los cerdos EC agudo.

Cuadro 4. Resultados de análisis sanguíneos, hemograma y química sanguínea, realizados a cerdos en crecimiento en condiciones de confort, EC agudo y EC crónico.

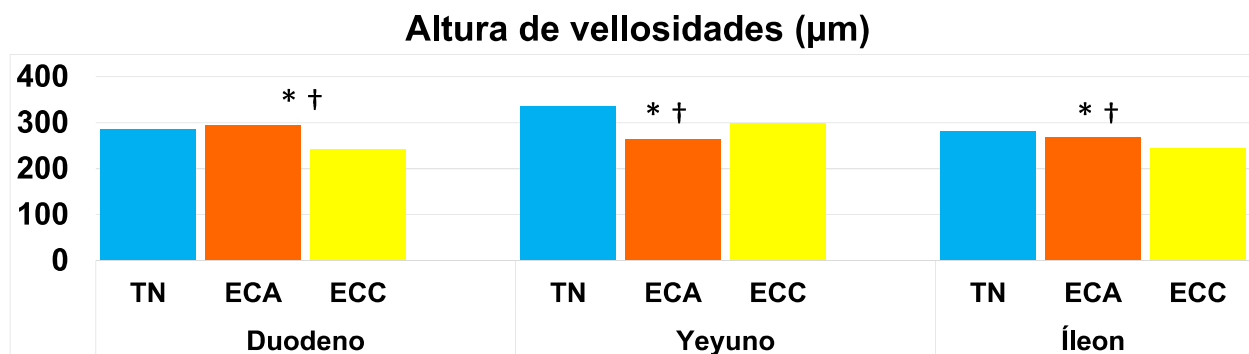
	Unidades	Confort	EC agudo	EC crónico	Valores de P	
					Confort vs EC	EC agudo vs EC crónico
Hemograma						
Leucocitos	x10 ⁹ /L	10.20	11.10	10.50	0.181	0.207
Neutrofilos	x10 ⁹ /L	5.15	5.47	4.52	0.458	0.207
Linfocitos	x10 ⁹ /L	5.24	5.52	5.83	0.034	0.632
VPC	I/L	0.39	0.41	0.35	0.822	0.040
Eritrocitos	x10 ¹² /L	6.35	6.72	5.65	0.593	0.008
Hemoglobina	g/L	122.67	131.00	112.67	0.914	0.054
VCM	F	60.95	60.88	62.50	0.561	0.279
CCMH	g/L	316.93	319.53	318.42	0.643	0.826
Plaquetas	x10 ¹⁰ /L	29.50	36.70	23.60	0.794	0.000
Química sanguínea						
Prot. Plásmatica	g/L	64.67	66.33	69.33	0.255	0.347
Glucosa	mg/dL	111.50	127.67	85.50	0.655	0.004
BUN	mg/dL	12.83	17.00	15.67	0.058	0.508
Urea	mg/dL	27.47	36.38	33.52	0.058	0.506
Creatinina	mg/dL	1.40	1.58	1.48	0.382	0.567
Ácido Úrico	mg/dL	0.10	0.20	0.20	0.015	1.000
Colesterol	mg/dL	90.00	108.33	83.33	0.594	0.062
Triglicéridos	mg/dL	17.50	37.83	33.67	0.007	0.546
Prot. Totales	g/dL	6.78	7.05	7.73	0.106	0.115
Albúmina	g/dL	3.40	3.52	3.73	0.139	0.212
Globulina	g/dL	3.38	3.53	4.00	0.269	0.245
Calcio	mg/dL	10.65	10.37	9.28	0.008	0.003
Fósforo	mg/dL	9.67	10.63	7.70	0.284	0.000
AST	U/L	65.17	77.50	76.00	0.429	0.929
ALT	U/L	53.50	56.33	40.0	0.315	0.253
B.Total	mg/dL	0.40	0.35	0.47	0.954	0.484
B. Directa	mg/dL	0.28	0.23	0.30	0.841	0.491
B. Indirecta	mg/dL	0.12	0.12	0.17	0.748	0.579
Fosfatasa Alcalina	U/L	196.50	126.00	130.67	0.152	0.930
GGT	U/L	21.17	22.00	24.83	0.497	0.460
Amilasa	U/L	2531.83	2628.00	2678.83	0.445	0.780

6.4 Alteraciones morfológicas del intestino delgado

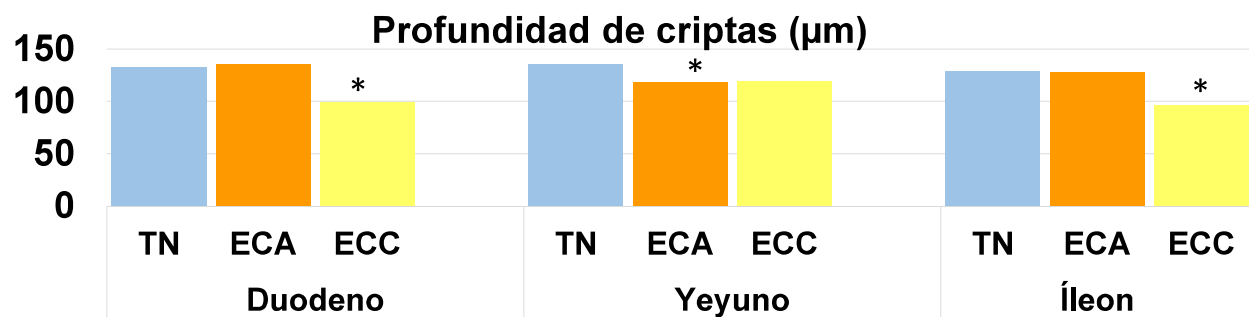
La altura de las vellosidades intestinales fue diferente entre las diferentes secciones intestinales así como entre los diferentes tratamientos. Las vellosidades más altas se presentaron en las muestras de yeyuno. Así mismo las vellosidades correspondientes a los tratamientos de EC agudo y crónico fueron más cortas en comparación con las vellosidades de los cerdos que se mantuvieron en condiciones de confort. Se registró una interacción significativa por efecto del segmento intestinal y tratamiento ($P < 0.01$; Cuadro 5).

La profundidad de las criptas tuvo una tendencia a disminuir en relación al tiempo de exposición al EC. La relación altura de vellosidades: profundidad de las criptas se incrementó por exposición al EC (Cuadro 5). Se observó descamación en las puntas de las vellosidades intestinales (Figura 14) de los tratamientos sometidos a EC.

a)



b)



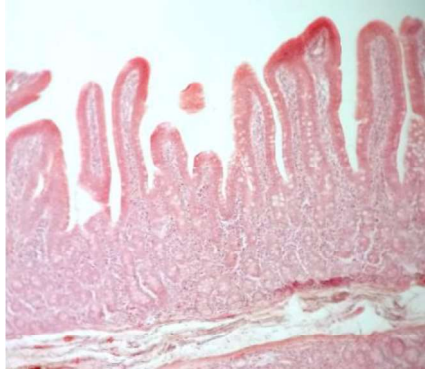
* $P < 0.01$ Confort vs EC; † $P < 0.01$ ECA vs ECC

Figura 13. a) Comparación de la altura de las vellosidades y b) profundidad de las criptas por sección intestinal (duodeno, yeyuno e íleon).

a)



b)



c)

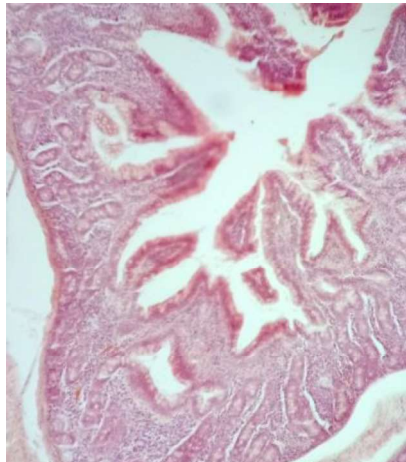
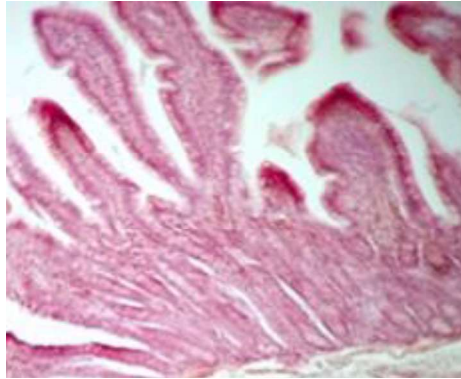


Figura 14. Cambios morfológicos en duodeno, debido a los tres tratamientos evaluados (a.-TN: Termoneutralidad, b.- ECA: EC agudo y c.-ECC: EC crónico), Tinción HE; Vista al microscopio: objetivo 10X.

a)



b)



c)

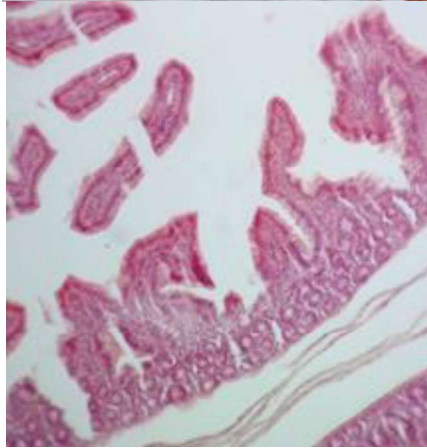
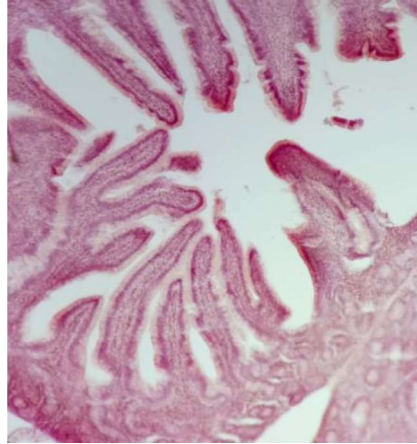
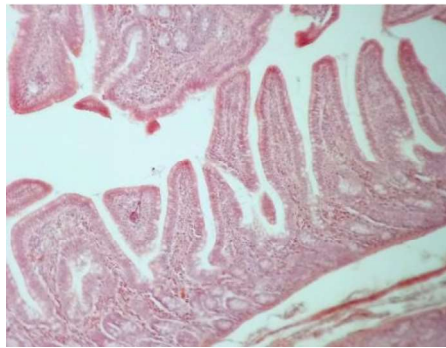


Figura 15. Cambios morfológicos en yeyuno, debido a los tres tratamientos evaluados. (a.-TN: Termoneutralidad, b.- ECA: EC agudo y c.-ECC: EC crónico), Tinción HE; Vista al microscopio: objetivo 10X.

a)



b)



c)

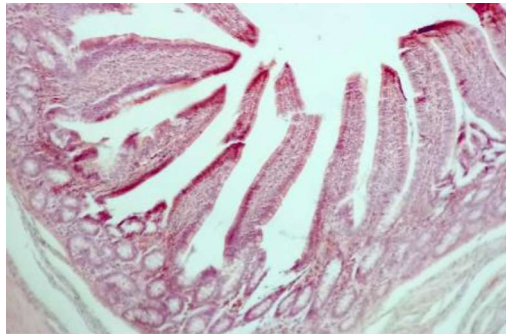


Figura 16. Cambios morfológicos en íleon, debido a los tres tratamientos evaluados (a.-TN: Termoneutralidad, b.- ECA: EC agudo y c.-ECC: EC crónico), Tinción HE; Vista al microscopio: objetivo 10X.

Cuadro 5. Morfometría del intestino delgado de cerdos en crecimiento en condiciones de confort, EC (EC) agudo y crónico.

	Confort	ECA	ECC	Valores de P	
				Confort vs EC	ECA vs ECC
Duodeno					
Altura de vellosidad	285.9	295.3	242.9	0.0698	0.0000
Profundidad Criptas	132.1	135.7	98.8	0.0270	0.0000
Altura: Profundidad	2.4	2.3	2.6	0.4645	0.0608
Ancho apical	45.3	48.5	46.4	0.4970	0.5649
Ancho Medio	61.3	65.0	58.3	0.9119	0.0858
Ancho Posterior	79.9	86.6	72.0	0.8894	0.0062
Yeyuno					
Altura de vellosidad	337.1	263.7	298.5	0.0000	0.0033
Profundidad Criptas	135.7	117.8	118.8	0.0019	0.8769
Altura: Profundidad	2.7	2.3	2.6	0.0719	0.0646
Ancho apical	53.5	42.7	52.4	0.0867	0.0153
Ancho Medio	73.7	57.7	69.3	0.0129	0.0140
Ancho Posterior	97.2	71.3	90.3	0.0050	0.0049
Íleon					
Altura de vellosidad	281.3	268.1	244.1	0.0064	0.0242
Profundidad Criptas	128.6	128.2	95.9	0.0014	0.0000
Altura: Profundidad	2.3	2.2	2.6	0.4066	0.0003
Ancho apical	42.0	43.2	46.7	0.6522	0.1258
Ancho Medio	57.0	61.8	53.6	0.8217	0.0316
Ancho Posterior	83.5	79.7	65.3	0.0238	0.0106

6.5 Mucina

Para evaluar los cambios en la integridad intestinal, se evaluó la producción de mucina, en los cortes histológicos de duodeno, yeyuno e íleon teñidos PAS-Azul de Alcían, el cual tiene una alta afinidad por mucina.

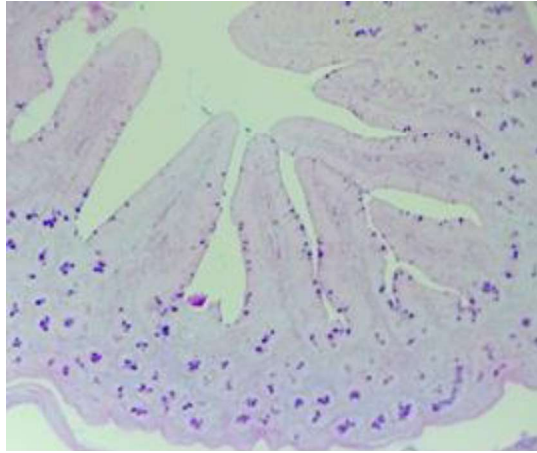
Los cerdos expuestos a EC presentaron un incremento en el conteo de células positivas a PAS-Azul de Alcían ($P=0.015$) en el duodeno en comparación con el grupo control. Cuando se compararon los tratamientos de EC se observó una mayor cantidad de células productoras de mucina en el epitelio duodenal de cerdos con EC crónico ($P=0.021$). De esta forma, el número de células positivas a PAS-Azul de Alcían incrementaron (hiperplasia) a medida que se incrementó el tiempo de exposición al calor.

En yeyuno e íleon el número de células positivas a PAS-Azul de Alcían no fue significativamente diferente entre tratamientos ($P>0.05$).

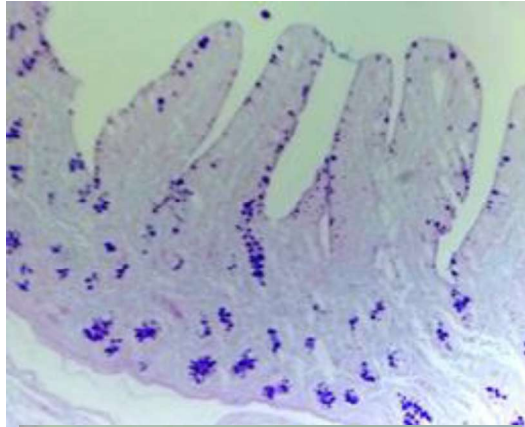
Cuadro 6. Células positivas a la tinción PAS-Azul de Alcían

	Confort	EC Agudo	EC Crónico	Confort vs EC	EC Agudo vs EC Crónico
Duodeno	3.2	3.5	5.7	0.015	0.021
Yeyuno	3.5	3.0	4.1	0.495	0.288
Íleon	4.9	6.4	5.0	0.340	0.427

a)



b)



c)

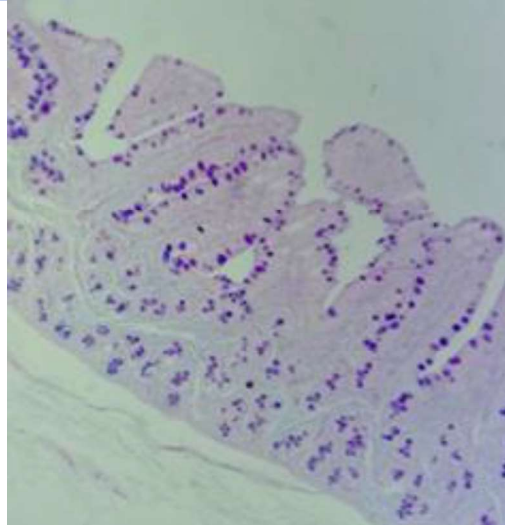
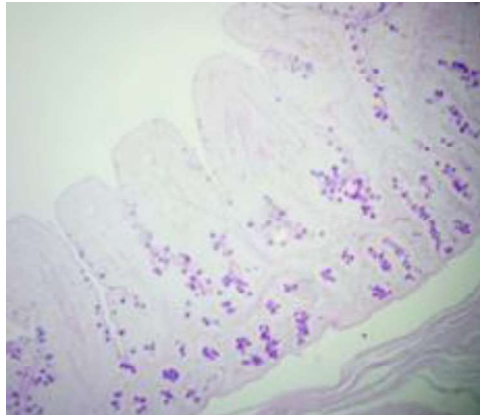
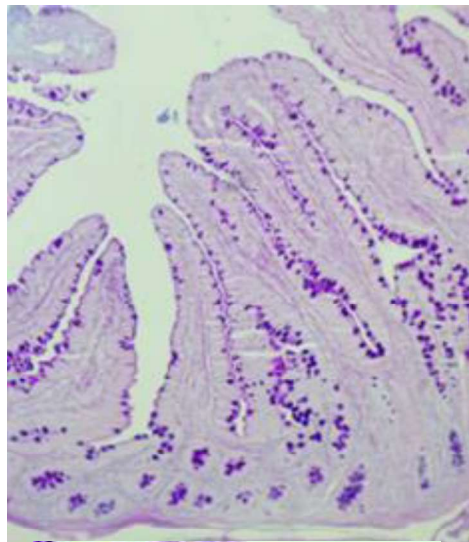


Figura 17. Cambios en el número de células caliciformes en duodeno, según la proporción de células teñidas PAS-Azul de Alcían (a.-TN: Termoneutralidad, b.- ECA: EC agudo y c.-ECC: EC crónico). Vista al microscopio: objetivo 10X.

a)



b)



c)

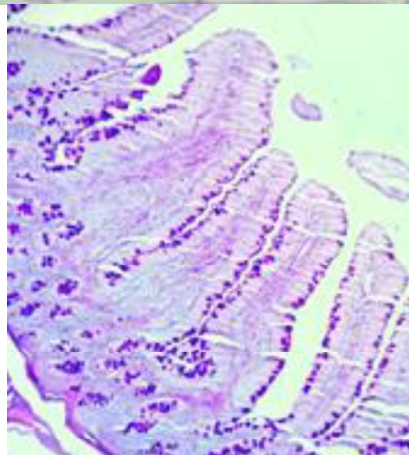
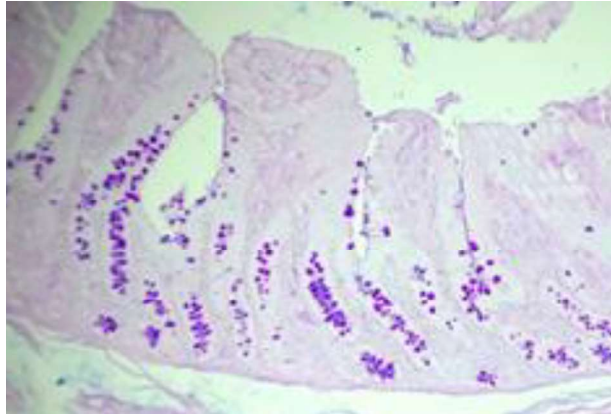
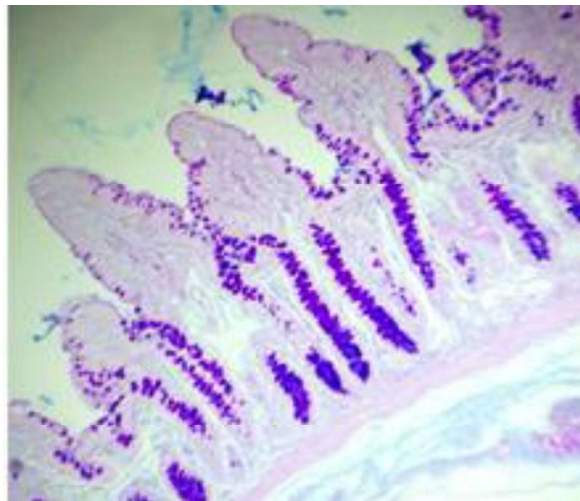


Figura 18. Cambios en el número de células caliciformes en yeyuno, según la proporción de células teñidas PAS-Azul de Alcian (a.-TN: Termoneutralidad, b.- ECA: EC agudo y c.-ECC: EC crónico). Vista al microscopio: objetivo 10X.

a)



b)



c)

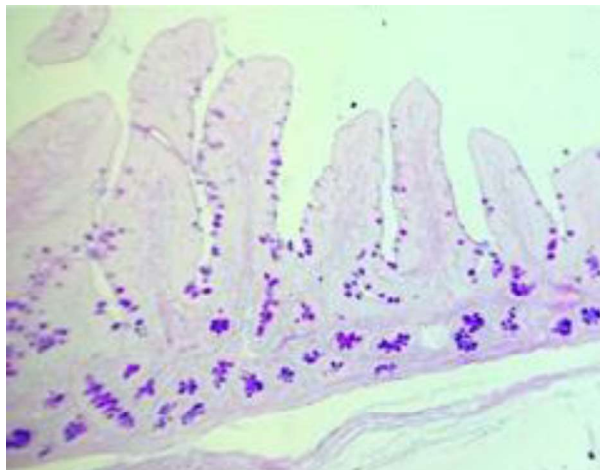


Figura 19. Cambios en el número de células caliciformes en íleon, según la proporción de células teñidas PAS-Azul de Alcán (a.-TN: Termoneutralidad, b.- ECA: EC agudo y c.-ECC: EC crónico). Vista al microscopio: objetivo 10X.

6.6 Apoptosis

La pérdida de simetría en la membrana celular es un fenómeno que parece ser característico del proceso apoptótico. Por lo cual, las células que están sufriendo apoptosis se pudieron detectar marcándolas con Anexina V-FITC; en donde la anexina V marcada con fluorocromos puede usarse para identificar específicamente células apoptóticas.

En las muestras de íleon de los cerdos expuestos a EC se incrementó el número de células positivas a Anexina V ($P=0.035$) en comparación con el grupo de condiciones de confort. Sin embargo, en duodeno y yeyuno no se observaron diferencias significativas en las células apoptóticas, de los distintos tratamientos. Tampoco fue diferente el número de células apoptóticas cuando se comparó entre EC agudo y EC crónico ($P>0.05$).

Cuadro 7. Núcleos apoptóticas en las secciones intestinales por área de 10 000 μm^2

	Confort	EC Agudo	EC Crónico	Confort vs EC	EC Agudo vs EC Crónico
Duodeno	1.7	3.5	2.6	0.517	0.631
Yeyuno	9.7	11.0	13.8	0.423	0.384
Íleon	2.8	12.9	20.6	0.035	0.299

6.7 Expresión de proteínas de unión estrecha

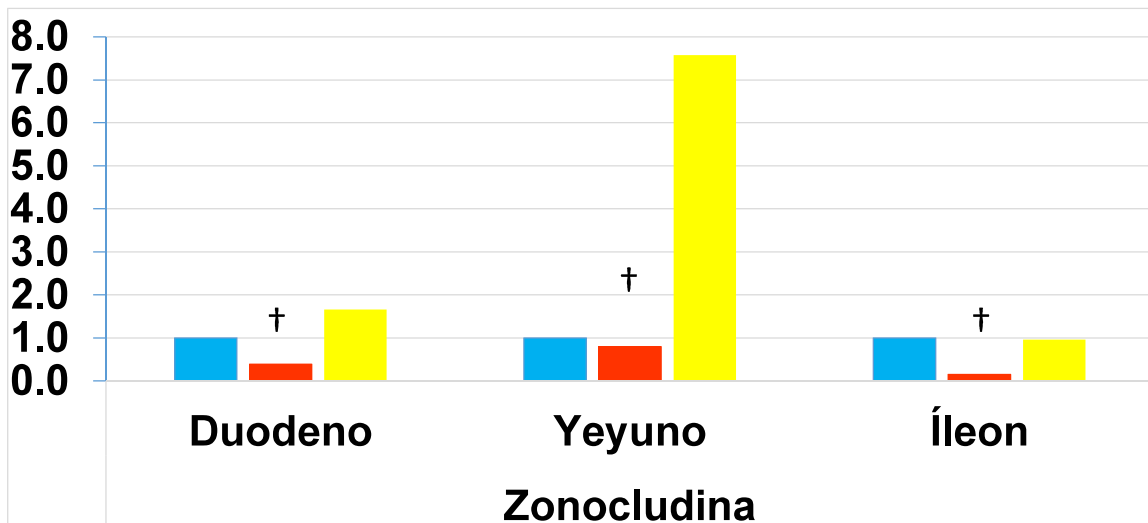
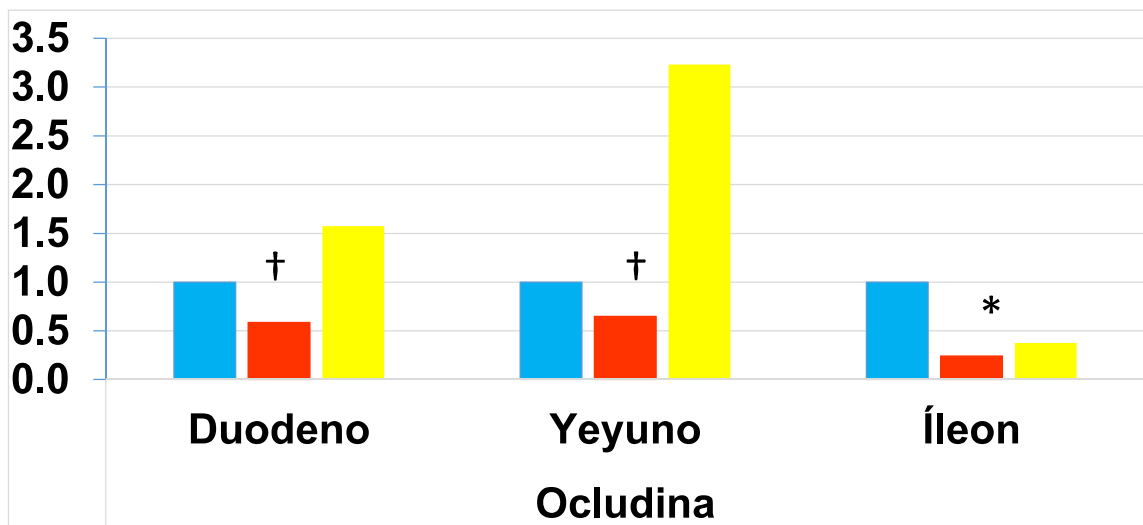
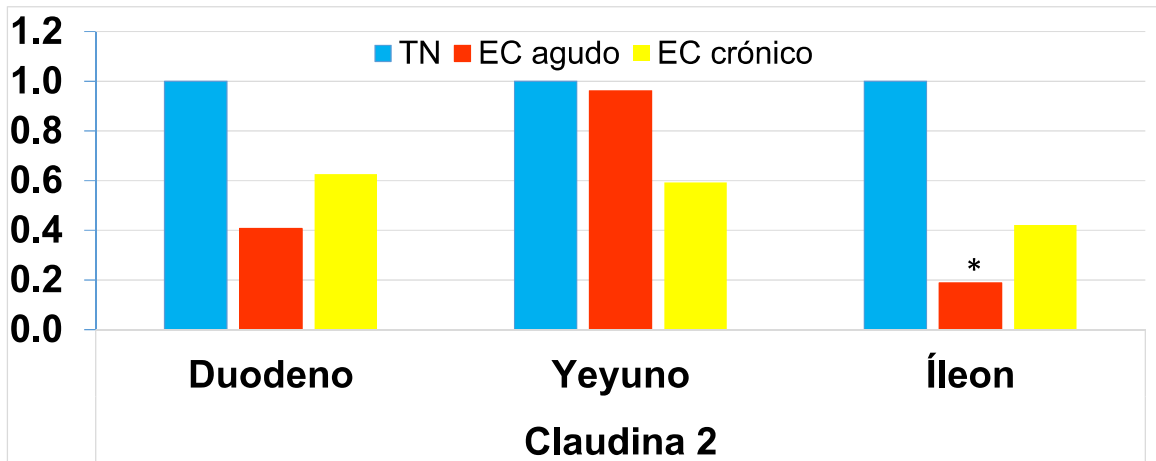
En la Figura 20 se muestran los cambios en la expresión de claudina-2, ocludina y zonoccludina-1 en las tres secciones de intestino delgado de los cerdos expuestos a las condiciones de EC agudo y EC crónico, comparado con el grupo confort. En general la expresión de claudina-2 y ocludina en íleon de cerdos en EC se redujo al 30% en comparación con cerdos en termoneutralidad ($P<0.05$). Sin embargo, la expresión

general de zonoccludina-1 no fue diferente ($P>0.05$) entre EC y termoneutralidad. La expresión de ocludina en EC crónico fue 2.7 y 5.0 veces la observada en EC agudo en duodeno y yeyuno respectivamente ($P<0.05$). En el caso de la zonoccludina-1 también se

Cuadro 8. Expresión relativa de proteínas de unión estrecha

	Confort	EC Agudo	EC Crónico	Confort vs EC	EC Agudo vs EC Crónico
Claudina 2					
Duodeno	1.00	0.41	0.63	0.129	0.3986
Yeyuno	1.00	0.96	0.59	0.628	0.4806
Íleon	1.00	0.19	0.42	0.044	0.2380
Ocludina					
Duodeno	1.00	0.59	1.58	0.916	0.010
Yeyuno	1.00	0.65	3.23	0.470	0.001
Íleon	1.00	0.24	0.38	0.047	0.512
ZO-1					
Duodeno	1.00	0.39	1.66	0.680	0.010
Yeyuno	1.00	0.80	7.57	0.199	0.019
Íleon	1.00	0.16	0.97	0.258	0.006

observaron incrementos de 4.4, 9.5 y 6.2 veces en duodeno, yeyuno e íleon, respectivamente, en los cerdos en EC crónico con respecto a su expresión en EC agudo ($P<0.05$).



*EC vs TN: $P < 0.05$; † ECA vs ECC: $P < 0.05$

Figura. 20 Incrementos/decrementos en la expresión de claudina-2, ocludina y zonoccludina-1 en las tres secciones de ID.

7. DISCUSIÓN

En gran parte del mundo, los cerdos alojados en granjas bajo condiciones prácticas se encuentran expuestos a grandes variaciones de temperatura ambiental durante la época de verano (Cervantes *et al.*, 2017). En consecuencia, si la temperatura ambiental excede la temperatura de termoneutralidad para los cerdos (16-25°C para cerdos en crecimiento), éstos padecerán de EC (Coffey *et al.*, 1995).

En comparación con otros animales, los cerdos son más sensibles al EC debido a su alta generación de calor metabólico, rápida acumulación de grasa y falta de glándulas sudoríparas (Dallaire *et al.*, 1996). Aunado a eso, reportes recientes (Morales *et al.*, 2016a, 2016b) muestran que en condiciones de temperatura elevada, los cerdos tienen dificultad para mantener su temperatura corporal dentro del rango normal para su especie, y que ésta se incrementa siguiendo un patrón similar al de la temperatura ambiente.

Durante la fase experimental de este trabajo, se registraron grandes variaciones de temperatura ambiental y humedad relativa dentro de la sala donde los cerdos fueron alojados. Tanto la temperatura ambiental como la humedad relativa durante el periodo de confort se mantuvieron dentro del rango de confort o termoneutralidad para los cerdos; sin embargo, en el periodo de EC la temperatura ambiental sobrepasó el nivel de termoneutralidad. En la temperatura promedio durante este periodo fue de 33 °C, e incluso el índice de calor fue superior a superior a 100 entre las 0800 y 2100 h considerado esto como de cuidado extremo y peligroso (NOAA, 2017). Las diferencias ambientales en los tratamientos del presente trabajo evidencian claramente que los cerdos se encontraban en condiciones de EC, teniendo en cuenta que la temperatura de confort para cerdos en crecimiento oscila alrededor de los 24°C (Quiniou *et al.*, 2001).

Como resultado del incremento en la temperatura ambiental, la frecuencia respiratoria, frecuencia cardiaca y temperatura rectal de los cerdos se incrementan, afectando negativamente el consumo de alimento, eficiencia productiva y reproductiva de los animales (Das *et al.*, 2016). En el presente estudio se observó que los animales expuestos a EC tuvieron un consumo de alimento hasta 60% menor, en comparación con los animales alojados bajo condiciones de confort, lo cual concuerda con lo anterior.

Fisiológicamente se ha documentado que el hipotálamo tiene una función importante en la termorregulación autonómica (Morrison, 2016), por lo que el incremento de la temperatura ambiente podría tener un efecto negativo sobre el hipotálamo afectando el centro del apetito, con una drástica disminución en el consumo de alimento (Baile y Forbes, 1974).

La reducción en el consumo de alimento que hacen los cerdos en estrés por calor, es un mecanismo empleado para disminuir la producción de calor debido a la digestión del alimento (Morera *et al.*, 2012, Hooda *et al.*, 2010). Como consecuencia, los animales experimentan un balance energético negativo, provocando principalmente una pérdida de peso (Li *et al.*, 2017). Al limitar la producción de calor metabólico durante el EC por la supresión del consumo de alimento.

En general, la reducción en la ganancia de peso y en el consumo de alimento en los cerdos sometidos a EC, ha sido confirmada por otros autores (Huynh *et al.*, 1998; Collin *et al.*, 2001; Morales *et al.*, 2014; Yazdi *et al.*, 2016). En casos más severos se ha reportado pérdida de peso en cerdos expuestos a EC conforme se aumentó el tiempo de exposición a temperatura ambiental elevada (Morrow-Tesch *et al.*, 1994). Este fenómeno no se observó en el presente trabajo, ya que a pesar de la drástica reducción en el consumo en la etapa aguda de exposición al calor, y aunque el nivel de consumo no se recuperó para la etapa de EC crónico, sí se observó una recuperación en la ganancia de peso durante la etapa de estrés por calor crónico e incluso se llegó a tener una relación G: C similar a la de los cerdos en condición de confort.

El sistema inmune protege al organismo y lo prepara para enfrentarse contra agentes estresores internos y externos (Lim *et al.*, 2008). Dentro de los principales indicadores del estatus de la respuesta inmune se encuentran los leucocitos, eritrocitos, hemoglobina, volumen del paquete celular, glucosa y concentraciones de proteína en sangre; las cuales, de acuerdo con nuestra hipótesis podrían modificarse bajo un estrés térmico.

Los leucocitos incluyen a los linfocitos, monocitos y granulocitos, que son los responsables del reconocimiento de los antígenos, producción de citocinas y anticuerpos así como la eliminación de patógenos. En el presente trabajo, las concentraciones de leucocitos de los cerdos se mantuvieron dentro de los límites normales para esta especie,

independientemente del tratamiento al que fueron asignados (Sutherland *et al.*, 2006). Estos parámetros fueron normales y no se observaron diferencias en la concentración de leucocitos, excepto por un ligero incremento en el número de linfocitos en cerdos del grupo de EC. Este resultado coincide parcialmente con un reporte de Arce (2015), quien únicamente observó un incremento en la concentración de leucocitos sanguíneos en cerdos destetados en condición de EC, pero desafiados con LPS de *E. coli*.

En el presente trabajo se observó un incremento en el número de linfocitos sanguíneos bajo condiciones de EC ($P=0.034$), en comparación con los cerdos en confort. Los linfocitos en sangre son usados como parámetro para reflejar la inmunidad específica, debido a su importancia en el establecimiento de una inmunidad duradera (Zhao *et al.*, 2002a; Cho *et al.*, 2014), indicando la activación de linfocitos en los animales expuestos a EC, como un primer paso para controlar, impedir o eliminar posibles infecciones en las superficies epiteliales (piel, revestimiento del tracto gastrointestinal y vías respiratorias, Abbas *et al.*, 2008) en los cerdos del presente experimento.

El hemograma realizado en los cerdos muestra valores comprendidos dentro de los rangos normales para su especie en VPC, conteo de eritrocitos, concentración de hemoglobina, VCM, CCMH y conteo de plaquetas (Begum *et al.*, 2015), independientemente del tratamiento al que fueron sometidos. Lo anterior podría confirmar que los animales se mantenían en buen estado de salud y podrían descartarse afecciones vasculares como anemia, hemorragias, trombosis, etc. (Wang *et al.*, 2002; Cunningham., 2014).

Sin embargo, se observó un incremento en el volumen del paquete celular, conteo de eritrocitos, conteo de plaquetas y una tendencia a incrementar la concentración de hemoglobina en los cerdos sometidos a EC agudo en comparación con cerdos EC crónico. Este resultado contrasta con otros reportes en donde se demostró una disminución en el conteo de eritrocitos por lo tanto en el volumen del paquete celular; así como en los valores de hemoglobina durante EC (Kumar *et al.*, 2011; Shivakumar *et al.*, 2010; Temizel *et al.*, 2009).

La posterior reducción en la concentración de hemoglobina y en el volumen del paquete celular en los cerdos sometidos a EC crónico puede sugerir una lisis de eritrocitos,

posiblemente como resultado de un incremento en el ataque de radicales libres (Hargaden y Singer, 2012) a la membrana o por inadecuada disponibilidad de nutrientes para la síntesis de hemoglobina, a consecuencia de la disminución en consumo de alimento (Baumgard y Roads, 2013, Rhoads y Wu, 2009). Sin embargo, los indicadores de esto, tales como bilirrubina y hematócrito no muestran evidencia de lo anterior. Futuros estudios permitirán elucidar el efecto del EC sobre la destrucción de eritrocitos.

Se ha comprobado que los parámetros bioquímicos sanguíneos se ven modificados negativamente cuando los animales se exponen a condiciones de EC, Cunningham (2014), propone que la medición de estos parámetros en suero de cerdos puede brindar información importante sobre el estatus de salud y metabolismo, al ser una herramienta de diagnóstico práctica para evaluar condiciones patológicas en los animales expuestos a tratamientos experimentales diferentes (Verheyen *et al.*, 2007).

La variabilidad en la concentración de glucosa plasmática en los animales expuestos a condiciones de temperatura elevada se explica en función de los mecanismos homeostáticos del organismo, entre los que se encuentran tanto el control endócrino a través de la insulina y como el del glucagón sobre el glucógeno, así como de los glucocorticoides en la gluconeogénesis (Harr, 2002). La glucosa en el músculo y el hígado mantiene un equilibrio dinámico con la glucosa sérica (He y Xiang, 2009).

Cuando los animales están expuestos a estrés por calor, los músculos y las fuentes hepáticas de glucosa se movilizan rápidamente y se reflejan en el aumento de la glucosa sérica para mantener dicho equilibrio dinámico (Xu *et al.*, 2010). En el presente estudio la concentración de glucosa se incrementó en el grupo de EC agudo, pero disminuyó en EC crónico. Esta variación pudo ocurrir como consecuencia de una mayor movilización de las reservas de grasa corporal en respuesta a una mayor demanda de energía asociada con una mayor frecuencia respiratoria (Srikandakumar *et al.*, 2003) y a la disminución del consumo de alimento, en comparación con el grupo control. De acuerdo con Belhadj-Slimen *et al.* (2015), la concentración de glucosa sanguínea es afectada por la severidad y duración del EC.

Las concentraciones plasmáticas de nitrógeno ureico, urea y ácido úrico fueron elevadas en los animales expuestos a EC, en comparación con los cerdos alojados en condiciones

de confort. Estos resultados apoyan la idea de que el EC estimula la degradación de proteínas musculares (Tabiri *et al.*, 2000; Belhadj-Slimen *et al.*, 2016). Se ha observado que el EC agudo (corto) aumenta el metabolismo de las proteínas (marcado por un aumento en los niveles de ácido úrico en plasma), reduce la síntesis y retención de nitrógeno (Tabiri *et al.*, 2000). Sin embargo, la exposición a EC crónico interrumpe la síntesis de proteína en varios músculos, disminuye la degradación de proteínas, con niveles más bajos de aminoácidos en plasma (especialmente azufre y aminoácidos de cadena ramificada) y niveles séricos más altos de aspartato, ácido glutámico y fenilalanina (Tenim *et al.*, 2000).

Todos estos cambios resultado de efectos negativos de EC: disminución en el consumo de alimento, digestión deficiente y absorción de nutrientes, incremento del catabolismo de proteínas corporales, incremento en la oxidación de aminoácidos (Le Floc'h *et al.*, 2018), son orquestados por citocinas inflamatorias y hormonas. La velocidad en la síntesis de proteína disminuye en músculo esquelético, pero incrementa en el hígado y otros tejidos que se encuentran involucrados en la producción de proteínas de fase aguda, defensa e inmunitarias (Obled *et al.*, 2002)

Se ha observado que en condición de EC crónico se incrementa la remoción y metabolismo de lípidos (Belhadj-Slimen *et al.*, 2015). Lo anterior podría asociarse con el incremento del 50% en la concentración de triglicéridos en sangre de animales expuestos a EC, en comparación a los animales alojados en condiciones de confort. Esta dislipidemia en los cerdos expuestos a EC pudiera relacionarse con los elevados niveles de glucosa en plasma, ya que la hiperglucemia aumenta la movilización de las reservas corporales al favorecer la lipólisis (Baumgard y Rhoads, 2013). Aunque el tiempo experimental para su desarrollo fue corto, los niveles altos de triglicéridos en coincidencia con los niveles altos glucosa podrían sugerir una resistencia a insulina (Baumgard *et al.*, 2012; Baumgard y Rhoads, 2013).

En este trabajo la concentración de colesterol disminuyó marcadamente en los cerdos expuestos a EC crónico en comparación al grupo en condiciones de EC agudo (108.33 vs 83.33). Marai *et al.*, (2007) demostraron que esta disminución podría deberse a la dilución resultante del incremento del agua corporal total o de la disminución en la

concentración de acetato, un precursor primario de la síntesis de colesterol. Otros reportes en la literatura indican que los animales expuestos a EC tienen una capacidad limitada para movilizar el tejido adiposo, y por lo tanto, no pueden mantener los mecanismos necesarios para apoyar la flexibilidad metabólica de la selección de combustible (Baumgard *et al.*, 2012; Baumgard y Rhoads, 2013).

Se ha observado que en EC se modifican las concentraciones plasmáticas de ciertos minerales, lo cual se asocia con alta excreción de electrolitos en heces y orina, o debido a la pérdida de agua por jadeo (Belay *et al.*, 1992) resultando en un desequilibrio ácido-base. Además, las alteraciones en el balance de minerales de los animales en EC también podría asociarse a la reducción en su ingesta de alimento (Marai *et al.*, 2007). En el presente trabajo la concentración de calcio y fósforo en el suero de los cerdos se mantuvo dentro de los parámetros normales para esta especie, a excepción de la concentración de calcio en los animales en EC crónico en el que se observó disminuido.

El calcio total en plasma es afectado por la concentración de proteína plasmática; debido a que aproximadamente el 45-50% del total de calcio en plasma se encuentra unido a proteínas plasmáticas (Cheng *et al.*, 2015). Por lo cual la concentración de calcio puede disminuir cuando se presenta una hipoproteinemia, la cual también podría resultar de la reducción en el consumo de alimento (Srikandakumar *et al.*, 2003).

El fósforo es un mineral que junto con el calcio es importante para el mantenimiento del equilibrio ácido-base de los fluidos del cuerpo (McDowell, 1992) y es un componente de los fosfolípidos de la membrana celular, de fosfoproteínas y ácidos nucleicos (Alberts *et al.*, 2013). En este trabajo, la concentración sérica de fósforo se redujo en los cerdos en EC crónico pero no en EC agudo.

Al igual que para otros minerales, es probable que la reducción en la concentración de este mineral en el suero se asocie a una reducción en su absorción intestinal y renal. De acuerdo con Lumei (1997), el incremento en la tasa de pasaje del alimento en animales en EC crónico puede incrementar la excreción de algunos metabolitos, entre ellos el fósforo.

Morfología intestinal

Se ha documentado que cuando la temperatura ambiental se eleva el flujo de sangre se redistribuye hacia órganos periféricos con el objetivo de disipar calor (Cronjé, 2007). En esta condición, se reduce el aporte de oxígeno y nutrientes a órganos internos como el intestino, lo que ocasiona pérdida de células epiteliales y por tanto acortamiento de vellosidades (Liu *et al.*, 2009). En este trabajo se observó un acortamiento importante en la altura de las vellosidades y en la profundidad de las criptas de yeyuno de los cerdos en EC agudo; así también en los cerdos en EC crónico se continuó observando el acortamiento de vellosidades y criptas en los tres segmentos de intestino delgado.

Igualmente, se ha demostrado que el EC agudo daña y provoca una disminución de la altura de las vellosidades y profundidad de criptas del epitelio de intestino delgado (Yu *et al.*, 2010; Pearce *et al.*, 2013b), tal como se estudió en este trabajo. Además, se observó que después de ocho días en EC el epitelio intestinal de los cerdos no alcanza a recuperarse por completo, aun cuando se conoce que el epitelio de las vellosidades intestinales tienen un ciclo celular regenerativo corto de aproximadamente 48 horas y que las vellosidades del epitelio tienen buena capacidad de reparación (Morini *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2002). Lo anterior podría tener consecuencias nutricionales importantes como una reducción en la capacidad de absorción de nutrientes; pero además podría predisponer a los cerdos a problemas severos como infecciones y diarreas (Pearce *et al.*, 2013a).

Marion *et al.* (2002) mostraron que un 56 % en la variación de la altura de las vellosidades en el intestino delgado se explica por el bajo nivel del consumo de alimento. Lo que en este trabajo pudiera asociarse con la marcada reducción en el consumo de alimento y acortamiento de vellosidades en los animales expuestos a EC.

En el presente estudio la profundidad de las criptas se redujo en EC crónico. Este parámetro indica una menor actividad para la generación de nuevas células en las criptas (Hedemann *et al.*, 2006); lo cual también podría asociarse a la reducción en el consumo de alimento y por tanto, menor disponibilidad de nutrientes para la proliferación y división celular.

La relación altura de la vellosidad: profundidad de la cripta es un criterio útil para estimar la capacidad digestiva e integridad del intestino delgado (Montagne *et al.*, 2003). En este estudio el mantenimiento de la relación altura de las vellosidades: profundidad de cripta sugiere que la reducción en la altura de la vellosidad es menos perjudicial cuando no se encuentra acompañada de un incremento en la profundidad de las criptas.

La atrofia de las vellosidades intestinales generalmente se asocia a una reducida actividad enzimática de la mucosa (Blikslager *et al.*, 2007). Debido a que las células que se pierden son enterocitos maduros, en donde precisamente se encuentran las enzimas digestivas, se ha observado generalmente una disminución de la actividad enzimática de la mucosa en asociación con el EC (Blikslager *et al.*, 2007; Kagnoff, 2014).

Como se ha mencionado antes, el daño al epitelio intestinal puede asociarse con la reducción en el flujo sanguíneo hacia intestino delgado, que ocurrió en los cerdos expuestos a EC (Liu *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2010; Pearce *et al.*, 2013), lo que provoca hipoxia e isquemia en el epitelio (Hinnebusch *et al.*, 2002), y por tanto acortamiento de vellosidades debido a la muerte y desprendimiento de células epiteliales.

Una vez que el factor estresante es retirado o los animales han logrado cierto grado de adaptación, pudo verse un incremento en la proliferación y migración de células intestinales, logrando cierto grado de recuperación en la altura de las vellosidades (Liu *et al.*, 2009).

Mucina

El moco es particularmente importante porque es la primer capa de contacto con el contenido intestinal, el cual comprende a la digesta y a la microbiota intestinal (Corfield *et al.*, 2000). Una de las funciones de la capa de mucina en intestino es crear un hábitat microecológico que protege al organismo de la entrada de toxinas y microorganismos nocivos a través del epitelio (Ganz, 2002; Lievin-Le Moal y Servin, 2006; Chen *et al.*, 2014).

En este trabajo, los cerdos sometidos a EC presentaron un mayor número de células productoras de mucina en el duodeno, en comparación con los animales en confort;

inclusive el incremento en el número de células productoras de moco fue mayor en el duodeno de cerdos en EC crónico. Este efecto no se observó en yeyuno e íleon.

En coincidencia con los resultados del presente trabajo, otros autores han observado un incremento en la expresión de mucina tanto en cerdos expuestos a EC (Pearce *et al.*, 2014), así como también en el íleon de pollos (Ashraf *et al.*, 2013). El incremento en la producción de mucina en las criptas y vellosidades intestinales como medida de protección del epitelio para mantener su permeabilidad y protección podría ser determinante en animales en EC (Lambert, 2009).

En el presente estudio, el número de células caliciformes, productoras de mucina, se incrementó con el tiempo de exposición al calor, lo que podría indicar que los cerdos expuestos a EC fueron más susceptibles al ataque de bacterias patógenas, ya que éstas pueden consumir el moco intestinal como fuente de carbono y por lo tanto alcanzar a romper la barrera intestinal hacia torrente sanguíneo (Chen *et al.*, 2014). Sin embargo, aunque no se observaron signos de infección en los cerdos de este experimento, los resultados obtenidos no pueden comprobar esta hipótesis.

Otros factores que afectan la secreción de moco son el destete y la edad de los animales (Brown *et al.*, 1988; Choi *et al.*, 1991), la composición de la microbiota (Collinder *et al.*, 2002) y la composición de la dieta (Hedemann *et al.*, 2006). Sin embargo, ninguno de ellos fue analizado ni modificado en este trabajo.

Apoptosis

El EC induce apoptosis de enterocitos, la cual tiene un papel muy importante en la fisiología y patofisiología del calor en relación con enfermedad (Gu *et al.*, 2014). Se ha demostrado que la exposición prolongada a temperatura elevada genera un daño celular (Mceleny *et al.*, 2004), lo que impide la correcta función celular, desencadenando la apoptosis de las células (Davies *et al.*, 2001).

Observamos que el número de células en apoptosis en el duodeno y yeyuno no fue afectado por la exposición al calor. Sin embargo, el número de células en apoptosis en epitelio intestinal de íleon de los cerdos expuestos a EC agudo y crónico se incrementaron

al 200 y 800% respectivamente, en comparación con los cerdos en confort ($P < 0.05$). Se ha demostrado que el EC provoca daño y disfunción mitocondrial lo cual pudo haber desencadenado la señalización apoptótica en nuestra investigación (Gu *et al.*, 2014; Hsu *et al.*, 2011).

Los enterocitos diferenciados que regularmente se encuentran en la punta de las vellosidades intestinales son muy sensibles a la reducción en la irrigación sanguínea (Hinnebusch *et al.*, 2002). Además, la regeneración del epitelio requiere una gran cantidad de energía, por lo que en ausencia de ésta es probable observar necrosis y descamación celular, especialmente en la punta de las vellosidades intestinales (Lambert, 2009). Por lo anterior, se puede suponer que en EC, un mayor número de enterocitos entraron en apoptosis a una tasa mayor de la que requiere el epitelio para recuperarse desde las criptas, y por tanto se mantuvo el daño que ya se observaba con la reducción en la altura de vellosidades.

Expresión de proteínas de unión estrecha

Como se ha discutido, el EC daña la mucosa del intestino delgado, lo que puede incrementar su permeabilidad y el paso de toxinas y bacterias patógenas. También se ha hablado que en condiciones normales otro mecanismo de defensa del epitelio es mantener la unión entre los enterocitos mediante uniones estrechas constituidas por proteínas de unión transmembrana (Guttman *et al.*, 2006).

En el presente estudio, la expresión de claudina-2 y ocludina en íleon de los cerdos en EC se redujo al 30 % en comparación con cerdos en confort ($P < 0.05$). Sin embargo, la expresión general de zonoccludina-1 no fue diferente ($P > 0.05$) entre EC (crónico y agudo) y confort. Las claudinas son las proteínas más importantes que definen la permeabilidad de las uniones estrechas. De acuerdo con Escafitt *et al.* (2005) la abundancia de claudinas puede variar considerablemente entre los segmentos intestinales. Es posible que esta variación también esté asociada con la marcada reducción en su expresión observada en el íleon de los cerdos en EC de este trabajo. Ren *et al.*, 2017, reportaron que la claudina 2 y ocludina son antagonistas uno del otro en relación a la función de

barrera intestinal. De tal manera que cuando uno es regulado positivamente, el otro automáticamente es regulado negativamente (Ren *et al.*, 2017).

La expresión de ocludina en EC crónico fue 2.7 y 5.0 veces mayor a la observada en EC agudo en duodeno y yeyuno, respectivamente ($P < 0.05$). La ocludina es blanco frecuente de patógenos durante la infección ya que al ser un elemento central regulador de las uniones estrechas, está sujeto a regulaciones estrictas, y la fosforilación de esta proteína es probablemente la modificación postraduccional más importante que contribuye a su función (Lutgendorff *et al.*, 2008).

En la literatura se reporta que el incremento en la permeabilidad intestinal de cerdos en EC se asocia con reducción de la integridad y expresión de proteínas de unión estrecha zonoccludina y ocludina (Martínez *et al.*, 2012), tal como se observó en los animales expuestos a EC calor agudo de este trabajo.

Para el caso de zonoccludina-1 también se observaron incrementos de 4.4, 9.5 y 6.2 veces en duodeno, yeyuno e íleon, respectivamente, en los cerdos en EC crónico con respecto a su expresión en EC agudo. En general, la disminución en la expresión de zonoccludinas se asocia con el rompimiento de la organización de actina y la pérdida de la distribución normal de contacto célula a célula (Fanning *et al.*, 1998). El incremento en la expresión de ocludina y zonoccludina en los animales expuestos a EC crónico se atribuye a que después de 8 días de exposición a temperatura elevada, los cerdos pudieran haber iniciado la recuperación de su epitelio intestinal. En este caso se esperaría que ocludina comenzara a crear una barrera paracelular vía polimerización lateral en la membrana de los enterocitos para generar una línea continua de adhesión entre células, reorganizando el funcionamiento de las uniones estrechas y la regeneración de la integridad del epitelio intestinal (Furuse *et al.*, 1994).

8. CONCLUSIONES

Los efectos negativos del EC en el consumo de alimento y parámetros productivos fueron mayores durante el EC agudo.

La exposición a ECC disminuyó la concentración del volumen del paquete celular sanguíneo, eritrocitos y hemoglobina.

Las alteraciones en la concentración de glucosa, triglicéridos y nitrógeno en sangre de los animales expuestos a EC, son reflejo de modificaciones en la actividad metabólica y desvío de nutrientes hacia otros mecanismos necesarios para mantener la homeostasis en los cerdos.

La integridad morfológica intestinal se ve comprometida debido a la exposición aguda a EC. Las tres secciones intestinales duodeno, yeyuno e íleon presentaron reducción en la altura de las vellosidades en los expuestos a estrés por calor.

El ECC incrementó las células positivas a la tinción de PAS- AA.

En los enterocitos del íleon se registró incremento de células apoptóticas en los animales expuestos a EC.

El EC agudo y crónico altera de forma diferente la expresión de las proteínas de unión estrecha claudina-2, ocludina y zonoccludina en epitelio intestinal de cerdos en crecimiento.

El adecuado entendimiento de como los cerdos y otros mamíferos responden al EC generará el desarrollo de mejores estrategias de mitigación que ayuden a aliviar los efectos negativos del EC tiene en la producción y salud de los animales.

9. LITERATURA CITADA

- Abbas, A.K., A.H. Litchman y S. Pillai. 2008. Inmunología celular y molecular. 6a ed. Elsevier. Barcelona. 560 p
- Achmadi, J., T. Yanagisawa, H. Sano and Y. Terashima, Y., 1993: Pancreatic insulin secretory response and insulin action in heat-exposed sheep given a concentrate or roughage diet. *Domestic Animal Endocrinology*.10: 279–287.
- Agarwal, A. and S.A Prabhakaran. 2005: Mechanism, measurement and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian Journal of Experimental Biology* 43: 963–974
- Ain Baziz, H., P.A. Yuniat, J.C. Padilha and S. Guillaumin. 1996. Chronic heat exposure enhances fat deposition and modifies muscle and fat partition in broiler carcasses. *Poultry Science* 75: 505–513.
- Alarcón, A.D., J.E. Gamboa y H.J. Vidales. 2008. El papel de las hormonas en el estrés porcino. *Tecnociencia Chihuahua*, 2:72-80
- Alberts B., D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis. M. Raff, K. Roberts and P. Walter. *Essential Cell Biology* (4a edición). Garland Publishing, New York & London (2013).
- Amasheh, S., N. Meiri, A.H. Gitter, T. Schoneberg, J. Mankertz, J.D. Schulzke. 2002. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J. Cell Sci*; 115:4969-76
- Antoni, L., S. Nuding and D. Waller. 2013. Human colonic mucus is a reservoir for antimicrobial peptides. *J Crohns Colitis*. 7: 652-654
- Arce N., G. Castillo, M. Cota, H. García, B.A. Araiza, M. Cervantes and A.Morales. 2013. El estres por calor afecta la respuesta inmune de cerdos destetados desafiados con lipopolisacarido en *Escherichia coli*. *Memorias de la XXIV Reunión Internacional sobre Producción de Carne y Leche en Climas Cálidos*. Mazatlán Sin., p.755-759.
- Arce, N. 2015. Efecto del EC en la respuesta inmune de cerdos desafiados con lipolisacárido de *Escherichia coli*. Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma de Baja California, México
- Arya, R., M. Mallik, and S. C. Lakhotia. 2007. Heat shock genes –Integrating cell survival and death. *J. Biosci*. 32:595–610.

- Ashraf, S., H. Zaneb, M.S. Yousaf, A. Ijaz, M.U. Sohail, S. Muti, M.M. Usman, S. Ijaz and H. Rehman. 2013. Effect of dietary supplementation of prebiotics and probiotics on intestinal microarchitecture in broilers reared under cyclic heat stress. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 97 (1):68-73
- Baile, C.A. and J.M. Forbes. 1974. Control of feed intake and regulation of energy balance in ruminants. *Physiol. Rev.* 54 (1): 160.
- Baumgard, L. H. and R.P. Rhoads. 2007. The effect of hyperthermia on nutrient partitioning. *Proc. Cornell Nutr. Conf.*, 93–104.
- Baumgard, L.H., R.P. Rhoads, M.L. Rhoads, N.K. Gablerm J.W. Ross, A.F. Keating, R.L. Boddicker, S. Lenka and V. Sejian. 2012. Impact of climate change on livestock production. In *Environmental Stress and amelioration in livestock production*, ed. V Sejian, SMK Naqvi, T Ezeji, J Lakritz, R Lal, pp.413-468. New York: Springer
- Baumgard, L.H., and R. Rhoads. 2013. Effects of heat stress on postabsorptive metabolism and energetics. *Annual Review of Animal Biosciences.* 1: 311-337
- Balda, M. and K. Matter. 2008. Tight junctions at a glance. *J. Cell Sci.* 121: 3677-3682
- Baldwin, R. L., N.E. Smith, J.Taylor and M. Sharp. 1980: Manipulating metabolic parameters to improve growth rate and milk secretion. *Journal of Animal Science* 51, 1416–1428.
- Begum, I.U., L.M. Lara Godoy, I. Tarhini, J.G. González. 2015. Minicircuito extracorpóreo es técnica segura y eficaz en cirugía coronaria. *Cirugia Cardiovasculas*, 19 (2):173
- Belay, T., C.J. Wiernusz and R.G. Teeter. 1992. Mineral balance and urinary and fecal excretion profile of broilers housed in thermoneutral and heat distressed environments. *Poultry Science*, 71: 1043-1047
- Belhadj Slimen, I., T. Najar, A. Grhram and M.Abdrabba. 2015. Heat stress effects on livestock: molecular, cellular and metabolic aspects, a review. *J.Anim.Physiol. and Animal Nutrition*, 10: 1-12
- Bellmann, C., S. Schreivoegel, R. Gunther, S. Dabrowski, M. Schumann, H. Wolburg. 2014. Highly conserved cysteines are involved in the oligomerization of occludin-redox dependency of the second extracelular loop. *Antiox Redox Signal*, 20(6):955-67

- Bernabucci, U.; B. Ronchi, N. Lacetera and A. Nardone. 2002. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *J. of Dairy Sci.* 85: 2173–2179.
- Bevins, C. and N. Salzman. 2011. Paneth cells, nto microbial peptides and mantaince of intestinal homeostasis. *Nat. Rev Microbiol.* 9: 356-368
- Bjarnason, I., P. Williams, P. Smethurst, T.J. Peters and A.J. Levi. 1986. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs and prostaglandins on the permeability of the human small intestine. *Gut.* 27: 1292-1297
- Blikslager, A.T., A.J. Moeser, J.L. Gookin and J. Odle. 2007. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev*, 87(2):545-564
- Booth C., and D. Potten. 2000. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J. Clin. Invest.* 105: 1493-1499
- Bouchama, A., and J. P. Knochel. 2002. Heat stroke. *N. Engl. J. Med.* 346:1978–1988.
- Brandtzaeg, P. 1995. Molecular and cellular aspects of secretory immunoglobulin system. *AMPIS*, 103:1-19
- Brown, P.J., B.G. Miller, C.R. Strokes, N.B. Blazquez and F.J. Bourne. 1988. Histochemistry of mucins of pig intestinal secretory epithelial cells before and after weaning. *J. Comp. Pahol*, 98: 313-323.
- Brunsgaard, G. 1997. Morphological characteristics epithelial cell proliferation, and crypt fission in cecum and colon of growing pigs. *Dig. Dis. Sci.* 42: 2384-2393
- Buschmann, M.M., L. Shen, H. Rajapakse, D.R. Raleigh, Y. Wang, A. Lingaraju, J. Zha, E. Abbott, McAuley, L.A. Breskin, L. Wu, K. Anderson, J.R. Turner and C.R. Weber. 2013. Occludin OCEL.domain interactions are required for maintenance and regulation of tight junction barrier to macromolecular flux. *Mol Biol Cel*, 24(19):3056-3068.
- Carneiro, L and L. C. Junqueira. 2017. *Histología Básica*. 14a Ed. Editorial Panamericana. 557 páginas.
- Cerrutti, A., and M. Rescigno. 2008. The biology intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity* 28: 740-750

- Cervantes, M., N: Ibarra, N. Vásquez, F. Reyes, E. Avelar, S. Espinoza and A. Morales. 2017. Serum concentrations of free amino acids in growing pigs exposed to diurnal heat stress fluctuations. *J. of Thermal Biology*, 69: 6975
- Chambers, R. 2012. Ontario Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs.
- Chang, E., and M. Rao. 1994. Intestinal water and electrolyte transport: Mechanisms of physiological and adaptative responses. In: Jhonson LR, ADH. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. 3rd ed. New York: Raven, Lippincott Williams & Wilkins. 2027-2081.
- Chen, x., J. Zhao and H. Gregersen. 2008. The villi contribute to the mechanics in the guinea pig small intestine. *J. of Biomechanics*. 41: 806-812.
- Chen, G.Y., and T.S. Stappenbeck. 2014. Mucus, it is not just a static barrier. *Sci.Signal* 7:323 páginas.
- Cheng. S.Y., L. Wang, X.L. Chen, B.M Shi and A.S. Shan. 2015. Effects of dietary electrolyte balance on the performance plasma biochemistry parameters and immunoglobulin of sows during late gestation and lactation. *Anim. Feed Sci. and Technol.* 200:93-101.
- Chiba, H., M. Osanai, M. Murata, T. Kojima and N. Sawada. 2008. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778:588-600.
- Cho, S.H., S. Young, A.P. Lane, J. Lee, S. Lee, T. Zheng, Z. Zhu. 2014. Regulation of homeostasis and inflammation in mice by SHP-1 and Th2/Th1 signaling pathways. *Plos ONE* 9(8): e103685.
- Choi, S.H., E.T. Kornegay and W.N. Eigel. 1991. Characterization of small intestinal mucus glycoproteins from pigs of various ages. *Comp. Biochem Physiol.* A99:677-680
- Christon, R. 1988. The effect of tropical ambient temperature on growth and metabolism in pigs. *J. Anim. Sci.* 66:3112-3123.
- Climent, S., M. Sarasa, P. Muniesa y R. Latorre. 2005. *Manual de anatomía y embriología de los animales domésticos. Conceptos básicos y datos aplicativos. Sistema circulatorio. Aparato digestivo*. Ed. Acribia SA, Zaragoza

- Coffey, R.D., G.R. Parker and K.M. Laurent. 1995. Feeding growing-finishing pigs to maximize lean growth rate. In ASC-147- Cooperative Extension Service; University of Kentucky College of Agriculture: Lexington, KY, USA.
- Colditz, I.G. 2002. Effects of the immune system on metabolism: implications for production and disease resistance in livestock. *Livest. Prod. Sci.* 75: 257-268
- Collin, A., J.van Milgen, S. Dubois, and J. Noblet. 2001. Effect of high temperature and feeding level on energy utilization in piglets. *J. Anim. Sci.* 79:1849-1857.
- Collinder, E., M.E. Cardona, H. Kozakova, E. Norin, S. Stern and T.Midtvat. 2002. Biochemical intestinal parameters in pigs reared outdoors and indoors, and in germ-free pigs. *J. Vet. Med. A Physiol. Pathol. Clin. Med.* 49:203-209
- Cording, J., S. Fritzsche, J. Cording, S. Ritchie, J. Hartwig, M. Walter. 2011. Elucidating the principles of the molecular organization of the heteropolymeric tight junction strands. *Cell Mol Life Sci*, 68 (23):3903-18
- Corfield, A.P. 2000. Glycoprotein methods and protocols: The mucins. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Corr, S., C. Gahan and C. Hill. 2008. M-cells: Origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immuno Med Microbiol.* 52:2-12
- Cronjé, P.B. 2007. Gut health, osmoregulation and resilience to heat stress in poultry. *Australian Poultry Science Symposium* 9-13.
- Cunningham, J.G. 2014. *Fisiología Veterinaria (5ta edición)*. Ed. Elsevier. México, D.F. 624 páginas
- Curtis, T.R., J. Schindelin, M.C. Hiner, B.E. DeZonia, A.E. Walter, E.T. Arena, K.W. Eliceiri. 2017. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics.* 18: 529
- Dallaire, S., R. Drolet and D. Brodeur. 1996. Sow mortality associated with high ambient temperatures. *Can. Vet. J. Rev. Can.* 37:237-239
- Dantzer, R., O'Connor, J.C. Freund, G.G. Freund and K.W. Kelley. 2008. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci*, 9(1): 46-56.

- Das, R., S. Lalrendpuii, V. Nishat, B. Phranay, J. Saika, and R. Kumar. 2016. Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review, *Veterinary World*, 9(3): 260-268
- Davies, K.J. 2001. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*.83: 301-310
- Deb, R., B. Sajjanar, U. Singh, S. Kumar, R.Singh, G. Sengar and A. Sharma. 2014. Effect of heat stress on the expression profile of Hsp90 among Sahiwal (*Bos indicus*) and Frieswal (*Bos indicus* x *Bos taurus*) breed of cattle: A comparative study. *Gene*. 536(2): 435-440.
- De Conto, C., A. Oevermann, I.A. Burgener, M.G. Doherr and J.W Blum. 2010. Gastrointestinal tract, mucosal histomorphometry and epithelial cell proliferation and apoptosis in neonatal and adult dogs. *J. Anim. Sci.* 88:2255-2264
- Dhabhar, F.S. 2003. Stress-induced augmentation of immune function the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokine. *Brain Behav. Imm*, 16: 785-798
- DiFiore, M. 2005. Atlas de Histología. Ed. Ateneo. Buenos Aires. 457 páginas
- Downing, J.E. G. and J.A. Miyan. 2000. Neural immunoregulation: emerging roles for nerves in immune homeostasis and disease. *Immunol. Today*. 21: 281-289.
- Downs, C.A. and S.A. Heckathorn. 1998. The mitochondrial small heat shock protein protects NADH: ubiquinone oxido-reductase of the electron transport chain during heat stress in plants. *FEBS Letters*, 430: 246-250.
- Driscoll, J.O. and J.P. Ryan. 1978. A modified haematoxylin and eosin stain for histological sections of lymph nodes. *J.Clin. Pathol.* 31:700
- Du, J.; H.S. Di, L. Guo, Z.H. Li and G.L Wang. 2008: Hyperthermia causes bovine mammary epithelial cell death by a mitochondrial-induced pathway. *Journal of Thermal Biology*. 33, 37–47.
- Dunlop, R.H. and C.H. Malbert. 2007. *Fisiopatología Veterinaria*. 1a ed. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza (España). 556 p
- Duo, Y., Y. Fan, J. Zhao and H. Gregersen. 2006. Longitudinal residual strain and stress-strain relationship in rat small intestine. *Bio Medical Engineering OnLine*, 5: 37.
- Elphick, D. and Y. Mahida. 2005. Paneth cells: Their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut*. 54: 1802-1809

- Escaffit F., F. Boudreau and J. Beaulieu. 2005. Differential expression of claudin in differentiating cells. *J Cell Physiol.*203:15-26.
- Fanning, A.S., B.J.Jameson, L.A. Jesaitis and J.M Anderson. 1998. The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Bio Chem:* 273: 29745-29753
- Fanning, A.S. L.L Mitic and J.M. Anderson. 1999. Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J. Am Soc Nephrol.* 10: 1337-1345.
- Fasano, A. 2011. Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer. *Physiol Rev.* 91 (1):151-175.
- Feige, U., and B. S. Polla. 1994. Hsp70 – A multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. *Experientia* 50:979–986.
- Flemström G., and M. Sjöblom. 2005. Epithelial cells and their neighbors. New perspectives on efferent signaling between brain, neuroendocrine cells, and gut epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol-* 289: G377-G380
- Funke, L., S. Dakoji and D.S. Bredt. 2005. Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity. *Annu Rev Biochem.*, 74:219:245
- Furness J. 2000. Types of neurons in the enteric nervous system. *J Auton Nerv Syst.* 81:87-96
- Furuse, M, T. Hirase, M. Itoh, A. Nagafuchi, S. Yonemura and S. Tsukita. 1993. Occludin: A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123: 1777-1788
- Furuse, M., M. Itoh, T. Hirase, A. Nagafuchi, S. Yonemura and S. Tsukita. 1994. Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol.* 127:1617-1626
- Gandhi, S., M.M. Devi, P. Rana, S. Pal, R. P. Tripathi and S. Khshu. 2011. Urinary metabolic profiling in rats due to heat exposure using ¹H high resolution NMR spectroscopy. *Journal of Metabolomics and Systems Biology* 2: 1–9.
- Ganz, T. 2002. Epithelia: Not just physical barriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:3357-3358

- Geraert, P. A., J. C. Padilha and S. Guillaumin. 1996: Metabolic and endocrine changes induced by chronic heat exposure in broiler chicken: growth performance, body composition and energy retention. *British Journal of Nutrition* 75: 195–204
- Gill, N., M. Wlodarska and B. Finlay. 2011. Roadblocks in the gut: Barriers to enteric infection. *Cell Microbiol.* 13:660-669
- Gonzalez-Esquerria, R. and S. Leeson. 2005. Effects of acute versus chronic heat stress on broiler response to dietary protein. *Poultry Science.* 84: 1562–1569.
- Göke M., M. Kanai and D. Podolsky. 1998. Intestinal fibroblast regulate intestinal epithelial cell proliferation via hepatocyte growth factor. *Am J. Physiol.* 274: G809- G818
- Gu, Z.T., H. Wang, L. Li, Y.S. Liu, X. B. Deng, S.F.Huo, F.F. Yuan, Z.F. Liu, H.S. Tong and L. Su. 2014. Heat stress induces apoptosis through transcription-independent p53-mediated mitochondrial pathways in human umbilical vein endothelial cell. *Sci. Rep.* 4, 4469
- Guttman, J.A., M.E. Wickham, W. Deng, A.W. Vogl and B.B. Finlay. 2006. Attaching and effacing pathogen-induced tight junction disruption in vivo, *Cell Microbiol.* 8(4):634-45
- Hargaden, M. and L. Singer. 2012. *Anatomy, Physiology and Behavior. The Laboratory rabbit, guinea pig, hamster and other rodents.* Elsevier Inc
- Harr, K.E. 2002. Clinical chemistry of companion avian species: A review. *Vet Clinic Pathol.* 31 (3):140-151.
- Harsock A., and W. Nelson. 2008. Adherents and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Bioch Biophys Acta.* 1778:660-9.
- Haseloff, R.F., S. Dithmer, L. Winkler, H. Wolburg and I.E. Blasig. 2015. Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: Structural and functional aspects. *Seminars in Cell & Developmental Biology,* 38: 16-25.
- Hashimoto, K., T. Oshima, T. Tomita, Y. Kim, T. Matsumoto, T. Joh and H. Miwa. 2008. Oxidative stress induces gastric epithelial permeability through claudin-3. *Biochem Biophys Res Commun;* 378: 154-7
- He, F.L. and J. G. Xiang. 2009. Influence of water temperature on blood-sugar content in blood serum of *rainbow trout*. *Genom. Appl. Biol.* 28, 745-747.

- Heath, M.E. 1983. The effects of rearing- temperature on body composition in young pigs. *Comp. Bioche, Physiol.* 76: 363-66
- Hedemann, M.S., M. Eskildsem H.N. Laerke, C. Pedersen, J.E. Lindberg, P. Laurinen and K.E. Bach Knudsen. 2006. Intestinal morphology and enzymatic activity in newly weaned pigs fed contrasting fiber concentrations and fiber proprieties. *J. of Anim. Sci.* 84: 1375-1386.
- Henderson, B., and M. Wilson. 1998. Commensal communism and the oral cavity. *J. of Dental Researcch*, 9: 1674-1683
- Herd, T. Digestao e absorcao: os processos nao fermentativos. In: CUNNINGHAM, J.G. *Tratado de fisiologia veterinária 3ed* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. P-263-287.
- Hinnebusch, B.F., Q. Ma, J.W: Henderson, A. Siddique, S.Y. Archer and R.A. Hodin. 2002. Enterocyte response to ischemia is dependent on differentiatios state. *J. Gastrointest. Surg.* 6:403-409.
- Hooda, S., J.J. Matte, T. Vasanthan and R.T. Zijlstra. 2010. Dietary purified oat β -glucan reduces peak glucose absorption and portal insulin release in portal- vein catheterized pigs. *Livestock Science*, 134: 15-17
- Horowitz, M.L., L. Eli-Berchoer, I. Wapinski, N. Friedman and 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.
- Horton, H., L. Moran. K. Gray, M. Perry and J. Rawn. 2008. *Principios de Bioquímica. 4a Edición.* Pearson Educación, México. ISBN: 978-970-25-1025-0. 976 páginas
- Hosoyamada, Y. and T. Sakai. 2005. Structural and mechanical architecture of the intestinal villi and crypts in the rat intestine: integrative reevaluation from ultrastructural analysis. *Anatomy and Embryology (Berlin)* 210:1-12
- Huynh, T.T.T., A.J.A. Aarnink, M.W.A. Verstegen, W.J.J.Gerrits, M.J.W. Heetkamp, B. Kemps and T.T Canh. 2005. Effects of increasing temperatures on physiological changes in pigs at different relative humidities. *J. of Anim. Sci.* 83: 1385-1396.

- Hyun, Y., M. Ellis, G. Riskowski and R.W. Johnson. 1998. Growth performance of pigs subjected to multiple concurrent environmental stressors. *J. Anim. Sci.* 76: 721-727.
- Hsu, Y.L., h.S. Yu, H.C. Lin, K.Y. Wu, R.C. Yang and P.L. Kuo. 2011. Heat shock induces apoptosis through reactive oxygen species involving mitochondrial and death receptor pathways in corneal cells. *Exp. Eye Res.*93:405-412.
- Ishizaki, T., H. Chiba, T. Kojima, M. Fujibe, T. Soma, H. Miyajima. 2003. Cucllic AMP induces phosphorylation of claudin-5 immunoprecipitates and expression of claudin-5 gene in blood- brain barrier endothelial cells via protein kinase A-dependent and – independent pathways. *Exp Cell Res*, 290(2): 275-88
- Itoh, F., Y. Obara, M.T. Rose, H. Fuse and H. Hashimoto. 1998. Insulin and glucagon secretion in lactating cows during heat exposure. *J. of Anim. Sci.*76: 2182–2189.
- Ithon, M., M. Furuse, K. Morina, K. Hubota, M. Saitou and S. Tsukita. 1999. Direct binding of three tight junction-associated MMAGUKs, ZO-1, ZO-2 and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J. Cell Biol.* 147: 1351-1363
- Jacob, S. T. 1995. Regulation of ribosomal gene transcription. *Biochemistry Journal* 306: 617–626.
- Jung, K., B. Eyerly, T. Annamalai, Z. Lu and L.J. Saif. 2015. Structural of tight and adherens junctions in villous and crypt epithelium of the small and large intestine of conventional nursing piglets infectes with porcine epidemic diarrhea virus. *Veterinary Microbiology.* 177: 373-378
- Junqueira, L.C., and J. Carneiro. O trato digestivo. In *Histologia básica.* 11 ed Rio de Janeiro: Guanabara Kooga, 2011. 556 páginas.
- Kagnoff, M.F. 2014. The intestinal epithelium is an integral component of a communications network. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(7): 2841-2843
- Katsumata, M., H. Yano, N. Ishida and A. Miyazaki. 1990. Influence of high ambient temperature and administration of clenbuterol on body composition in rats. *J. of Nutritional Scie. And Vitaminology.* 36: 569-578.
- Kaur, H., and B. Halliwell. 1994: Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation: nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Letters* 350: 9–12.

- König, H.E., and H.H. Liebich. 2005. Anatomía de los animales domésticos: texto y atlas en color. Madrid: Médica Panamericana.
- Kumar, A., G. Singh, B.V. Sunil Kumar, S.K. Meur. 2011. Modulation of antioxidant status and lipid peroxidation in erythrocyte by dietary supplementation during heat stress in buffaloes. *Livestock Science* 138: 299–303.
- Lambert, G.P., R. Murray, D. Eddy, W. Scott, R. Laird, and C.V. Gisolfi. 1999. Intestinal permeability following the 1998 Ironman triathlon. *Med. Sci.Sports Exerc.* 31: S318(Abstr)
- Lambert, G.P., C.V. Gosilfi, D.J. Berg, P.L. Moseley, L.W. Oberley and K.C. Kregel. 2002. Selected contribution: Hypertermia-induced intestinal permeability and the role of oxidative and nitrosative stress. *J.Appl. Physiol.* 92:1750-1761
- Lambert, G.P. 2009. Stress induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. *J. Anim. Sci.* 87: E101-E108
- Lamps, L.W. 2007. Infective disorders of the gastrointestinal tract. *Histopathology*, 50: 55-63.
- Le Bellego L., J. van Milgen and J. Noblet. 2002. Effect of high temperature and low-protein diets on the performance of growing-finishing pigs. *J. Anim. Sci.* 80:691-701
- Le Dividich, J., Noblet, J., Herpin, P., van Milgen, J., Quiniou, N., 1998. Thermoregulation. In: Wiseman, J., Varley, M.A., Chadwick, J.P. (Eds.), *Proc. of the 58th Easter School in Agricultural- Science, Progress in Pig Science*, Nottingham University Press, pp. 229–264.
- LeDoux, S. P., W.J. Driggers, B. S. Hollensworth and G.L. Wilson.1999: Repair of alkylation and oxidative damage in mitochondrial DNA. *Mutation Research* 434:149–159.
- Le Floch N., A. Wessels, E. Corrent, G. Wu, P. Bosi. 2018. The relevance of functional amino acids to support the health of growing pigs. *Animal Feed Science and Technol.* 245: 104-116.
- Lence. W.I., G. Cheung and G. Strohmeir. 1997. Induction of epithelial chloride secretion by channel-forming cryptidins 2 and 3. *Proc Natl Acad Sci USA.*94:8585-8580

- Leon, L.R., D.A. DuBose and C.W. Mason. 2005. Heat stress induces a biphasic thermoregulatory response in mice. *Am. J. Physiol.* 288: R197–R204.
- Lewis, A.J. and L. Lee Southern. 2000. *Swine Nutrition, Second Edition*. ISBN 9781420041842. 1032 páginas
- Li, Qingyun, Patience, John F. 2017. Factors involved in the regulation of feed and energy intake of pigs. *Anim. Feed Sci and Technol.* 13: 1-12.
- Lievin-Le Moal, V., and A. L. Servin. 2006. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: Mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.* 19: 315-337.
- Lim, C.L., C. Byrne and J.K. Lee. 2008. Human thermoregulation and measurement of body temperature in exercise and clinical settings. *Ann. Acad. Med. Sing.* 37, 347-353.
- Lin, H., R. Du, R., X.H.Gu, F.C. Li and Z.Y. Zhang. 2000. A study of the plasma biochemical indices of heat stressed broilers. *Asian- Australas Journal of Animal Science* 13: 1210–1218.
- Liochev, S. I. and I. Fridovich. 1999: Superoxide and iron: partners in crime. *IUBMB Life* 48: 157–161.
- Liu, F., J.Yin, M.Du, P. Yan, J. Xu, X. Zhu and J. Yu. 2009. Heat-stress-induced damage to damage to porcine small intestine epithelium associated with down regulation regulation of epithelial growth signaling. *J.Anim.Sci.*87:1941-1949.
- Livak, K.J. and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402-408.
- Lord-Fontaine, S. and D.A. Averill-Bates. 2002. Heat shock inactivates cellular antioxidant defense against hydrogen peroxide: protection by glucose. *Free Radical Biology & Medicine* 32: 752–765.
- Lu, Q., J. Wen and H. Zhang. 2007. Effect of chronic heat exposure on fat deposition and meat quality in two genetic types of chicken. *Poultry Science.* 86: 1059-1064.
- Lumei, J.T. 1997. Avian clinical biochemistry. En: J.J. Kaneko J.W. Harvey, M.L. Bruss, editors. *Clinical biochemistry of domestic animals*. 5a ed. San Diego, CA: Academic Press, p. 857-879.

- Lutgendorff, F., L.M. Akkermans and J.D. Soderholm. 2008. The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastro-intestinal damage. *Curr. Mol. Med.* 8(4): 282-298.
- Manteca, X. 1999. *Bienestar animal. Anaporc*, 188: 87-97
- Marai, I.F.M., A.A. El Darawany, A. Fadiel, M.A.M. Abdel Hafez. 2007. Physiological traits as affected by heat stress in sheep traits as affected by heat stress in sheep: a review. *Small Ruminant Research.* 71:1-12
- Marion, J., M. Biernat, F. Thomas, G. Savary, y. Breton, R. Zabielski, I. Le Huerou-Luron and J. Le Dividich. 2002. Small intestine growth and morphometry in piglets weaned at 7 days of age. Effects of level of energy intake. *Reprod Nutr Dev*, 42: 339-354.
- Martínez, C., B. Lobo, M. Pigrau, L. Ramos, A.M. González Castro, M. Guilarte, M. Guilarte, M. Guilá, I. de Torres, F. Azpiroz, J. Santos and M. Vicario. 2012. Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome: An organic disorder with structural abnormalities in the jejunal epithelial barrier. *Gut*, 62: 1160-1168
- McDowell LR. Iron. In: *Minerals in animal and human nutrition*. San Diego, USA: Academic Press, Inc. 1992.p 152-75
- McEleny, K., R. Coffey, C. Morrissey, J.M. Fitzpatrick and R.W. Watson. 2004. Caffeic acid henethyl ester. Induced PC-3 cell apoptosis is caspase-dependent and mediated through the loss of inhibitors of apoptosis proteins. *BJU Int*; 94(3):402-406
- Méndez, V., E. Avelar, A. Morales, M. Cervantes, A. Araiza and D. González. 2011. A rapid protocol for purification of total RNA for tissues collected from pigs at a slaughterhouse. *Genet. Mol. Res.* 10:3251-3255
- Milatz, S., S.M. Krug, R. Rosenthal, D. Gunzel, D. Muller, J.D. Schulzke. 2010- Claudin 3 acts as a sealing component of the tight junction for ions of either charge and uncharge solutes. *Biochim Biophys Acta Biomembr*; 1798(11):2048-57
- Miller, H., J. Zhang, R. Kuolee, G.B. Patel and W. Chen. 2007. Intestinal M cells: the fallible sentinels. *World J Gastroenterol.*13: 1477-14876

- Miova, B., S. Dinevska-Kjovkarovska, F.Cvetkovska, S.Mitev, A. Dzimrevska and M. Dimitrivska. 2013. Liver carbohydrate metabolism in rats in the period of recovery after acute heat stress. *Macedonian Journal of Medical Sciences* 15, 16–23.
- Mizzen, L. A., and W. J. Welch. 1988. Characterization of the thermotolerant cell. I. Effects on protein synthesis activity and the regulation of heat-shock protein 70 expression. *J. Cell Biol.* 106:1105–1116.
- Moeser, A.J., L.B. Borst, B.L. Overman, and J.S. Pittman. 2012. Defects in small intestinal epithelial barrier function and morphology associated with peri-weaning failure to thrive syndrome (PFTS) in swine. *Res. Vet. Sci.* 93: 975- 982
- Montagne, L., J.R. Pluske and D.J. Hampson. 2003. A review of interactions between dietary fibre and the intestinal mucosa, and their consequences on digestive health young-non ruminant animals. *Anim. Feed Sci. Technol.* 108: 95-117
- Moore, C.E., J. K. Kay, M.J. VanBaale, R.J. Collier and L.H. Baumgard. 2005. Effect of conjugated linoleic acid on heat stressed Brown Swiss and Holstein cattle. *J. of Dairy Science.* 88:1732-1740.
- Morales, A., F. Grajeola, H. García, N. Arce, B. Araiza, J. Yañez and M. Cervantes. 2014. Performance, serum amino acid concentration and expression of selected genes in pair-fed growing pigs exposed to high ambient temperatures. *J. Anim Physiol Anim Nutr (Berl).* 98:928-935
- Morales, A., L. Buenabad, E. Avelar, H. Bernal, L. Baumgard and M. Cervantes. 2015. Effect of heat stress on the endogenous intestinal loss of amino acids in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 94: 165-172.
- Morales, A., M. Pérez, P. Castro, N. Ibarra, H. Bernal, L.H. Baumgard, M. Cervantes. 2016a. Heat stress affects the apparent and standardized ileal digestibilities of aminoacids in growing pigs. *J. Anim Sci.* 94:3363-3369.
- Morales, A., S.E.M. Cota, N.O. Ibarra, N. Arce, J. K. Htoo, M. Cervantes. 2016b. Effect of heat stress on the serum concentrations of free aminoacids and some of their metabolites in growing pigs. *J. Anim Sci.* 94:2835-2842
- Morera, P., L. Basirico, K. Hosoda and U. Bernabucci. 2012. Chronic heat stress upregulates leptin and adiponectin secretion and expression and improves leptin,

- adiponectin and insulin sensitivity in mice. *Journal of molecular endocrinology*. 48, 129–138.
- Morini, S., W. Yacoub and C.Rastellini. 2000. Intestinal microvascular patterns during hemorrhagic shock. *Dig. Dis. Sci.* 45:710-722
- Morrison, S.F. 2016. Central control of body temperature. *F1000Res*.5, pii:F1000 Faculty Rev-880
- Morrow- Tesch, J.L., J.J McGlone and J.L Salak-Johnson. 1994. Heat and social stress effects on pig immune measures. *J Anim Sci.* 72 (10): 2599-609
- Mowat, A.M., and J.L. Viney. 1997. The anatomical basis of intestinal of intestinal immunity. *Immunol Rev.* 156: 145-166
- Muller, S.L., M. Portwich, A. Schidt, D.I. Utepbergenov, O. Huber, I.E. Blasig. 2005. The tight junction protein occludin and the adherens junction protein alpha catenin share a common interaction mechanism with ZO-1. *J. Biol Chem.*, 280(5):3747-56.
- Nabuurs, M.K.A., A. Hoogendoorn, E.J. Van Der Molen and A.L.M. Van Osta. 1993. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs reared under various circumstances in the Netherlands *Res Vet Sci*, 55: 78-84
- Neish, A. 2009. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*. 136: 65-90
- NOAA/ National Weather Service. 2017. National Centers for Enviromental Prediction Weather. http://www.nws.noaa.gov/os/heat/heat_index.shtml
- NRC. 2012. Nutrient requirements of swine. 12th ed. Natl Acad. Press, Washington, DC.
- Numbhakdi-Craig, V., T. Machleidt, E. Orgis, D. Belloto, C.L. White, E. Sontag. 2002. Protein phosphatase 2^a associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex. *J. Cell Biol*: 158(5):967-78
- Nyachoti, C.M., R.T. Zijlstra, C.F.M. de Lange and J.F. Patience. 2004. Voluntary feed intake in swine: a review of the main determining factors and potential approaches for accurate predictions. *Can. J. Anim. Sci.* 84: 549-566
- Obled, C., I. Papet and B. Breuillé. 2002. Metabolic bases of amino acid requirements in acute diseases. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 5, 189-197

- O'Brien, M. D., R.P. Rhoads, S.R. Sanders, G.C. Duff, G. C. and L.H. Baumgard. 2010. Metabolic adaptations to heat stress in growing cattle. *Domestic Animal Endocrinology*. 38: 86–94.
- Ochoa, M.L.I. 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Diario Oficial de la Federación, México (DF), México*.
- Ooué, A., T. Ichinose, Kuwahara, A.K.M. Shamsuddin, Y. Inoue, T. Nishiyasu, S. Koga and N. Kondo. 2007. Changes in blood flow in a conduit artery and superficial vein of the upper arm during passive heating in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* 101, 97-103.
- Oyake, J., M. Otaka, T. Matsushashi, M. Jin, M. Odashima, K. Komatsu, I. Wada, Y. Horikawa, R. Ohba, and N. Hatakeyama. 2006. Over-expression of 70-kDa heat shock protein confers protection against monochloramine-induced gastric mucosal cell injury. *Life Sci.* 79:300–305.
- Palmer, C., E. Bik, D. Guilio, D.B. DiGiulio, D.A. Relman and P.O Brown. 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.* 5: e177
- Pandey, N., N. Kataria, K. Kumar, A. Joshi, L. Narayan Sankhala, S. Asopa, R. Pachaury. 2012: Extreme ambiances *vis-a-vis* endogenous antioxidants of Marwari goat from arid tracts in India. *ELBA Bioflux* 4, 29–33.
- Pals, K.L., R.T. Chang, A.J. Ryan and C.V. Gisolfi. 1997. Effect of rung intensity on intestinal permeability. *J. Appl. Physiol.* 82:571-576
- Park, S.H., S.J. Lee, H.Y. Chung, T.H. Kim, C.K. Cho, S.Y. Yoo and Y.S. Lee. 2000. Inducible heat-shock protein 70 is involved in the radioadaptive response. *Radiat. Res.* 153: 318-326
- Pearce, S. C., N.C. Upham, A.J. Harris, N.K. Gabler, J.W. Ross, R. Rhoads and L.H. Baumgard. 2011. Effects of heat stress on energy metabolism in growing pigs. *FASEB Journal* 25, 1052 (Abstr.).
- Pearce, S. C., N.K. Gabler, J.W. Ross, J. Escobar, J. F. Patience, R. P. Rhoads and L.H. Baumgard. 2013a. The effects of heat stress and plane of nutrition on metabolism in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 91:2108-21128.

- Pearce, S. C., V. Mani, R.L. Boddicker, J.S. Johnson, T.E. Weber, J.W. Ross, R.P. Rhoads, L.H. Baumgard and N.K. Gabler. 2013b. Heat stress reduces intestinal barrier integrity and favors intestinal glucose transport in growing pigs. *PLoS ONE* 8(8):e70215
- Pearce, S.C., M.V. Sanz- Fernandez, J.H. Hollins, L.H Baumgard and N.K. Gabler. 2014. Short-term exposure to heat stress attenuates appetite and intestinal integrity in growing pigs. *J.Anim.Sci.*92:5444-5454.
- Pierzchalski, P., A. Krawiec, A. Ptak-Belowska, A. Baranska, S. J.Konturek, and W. W. Pawlik. 2006. The mechanism of heatshock protein 70 gene expression abolition in gastric epithelium caused by *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 11:96–104.
- Piontek, J.S., Fritzsche, J. Coding, S. Ritcher, J. Hartwig, M. Walter.2011. Elucidating the principles of the molecular organization of heteropolymeric tight junction strands. *Cell Mol Life Sci*; 68 (23):3903-18
- Pluske, J.R., D.J. Hampson, I.H. Williams. 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livestock Production Science Amsterdam*, 51:215-236
- Pluske, J.R. 2001. Morphological and functional changes in the small intestine of the newly-weaned pig. Pages 1-27 in A.Piva, K.E. Bach Knudsen, and J.E. Lindberg, ed. *Gut Environment of Pigs*. Nottingham Univ. Press, Nottingham, UK.
- Pott J., and M. Hornef. 2012. Innate immune signaling at the intestinal epithelium in homeostasis and disease. 13: 684-698
- Prosser, C., K. Stelwagen, R. Cummins, P. Guerin, N. Gill and C. Milne. 2004. Reduction in heat in rats by bovin colostrum and goatmilk powders. *J. Appl. Physiol.* 96: 650-654
- Punder, K., and L. Pruimboom. 2015. Stress induces endotoxemia and low-grade inflammation by increasing barrier permeability. *Hypothesis and theory.* 6: 223
- Qin, X., F. Caputo and D. Xu. 2008. Hydrophobicity of mucosal surface and its relationship to gut barrier function. *Shock.* 29: 372-376

- Quinion, N., J. Noblet, J. van Milgen and S. Dubois. 2001. Modelling heat production and energy balance in group-housed growing pigs exposed to cold or hot ambient temperatures. *Br. J. Nutr.* 85: 97-106
- Raikwar, N.S., A. Vandewalle and C.P. Thomas. 2010. Nedd4-2 interacts with occludin to inhibit tight junction formation and enhance paracellular conductance in collecting duct epithelia. *Am. J. Physiol Renal Physiol.* 299(2):F436-44
- Ramirez, S.H., S.S. Fan, H. Dykstra, S. Rom, A. Mercer and N.L. Reichenbach. 2013. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 beta promotes tight junction stability in brain endothelial cells by half-life extension of occludin and claudin-5. *PLOS ONE*; 8(2).
- Ren, X., Y. Zhu, Y. Gamallat, S. Ma, G. Chiwala, A. Meyiah and Y. Xin. 2017. *E. coli* O124 K72 alters the intestinal barrier and the tight junction's proteins of guinea pig intestine. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 94: 468-473
- Renaudeau, D., C. Anais, L. Tel and J.L. Gourdine. 2010. Effect of temperature on thermal acclimation in growing pigs estimated using nonlinear function. *J. of Anim. Sci.* 88:3715-3724
- Rhoads, J.M. and G. Wu. 2009. Glutamine, arginine and leucine signaling in the intestine. *Amino Acids*, 37:111-122.
- Ross, M.H and W. Pawlina. *Histología: Texto y Atlas color con biología celular y molecular*. Ed. Lippincott Williams & Williams 7a edición. ISBN. 9788416004966
- Rothfus, L.P. 1990. The Heat Index "Equation" (or, more than you ever wanted to know about heat index). Technical attachment
- Roti, J. L. 2008. Cellular responses to hyperthermia (40–46°C): Cell killing and molecular events. *Int. J. Hyperthermia* 24:3–15.
- Rubbo, H., R. Radi, M. Trujillo, R. Telleri, B. Kalyanaraman, S. Barnes, M. Kirk and B.A. Freeman. 1994. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J. of Biol. Chem.* 269: 26066–26075.
- Sakakibara A., M. Furuse, M. Saitou Y. Ando-Akatsuka and S. Tsukita. 1997. Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol.* 137: 1393-1401

- Salvo-Romero, E., C. Alonso Cotoner, C. Pardo Camacho, M. Casado Bedmar y M. Vicario. 2015. Función barrera intestinal y su implicación en enfermedades digestivas. *Rev. Esp Enfer Dig.* 107 (11): 686-696
- Salzman N., K. Hung and D. HArribhai. 2010. Enteric defensins are essential regulators of intestinal microbial ecology. *Nat Immunol.* 11(1): 76-83.
- Sanders, S. R., L.C. Cole, K.L. Flann, L.H. Baumgard and R.P. Rhoads. 2009. Effects of acute heat stress on skeletal muscle gene expression associated with energy metabolism in rats. *FASEB Journal* 23, 598 (Abstr.).
- Sarker, S., and K. Gyr. 1992. Non-immunological defense mechanisms of the gut. *Gut.* 33 (7):987-993
- Schmidt, P. and E.M. Widowson. 1967. Effect of a low- protein diet and cold environment on calorie intake and body composition in the rat. *British Journal of Nutrition*, 221: 457-465.
- Schneeberger, E.E., and R.D. Lynch. 2004. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol.* 286: C1213- 1228.
- Schulzke, J. and M. Fromm. 2009. Tight junctions: Molecular structure meets function. *Ann N Y acad Sci.* 1165: 1-6
- Schwartz, G., Rhoads, M.L., VanBaale, M. J., Rhoads, R. P., Baumgard, L. H. 2009. Effects of supplemental yeast culture in heat- stressed lactating Holshtein cows. *J. of Dairy Science.* 92: 935-942.
- Sengupta, A. and R.K.Sharma. 1993. Acute heat stress in growing rats: effect on small intestinal morphometry and *in vivo* absorption. *J. of Thermal Biology.*18: 145-151.
- Settivari, R. S., J.N. Spain, M.R. Ellersieck, J.C. Byatt, R.J. Collier and D.E. Spiers. 2007. Relationship of thermal status to productivity in heat-stressed dairy cows given recombinant bovine somatotropin. *Journal of Dairy Science* 90: 1265–1280.
- Shivakumar, A.V.N., G. Sigh and V.P. Varshney.2010. Antioxidants supplementation on acid base balance during heat stress in goats. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 23(11), 1462-1468.
- Simmons, J. D., B.D. Lott and J.D. May. 1997. Heat loss from broiler chickens subjected to various air speeds and ambient temperatures. *Applied Engineering in Agriculture* 13, 665–669.

- Soderholm, J.D., and M.H. Perdue. 2001. Stress and the gastrointestinal tract II. Stress and intestinal barrier function. *Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280: G7-G13
- Sonna, L.A., J. Fujita, S.L. Gaffin and C.M. Lilly. 2002. Molecular biology of thermoregulation invited review: Effects of heat and color stress in mammalian gene expression. *J. Appl. Physiol.*92:1725-1742.
- Soraci, A.L., F. Amanto, R. Harkes, D.S. Pérez, G. Martínez, S.N. Dieguez and M.O. Tapia. 2010. Uso estratégico de aditivos: Impacto sobre el equilibrio y salud gastrointestinal del lechón. *Analecta Vet*, 30(1):42-53
- Srikandakumar, A., E.H. Johnson and O. Mahgoub. 2003. Effect of heat stress on respiratory rate, rectal temperature and blood chemistry in Omani and Australian Merino sheep. *Small Rumin. Res.* 49, 193-198.
- Stadtman, E. R. and R.L. Levine. 2000: Protein oxidation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 899: 191–208.
- Steadman, R.G. 1979. The assessment of sultriness. Part I: A temperature-humidity index based on human physiology and clothing science. *J. Appl. Meteor.*, 18:861-873
- Streffer, C.1988: Aspect of metabolic change in hyperthermia. *Recent Results in Cancer Research* 197: 7–43.
- Su, C.W., Y. Cao, J. Kaplan, M. Zhang, W. Li, M. Conroy, W.A. Walker and H.N. Shi. 2011. Duodenal helminth infection alters barrier function of the colonic epithelium via adaptative immune activation. *Infect. Immun.* 79: 2285-2294.
- Suradhat, S. 2005. Relationships between the immune system and stress reactivity in pig: Visualizing the immune-neuroendocrine framework in action. *TJVM* 36(1):9-18.
- Sutherland, M.A., S.R. Niekamp, S.L Rodriguez-Zas and J.L Salak-Johnson.2006. Impacts of chronic stress and social status on various physiological and performance measures in pigs of different breeds. *J.Anim.Sci.*84:588-596.
- Suzuki. T. 2013. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell. Mol. Life. Sci.* 70:631-659
- Szendrő, S. 2008. Improving of reproductive performance of rabbit does in small and medium scale rabbit farms. Recommendations for developing countries. *Acta Agraria Kaposváriensis* 12, 1–23.

- Tabiri, H. Y., K. Sato, K. Takahashi, M. Toyomizu and Y. Akiba. 2000. Effect of acute heat stress on plasma amino acids concentration of broiler chicken. *Japan Poultry Science* 37, 86–94.
- Tang, S., J. Yu, M. Zhang and E. Bao. 2013. Effects of different heat stress periods on various blood and meat quality parameters in young Arbor Acer broiler chickens. *Canadian J. of Anim. Sci.* 93: 453–460.
- Tappenden K., and A. Deutsch. 2007. The physiological relevance of the intestinal microbiota-contributions to human health. *J Am Coll Nutr.* 26:679S.683S
- Tasch, B.R., M.C. Bewley, M. Ruso, J.M. Keil, K.A. Griffin, J.M. Sundstrom, 2012. The occludin and ZO-1 complex, defined by small angle X-ray scattering and NRM, has implications for modulating tight junction permeability. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109(27):10855.60
- Temizel, E.M., K. Yesilbag, C. Batten, S. Senturk, N.S. Maan, P.P. Clement. Mertens and H. Batmaz. 2009. Epizootic hemorrhagic disease in cattle Western Turkey. *Emerg. Infe. Dis.* 15, 317-319
- Tenim, S., A. Chagneau, R. Peresson and S. Tesseraud. 2000. Chronic heat exposure alters protein turnover of three different skeletal muscles in finishing broiler chickens fed 20 or 25% protein diets. *J. of Nutrition* 130, 813–819.
- Tizard, R.I. 2018. *Inmunología Veterinaria*. 10 ed. Elsevier. ISBN 9788491133711, 615p
- Torliska, T., R. Banach, J. Palaszak and A. Gryczka-Dziadecka. 1987. Hypertermia effect on lipolytic processes in rat blood and adipose tissue. *Acta. Physiol. Pol.* 38: 361-366.
- Troy A., M. Bosch, E. Rick, B. Lee, Wagner, D. Seidlova-WuTTke, W. Wuttke, T. Scanalan, O. Ronneleiv and M. Kelly. 2010. Contribution of a membrane estrogen receptor to estrogenic regulation of body temperature and energy homeostasis. *J. Endocrinology.* 151:4926-4947.
- Turner J. 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev Immunol.* 9: 799-809
- Ugolev A., and P. De Laey. 1973. Membrane digestion. A concept of enzyme hydrolysis on cell membranes. *Bioch Biophys Acta,* 300:105-128

- Van Beers-Schreurs H.M.G., M.J.A. Nabuurs, L. Vellenga, H.J. Kals-beek-van der Valk, T. Wensing and H.J. Breukink. 1998. Weaning and weaning diet influence the villous height and crypt depth in the small intestine of pigs and alter the concentrations of short-chain fatty acids in the large intestine and blood. *J. Nutr.* 128: 947-953.
- Van Deer Flier L., and H. Clevers. 2009. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol.* 71: 241:260
- Van Itallie, C.M. and J.M Anderson. 2006. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol.* 68: 403-429
- Van Itallie, C.M., A.S. Fanning, J. Holmes and J.M. Anderson. 2010. Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. *J Cell:* 2844.52.
- Verheyen, An J., D.G.D. Maes, B. Mateusen, P. Deprez, G.P.J. Janssens, L.de Lange and G. Counotte. 2007. Serum biochemical reference values for gesta
- Volloch, V., and S. Rits. 1999. A natural extracellular factor that induces Hsp72, inhibits apoptosis, and restores stress resistance in aged human cells. *Exp. Cell Res.* 253:483–492.
- Wang, F.J., S.L. Wang, Y. Zhao, Z.y. You and P. Wang. 2002. Effects of nutrition route on repair of intestinal mucosa in severe burns. *World Chin. J. Digestology.* 10:1385-1388
- West, J.W. 2003. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *J. of Dairy Sci.* 86:2131-2144.
- Westman, J., and H. S. Sharma. 1998. Heat shock protein response in the central nervous system following hyperthermia. *Prog. Brain Res.* 115:207–239.
- Wheelock, J.B., A.J. La Noce, M.D. O'Brien, S. R. Sander and R.J. Collier, L. Baumgard. 2008. The effect of heat stress and exogenous bovine somatotropin on expression of genes associated with hepatic gluconeogenesis in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91 (E-Suppl.1): 455 (Abstr.)
- Wrzosek, C., C. Cherbuy, C. Robbe-Masselot, P. Langella and M. Thomas. 2013. *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biol.* 21(11), 61.

- Xu, Y.Q., Z.W. Cao, Z. K. Ding and X. Gan. 2010. Effects and prevention of high temperatura on fishes. *Fish. Sci.* 29: 235-243.
- Yaffe, Y., J. Shepshelovithchm I. Nevo- Yassaf, A. Yeheskel, H. Shmerling, J.M. Kwiatek, K. Gaus, M. Pasmanik and K. Hieschberg. 2012. The MARVEL transmembrane motif of occludin mediates oligomerization and targeting to the basolateral surface in epithelia. *J. Cell Sci.* 15: 3545:56
- Yazdi, M.R, D. Singh, A. Anzueto, L. Tombs, W.A: Fahy and I. Naya. 2016. Assesing short-term deterioration in maintenance.naive patients with COPD Receiving Umeclidinium/Vilanterol and Tiotropium: A pooled analysis of three randomized trials. *Advances in therapy*, 33: 2188-2199
- Yu, J., P. Yin, L.Fenghua, G. Cheng, K. Guo, A. Lu, X. Zhu, W. Luan and J. Xu. 2010. Effect of heat stress on the porcine small intestine: A morphological and gene expression study. *Comparative Bioch. and Physiol.* 156:119-128.
- Yuan, L., H. Lin, H., K.J. Jiang, H.C. Jiao and Z.G. Song. 2008. Corticosterone administration and high-energy feed results in enhanced fat accumulation and insulin resistance in broiler chickens. *British Poultry Science* 49, 487–495.
- Yunianto, V. D., K. Hayashi, S. Kaneda, A. Ohtsuka and Y. Tomita.1997. Effect of environmental temperature on muscle protein turnover and heat production in tube-fed broiler chickens. *British Journal of Nutrition* 77: 897–909.
- Zhang, H.J., V.J. Drake, J.P. Morrison, L.W. Oberley and K.C. Kregel. 2002 Selected contribution: Differential expression of stress-related genes with aging and hyperthermia. *J. Appl. Physiol.* 92: 1762-1769.
- Zhao, J.B., H.Sha, F.Y. Zhuang and F. Gregersen. 2002a. Morphological properties and residual strain along the small intestine in rats. *World Journal of Gastroenterology.* 8: 312-317.