

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE CIENCIAS AGRICOLAS



**EXPRESION DE ENZIMAS RELACIONADAS CON EL METABOLISMO DE ARGININA
Y POLIAMINAS EN MUCOSA INTESTINAL DE LECHONES RECIEN DESTETADOS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN SISTEMAS DE PRODUCCION ANIMAL

PRESENTA:

NÉSTOR ARCE VÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ALFONSO BENEDICTO ARAIZA PIÑA

DRA. ADRIANA MORALES TREJO

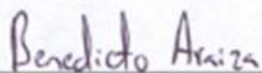
MEXICALI, BAJA CALIFORNIA

ENERO, 2012

La presente tesis titulada “**Expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo de arginina y poliaminas en mucosa intestinal de lechones recién destetados**”, fue realizada por **C. Néstor Arce Vázquez**, dirigida y asesorada por el **Dr. Benedicto A. Araiza Piña**, siendo aceptada y aprobada por el consejo particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

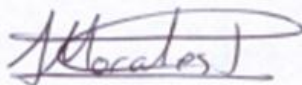
MAESTRO EN CIENCIAS EN SISTEMAS
DE PRODUCCIÓN ANIMAL

CONSEJO PARTICULAR



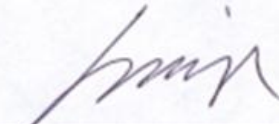
Dr. Benedicto Alfonso Araiza Piña

DIRECTOR



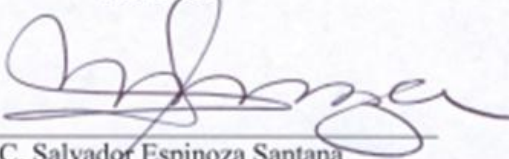
Dra. Adriana Morales Trejo

CO-DIRECTOR



Dr. Miguel Cervantes Ramírez

ASESOR



MC. Salvador Espinoza Santana

ASESOR

RESUMEN

Se evaluó el efecto del destete sobre la expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo de arginina y síntesis de poliaminas, arginina succinato sintasa (ASS), ornitina descarboxilasa (ODC), espermidina/espermina-N¹-acetiltransferasa (SSAT), en mucosa intestinal de lechones. Se utilizaron 24 lechones (12 machos y 12 hembras), de cruce York-Landrace-Duroc, seleccionados de diferentes camadas. Con un peso vivo promedio al nacimiento de 1.55 kg y 7.43 kg al destete. Los lechones fueron sacrificados en grupos de seis animales a los 0, 3, 7 y 14 días postdestete, se les tomaron muestras de mucosa intestinal de duodeno, yeyuno e íleon, y se evaluó su efecto en la expresión de ASS, ODC y SSAT. La expresión de ASS se incrementó ($P=0.051$) el día 3 postdestete; sin embargo en yeyuno e íleon no fue afectada ($P >0.05$). La expresión de SSAT no fue afectada por el destete ($P>0.05$), ni fue diferente en las porciones analizadas de intestino delgado. La baja eficiencia para determinar la expresión de ODC no permitió un análisis preciso de la expresión de su ARNm. En conclusión la expresión de ASS se incrementa a los tres días del destete en mucosa duodenal de los lechones, pero ODC y SSAT no muestran cambios en su expresión en intestino delgado.

Contenido

CONSEJO PARTICULAR.....	i
RESUMEN.....	ii
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. Intestino delgado en lechones pre y posdestete.....	3
2.1.1. <i>Morfología</i>	4
2.1.2. <i>Mecanismos de defensa</i>	5
2.1.3. <i>Actividad enzimática</i>	6
2.1.4. <i>Absorción</i>	7
2.2. Destete.....	8
2.2.1. <i>Edad</i>	8
2.2.2. <i>Estrés</i>	9
2.2.3. <i>Consumo de alimento</i>	9
2.2.4. <i>Diarreas</i>	10
2.2.5. <i>Daño intestinal</i>	11
2.3. Renovación intestinal.....	11
2.3.1. <i>Migración celular</i>	12
2.3.2. <i>Proliferación celular</i>	12
2.4. Poliaminas.....	13
2.4.1. <i>Importancia</i>	13
2.4.2. <i>Precursores</i>	14
2.5. Enzimas claves en la síntesis de poliaminas.....	14
2.5.1. <i>Arginina succinato sintasa</i>	14
2.5.2. <i>Pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa</i>	15
2.5.3. <i>Ornitina descarboxilasa</i>	16
2.5.4. <i>Espermina/espermidina acetiltransferasa</i>	16

3.	HIPÓTESIS.....	18
4.	OBJETIVO.....	18
5.	MATERIALES Y MÉTODO.....	19
5.1.	Trabajo de campo.....	19
5.2.	Trabajo de laboratorio.....	20
5.2.1.	<i>Extracción de ARN</i>	20
5.2.2.	<i>Retrotranscripción (RT)</i>	21
5.2.3.	<i>Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)</i>	21
5.2.4.	<i>Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR cuantitativo, qPCR)</i>	23
5.3.	Análisis estadístico.....	24
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
6.1.	Expresión relativa de ARNm para la enzima ornitina descarboxilasa (ODC).....	25
6.2.	Expresión relativa de ARNm para la enzima arginina succinato sintasa (ASS).....	27
6.3.	Expresión relativa de espermina/espermidina acetiltransferasa (SSAT).....	31
7.	CONCLUSIÓN.....	34
8.	LITERATURA CITADA.....	35

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la expresión de los ARNm de las enzimas arginina succinato sintasa (ASS), ornitina descarboxilasa (ODC), y espermina/espermedina acetiltransferasa (SSAT), y ARN ribosomal 18s (RIB).....	22
Cuadro 2. Programa utilizado para la técnica de PCR punto final.	22
Cuadro 3. Expresión relativa del gen de arginina succinato sintasa (ASS), en las tres porciones de intestino delgado.	29
Cuadro 4. Expresión relativa del gen de espermina/espermidina acetiltransferasa (SSAT), en las tres porciones de intestino delgado.	32
Figura 1. Ruta metabólica para la síntesis de poliaminas.	17
Figura 2. Expresión relativa de arginina succinato sintasa (ASS) en duodeno de lechones destetados.....	30

1. INTRODUCCIÓN

El crecimiento del cerdo es un proceso complejo que involucra diferentes cambios fisiológicos, sociales, sanitarios, nutricionales, y ambientales; los cambios en el tracto gastrointestinal del lechón durante la lactancia, así como durante el periodo postdestete, involucra actividad enzimática, desarrollo de la mucosa intestinal, daño y regeneración de la mucosa intestinal asociado al destete; determinan en parte este crecimiento del cerdo por la capacidad del intestino delgado en la digestión y absorción de los nutrientes del alimento.

El desarrollo y maduración intestinal determina la capacidad de digestión y absorción de nutrientes, asociado a la tasa de renovación del epitelio intestinal, el cual se mantiene de manera proporcional de acuerdo a su nivel de descamación y a su tasa de renovación y regeneración, lo anterior causado por diferentes factores ya sean cuadros clínicos, nutricionales, así como por efecto de estrés asociado a la etapa del destete.

El destete de los lechones se realiza de manera cotidiana entre los 14 a 28 días de edad en las porcícolas de acuerdo a las necesidades de la explotación. Al momento del destete la edad, el estado nutricional y de salud, juegan un papel importante que determina la capacidad del lechón para adaptarse al cambio social y fisiológico. Los cambios fisiológicos en el lechón durante el destete implican una alteración en las funciones del intestino del lechón, así como daños físicos de la mucosa epitelial, lo cual altera la homeostasis intestinal.

Para mantener la homeostasis en el intestino es necesario que estén disponibles todos los nutrientes que requieren las células intestinales y específicamente el enterocito, tales como proteínas, energía, iones, y poliaminas. Las poliaminas, son compuestos derivadas del metabolismo de algunos aminoácidos que están involucradas en la proliferación y migración celular. Además, en esos procesos metabólicos para la síntesis y degradación de poliaminas participan varias enzimas como son la arginina succinato sintasa que sintetiza arginina a partir de citrulina, ornitina descarboxilasa para la síntesis de la poliamina putrescina a partir de ornitina; pirrolina-5-carboxilato sintasa para la síntesis de ornitina a partir de glutamina vía glutamato; y espermina/espermidina acetiltransferasa que participa en la degradación de las poliaminas espermidina y espermina; entre otras (figura 1).

En resumen el destete de los lechones modifica la expresión de enzimas involucradas en la biosíntesis de metabolitos asociados a la proliferación y migración celular en el intestino delgado durante los primeros días posdestete. Por lo tanto el objetivo de este estudio es evaluar los cambios en la expresión de las enzimas arginina succinato sintasa, ornitina descarboxilasa y espermina/espermidina acetiltransferasa en intestino delgado durante los primeros días posdestete del lechón.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Intestino delgado en lechones pre y posdestete

El grado de desarrollo y maduración fetal en el último tercio de gestación son importantes, ya que influyen en la mortalidad de los lechones antes del destete. El grado de desarrollo fetal toma en cuenta el funcionamiento de la placenta, la madurez de los órganos vitales, como el intestino, y la disponibilidad de las reservas de energía del cuerpo (Van Res et al., 2005). En este sentido, el desarrollo prenatal del tracto gastrointestinal del lechón es un proceso paulatino, y es especialmente importante el desarrollo del tejido epitelial que va adquiriendo su especialización en la digestión y absorción de nutrientes, función endocrina e inmunológica (Barszcz y Skomial, 2010).

Otra etapa crítica en el desarrollo del tracto gastrointestinal de los animales jóvenes es el período de destete (Barszcz y Skomial, 2010). Después del destete el ambiente intestinal cambia drásticamente debido a la sustitución de la leche de la cerda, altamente digestible, por alimento sólido principalmente de origen vegetal. El intestino delgado tiene que adaptarse al nuevo tipo de alimento, lo que conduce a cambios en la motilidad intestinal, reducción en la secreción y actividad de las enzimas digestivas, y aumento en la población bacteriana (Skrzypek et al., 2005). Lo anterior puede ocasionar diarrea mecánica o infecciosa usualmente durante los primeros tres días posdestete, y atrofia de las vellosidades intestinales, profundidad de las criptas y por lo tanto reducción de la capacidad de absorción de nutrientes (Pluske et al., 1997).

2.1.1. Morfología

El intestino delgado se divide anatómicamente en tres porciones duodeno, yeyuno e íleon, e histológicamente, el intestino está constituido por mucosa, submucosa, muscular y serosa (Ferrufino et al., 1996). La mucosa en el lumen intestinal se compone de pequeñas proyecciones en forma de dedos llamados vellosidades que se extienden hacia la luz intestinal (Kitt et al., 2001). La vellosidad está recubierta principalmente por células de absorción llamados enterocitos y células caliciformes productoras de moco. Las microvellosidades se encuentran sobre la superficie de los enterocitos y proporcionan la mayor amplificación de la superficie epitelial. Las microvellosidades son proyecciones de los enterocitos que se encuentran densamente agrupados por célula, confiriéndoles la característica de borde de cepillo. La importancia de las vellosidades y microvellosidades es que aumentan la superficie de contacto de la mucosa y así hacen más eficiente la absorción (Kitt et al., 2001). Parte de la digestión y el total de la absorción de los nutrientes se da alrededor de las vellosidades (Kitt et al., 2001; Baba et al., 2005).

Las criptas de Lieberkuhn (o simplemente "criptas") son depresiones tubulares que se encuentran entre las vellosidades, en éstas se originan nuevas células que migran a las vellosidades (Kitt et al., 2001). Una mayor proliferación celular en el área de la cripta se asocia con la estructura y la remodelación del tejido epitelial (Barszcz y Skomial, 2010). Kitt et al., (2001) menciona que este fenómeno de regeneración causa una temporal disminución de la capacidad de digestión y absorción del intestino.

2.1.2. Mecanismos de defensa

La respuesta inmune del lechón puede ser adquirida e innata (Moreto y Perez-Bosque, 2009; Kiyono y Fukuyama, 2004), el lechón es inmunodeficiente al nacer y depende de una fuente de factores inmunes específicos y no específicos presentes en el calostro y la leche materna para su desarrollo y sobrevivencia. Las inmunoglobulinas del calostro de la cerda son absorbidas por el recién nacido a través de los enterocitos dentro de las 24 y 48 horas después del nacimiento (Stokes et al., 2004). En lo que respecta a la respuesta innata, ésta ocurre principalmente mediante la acción de las células membranosas (M) presentes en el epitelio intestinal entre el lumen y las células linfoides de las Placas de Peyer (Vega, 2004; Miller et al. 2007). Las células M transportan los antígenos del lumen intestinal a las células del sistema inmune los linfocitos T y B (Kiyono y Fukuyama, 2004). La mucosa del intestino juega un papel importante como mecanismo de defensa debido a que existe una interacción entre ésta y la microbiota intestinal benéfica (Moreto y Perez-Bosque, 2009), la cual participa en el mantenimiento de la salud intestinal al formar una barrera que protege al organismo contra los microorganismos patógenos (Stokes et al., 2004). El primer mecanismo de defensa ante agentes patógenos o alimentos abrasivos es el moco que cubre al intestino delgado y que está constituida de glucoproteínas como la mucina (Barszcz y Skomial, 2010). La mucina tiene una gran importancia debido a que mantiene la regulación de la permeabilidad y función de barrera intestinal durante el desarrollo del lechón (Lambert, 2009). La barrera intestinal está formada por las membranas de enterocitos, uniones estrechas entre los enterocitos del epitelio intestinal, moco y factores inmunológicos, tales como los macrófagos del tejido (Lambert, 2009). Las

mucinas por su gran cantidad de hidratos de carbono crean un ambiente deseable para la proliferación de bacterias específicas (Barszcz y Skomial, 2010).

2.1.3. Actividad enzimática

La actividad de las enzimas tiene un papel muy importante al ser estas las responsables de la digestión de los ingredientes consumidos por el lechón ya sea lactante o bien de destete. Las enzimas pancreáticas son las principales enzimas digestivas secretadas en el intestino delgado (duodeno). La secreción pancreática se ve mayormente afectada durante los primeros días después del destete (Rantzer et al., 1997).

Las células de la mucosa del intestino delgado tienen bordes en forma de cepillo que poseen hidrolasas que juegan un papel crucial en los pasos finales de la digestión (King et al., 2000). La actividad de las enzimas digestivas de la mucosa intestinal se produce en la superficie del borde de cepillo de los enterocitos en comparación con las enzimas pancreáticas, cuya actividad digestiva tiene lugar en el lumen intestinal (Adeola y King, 2006). La secreción y actividad enzimática se ve afectada por efecto del cambio de la alimentación del lechón que es marcado principalmente por el destete. Rantzer et al. (1997), mencionan que este cambio ocurre por la sustitución de la leche del tracto gastrointestinal por alimento sólido; lo que lleva al cambio en las enzimas secretadas por el epitelio intestinal, como la lactasa producida durante el amamantamiento que es sustituida por la sacarasa que se incrementa a medida que la necesidad de lactasa disminuye (Elnif et al., 2005).

2.1.4. Absorción

Los enterocitos son las células del epitelio intestinal especializadas en la absorción de nutrientes. Los carbohidratos, aminoácidos y péptidos, incluyendo aminoácidos libres, son transportados por los enterocitos del lumen intestinal al interior de la célula por sistemas de transporte presentes en la membrana (Wood y Trayhurn, 2003, Baba et al., 2005; Bröer, 2008).

En la etapa de lactancia, las células de absorción del intestino delgado absorben macromoléculas de la leche y los digieren en los lisosomas, por el contrario, los enterocitos en los adultos absorben las pequeñas moléculas que se digieren en el tracto digestivo y en la superficie de las micro vellosidades (Baba et al., 2005).

El crecimiento intestinal postnatal, la activación de la hidrolasa digestiva y la capacidad del intestino para absorber los nutrientes, son factores que determinan la capacidad de los lechones para digerir los nutrientes consumidos (King et al., 2000). En un estudio por Adeola y King (2006), mencionan que el crecimiento de un animal depende en parte de su capacidad para digerir y asimilar macromoléculas por la mucosa intestinal, y cualquier alteración de la misma, por atrofia de las vellosidades e hiperplasia de las criptas, limita el crecimiento (Kitt et al., 2001). Barszcz y Skomial (2010), mencionan que el grado de madurez intestinal afecta la digestibilidad de los nutrientes, la eficiencia alimenticia y la resistencia a enfermedades.

2.2. Destete

El destete de los lechones por lo general se lleva a cabo entre la 3^a y 4^a semana de vida, este destete se asocia con la homogeneización de lechones de diferentes camadas y, a veces, también con el transporte de animales desde el lugar de nacimiento a los corrales o naves especiales de destete; esta práctica da lugar a profundas tensiones sociales y ambientales (Laelles et al., 2004), y se agudiza por los cambios en la dieta (Barszcz y Skomial, 2010). El destete induce cambios, que pueden ser agudos y de larga duración, en el intestino de los lechones (Boudry et al., 2004). A continuación se mencionan algunos de los factores que tienen un efecto importante durante el destete.

2.2.1. Edad

Uno de los objetivos principales para decidir la edad de destete de los lechones es mejorar los parámetros productivos como el número de partos por año de la hembra, y por tanto aumento de la producción. Si bien en granjas de tipo comercial el destete se realiza entre los 21 y 28 días de edad, el destete precoz, a los 14 días, tiene un mayor impacto en la morfología y función del tracto gastrointestinal del lechón (Zhan et al., 2008). Esto ocurre porque el intestino del lechón no ha madurado completamente, ni está preparado para los cambios que implica, teniendo por consecuencia lesiones y disfunción de la mucosa intestinal, infección e inflamación, diarrea, disminución del crecimiento, y en consecuencia pérdidas económicas.

2.2.2. Estrés

El destete es conocido como uno de los factores más estresantes para los lechones (Moeser, et al., 2006), tiene implicaciones de desarrollo y salud; y se ve reflejado en su comportamiento productivo. El lechón tiende a enfrentarse a cambios en el entorno social que implica la separación de la madre y el establecimiento del orden jerárquico en el corral. El estrés del destete y la disminución de la estimulación enteral comprometen su integridad con atrofia de las vellosidades y aumento en la profundidad de las criptas (Spreeuwenberg et al., 2001). El estrés postdestete se asocia con incremento en los niveles de cortisol circulante en sangre el cual media cambios en la expresión de la enzima ODC para la síntesis poliaminas, por tanto tiene un papel benéfico en la adaptación y remodelación intestinal durante el destete (Wu et al., 2000a).

2.2.3. Consumo de alimento

Laelles et al. (2004), describen que el efecto inmediato del destete es una reducción en el consumo de alimento (energía) que conduce a la desnutrición y una reducción transitoria en el crecimiento (Spreeuwenberg et al., 2001). El promover un mayor consumo de alimento en el período posterior al destete temprano podría ayudar a reducir los desórdenes funcionales y estructurales del intestino, y la diarrea posdestete (Boudry et al., 2004). Kim et al. (2004), mencionan que el proporcionar sustituto de leche líquido (crianza artificial) a los lechones tiene importantes ventajas, dado que mantiene el nivel de nutrientes proporcionados, reduce el estrés posdestete, y mantiene buen consumo de alimento y desarrollo de los lechones.

2.2.4. *Diarreas*

El destete es un período crítico importante en la cría de cerdos, debido a que en esta etapa son más susceptibles a trastornos intestinales, infecciones y diarrea (Lalles et al., 2004). En un estudio realizado por Zahn et al. (2008), observaron que los lechones que mostraron una disminución en la altura de las vellosidades por efecto del destete, presentaron una mayor incidencia de diarreas; el daño de la mucosa intestinal (vellosidades y criptas), lleva consigo la alteración de la función permeable de la mucosa intestinal por daño de las células epiteliales, como se mencionó anteriormente. Al ser esta la primera línea de defensa contra agentes patógenos es importante que se mantenga esa permeabilidad. En un estudio realizado por Boudry et al. (2004), se encontró que la permeabilidad del intestino se afecta durante los primeros dos días posdestete, pero para el día 5 esta reducción ya no es significativa. El rompimiento de esta barrera se caracteriza por aumento de la permeabilidad, lo que lleva a que algunos agentes presentes en el lumen intestinal, por ejemplo, bacterias y toxinas puedan filtrarse a través del tejido epitelial desencadenando así alteraciones fisiológicas en el lechón que puede verse reflejada en enfermedades entéricas como la diarrea infecciosa (Moeser et al., 2006). Las bacterias también pueden alojarse en el tejido epitelial. La aparición de diarrea en lechones comúnmente se asocia a infecciones causadas por *Salmonella spp.* y *E. coli.*; sin embargo pueden existir otros factores que provoquen la incidencia de diarrea como son los factores ambientales y el manejo (Hong et al., 2006).

2.2.5. Daño intestinal

La descamación del tejido epitelial es un fenómeno fisiológico natural, por lo que la relación entre descamación y regeneración de las células epiteliales es continua, manteniéndose así la homeostasis del tejido. Esta homeostasis se ve alterada cuando la descamación es mayor que la regeneración de las células epiteliales, por lo que el equilibrio entre vellosidad y profundidad de la cripta se pierde (Spreeuwenberg et al., 2001). Boudry et al. (2004) encontraron que en los primeros 8 días posdestete hay una reducción en el tamaño de la vellosidad y una mayor profundidad de las criptas en la porción del yeyuno, asociado al efecto propio del destete.

2.3. Renovación intestinal

Dentro de las criptas intestinales, las células proliferan y migran hacia las vellosidades o a las bases de las criptas donde se diferencian en enterocitos, células caliciformes, enteroendocrinas y células de Paneth (Crosnier et al., 2006; Braga-Neto et al., 2008). La migración y proliferación en las células intestinales son las responsables de la reparación de lesiones, y regeneración de tejido epitelial que está en constante descamación (Crosnier et al., 2006). En general, las células intestinales se regeneran cada 3 días, y el equilibrio entre su proliferación y renovación es mediado, parcialmente, por la apoptosis (Braga-Neto et al., 2008).

2.3.1. Migración celular

La migración celular es el movimiento activo de las células nuevas del sitio de su división a otro lugar que este en desarrollo o regeneración; este proceso es importante para mantener adecuadamente la defensa inmunológica del intestino y su regeneración después de algún daño físico al tejido (Banan et al., 1998). El epitelio intestinal se mantiene en constante renovación, de tal manera que toma a las células de dos a siete días para viajar desde la cripta hasta la punta de las vellosidades (Crosnier et al., 2006). Después de una lesión en la mucosa intestinal, la velocidad de restauración del epitelio depende de la continuidad de la migración de células epiteliales nuevas para cubrir las secciones desnudas de la membrana. La migración del enterocito para el tejido epitelial dañado es un proceso independiente de la división celular por mitosis, donde esta división mitótica se efectúa de 6-12 horas (Rhoads et al., 2004).

2.3.2. Proliferación celular

La proliferación celular es el aumento en número de células que son necesarias para la renovación y regeneración del epitelio intestinal; y al igual que la migración celular es necesaria para el buen funcionamiento y salud intestinal, dado que normalmente la proliferación de enterocitos es un proceso activo. Leanaerts et al. (2007) encontraron que la disponibilidad del aminoácido arginina en las células regula la actividad de las proteínas implicadas en la proliferación celular apoptosis y la respuesta de choque térmico. Rhoads y Wu (2009), mencionan que tanto in vitro como en estudios en animales in vivo, los aminoácidos como la glutamina y arginina, promueven la proliferación celular y ejercen efectos citoprotectores diferentes en respuesta a la privación de nutrientes, daño oxidativo,

estrés y desafío inmunológico. Además, cuando el óxido nítrico está disponible, leucina aumenta la migración de las células intestinales (Rhoads y Wu, 2009). Por lo tanto, a través de mecanismos de señalización celular, la arginina, glutamina y leucina juegan un papel crucial en el crecimiento, la integridad y función intestinal, (Rhoads y Wu, 2009).

2.4. Poliaminas

Las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) son moléculas policatiónicas nitrogenadas presentes en todos los organismos vivos. En mamíferos, particularmente en la leche, tienen concentraciones altas de poliaminas que son resultado del catabolismo de aminoácidos como arginina y ornitina (Flynn et al., 2009). Este hallazgo ha llevado a estudiar el papel de las poliaminas en el desarrollo intestinal, bajo este contexto, algunos estudios han demostrado la importancia de las poliaminas en las funciones del tejido epitelial (Flynn et al., 2009; Banan et al., 1998).

2.4.1. Importancia

Las poliaminas se encuentran en todos los tejidos y son esenciales para la proliferación, diferenciación, migración y reparación del epitelio intestinal (Wang, 2005; Wu et al., 2000a), aunque su mecanismo de acción aun no se conoce con exactitud (Johnson y McCormack, 1994). Además, las poliaminas están involucradas en una amplia variedad de funciones biológicas, como en la estabilización del ADN, modulan la expresión génica y regulan la síntesis de proteínas a través de la señalización de la transducción, y además su papel en crecimiento y diferenciación celular (Wang, 2005; Wang et al., 2004).

Banan y colaboradores (1998) mencionan que las poliaminas son utilizadas como sustrato de la enzima transglutaminasa la cual puede tener actividad en la síntesis de proteínas para la posterior reparación de daños en la mucosa.

2.4.2. Precursores

Las poliaminas son producto del catabolismo de aminoácidos (e.g. arginina, ornitina, prolina). Aunque arginina, posee otras funciones celulares, como ser precursor de importantes metabolitos como el óxido nítrico, se le reconoce como el principal sustrato fisiológico para la síntesis de poliaminas (Mateo et al., 2007; Rhoads y Wu, 2009; Ma et al., 2010). Flynn et al. (2009) menciona que los trabajos de Wu y colaboradores han demostrado que arginina no es precursor importante de poliaminas en enterocitos de lechones lactantes debido a la falta de actividad de la enzima arginasa, esto puede deberse a que la leche materna es abundante en poliaminas y no es necesaria la síntesis en las células epiteliales del lactante; por otro lado el aminoácido prolina, (abundante en la leche) es la mejor fuente de ornitina para la síntesis de poliaminas en intestino de recién nacidos lactantes (Wu et al., 2000b).

2.5. Enzimas claves en la síntesis de poliaminas

2.5.1. Arginina succinato sintasa

La enzima arginina succinato sintasa (ASS) metaboliza citrulina para producir arginina succinato sustrato que es metabolizado por arginina succinato liasa (ASL) (figura

1); tanto ASS y ASL son clave en la síntesis de arginina y el reciclado de la misma (Brasse-Lagnel et al., 2003). La disponibilidad del aminoácido arginina o de sus metabolitos, afecta la actividad de las enzimas ASS y ASL (Leanerts et al., 2007). Estudio realizado por Brasse-Lagnel et al. (2003) en células Caco-2 encontraron que glutamina estimula la expresión del gen de ASS, tanto en el nivel de actividad de la enzima como la expresión del ARNm de la enzima; además Flynn et al. (2009) determinaron que la actividad de las enzimas arginina succinato liasa y arginasa incrementan su actividad al administrar cortisol a lechones lactantes de 21 días de edad.

2.5.2. Pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa

La enzima pirrolina-5-carboxilato sintasa (P5CS) metaboliza glutamina vía glutamato y pirrolina-5-carboxilato para formar prolina (figura 1), la actividad sintasa de P5CS se localiza principalmente en intestino, así mismo en el intestino delgado la enzima pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa (P5CH) participa en la síntesis de prolina, y además existen otras enzimas involucradas en la síntesis de citrulina (Bertolo y Burrin, 2008). En el intestino de neonatos la actividad de P5CS es baja, al igual que la actividad de P5CH, probablemente debido a que el glutamato y glutamina están disponibles para el intestino y la síntesis de prolina no es necesaria (Bertolo y Burrin, 2008). La inducción P5CS es importante ya que promueve la síntesis de citrulina y arginina (aminoácido esencial para cerdos jóvenes) de glutamina y glutamato en el intestino delgado (Flynn et al., 2009).

2.5.3. *Ornitina descarboxilasa*

La síntesis de poliaminas depende de la activación o la inhibición de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC), que cataliza el primer paso de la síntesis de poliaminas a partir de ornitina (Banan et al., 1998; Wang, 2005). La ODC descarboxila el aminoácido ornitina para formar putrescina (figura 1), donde grupos de propilamina se añaden a uno o ambos grupos amino de putrescina para formar espermidina y espermina (Wang, 2005). La actividad de ODC se incrementa cuando existe daño de la mucosa para la síntesis de poliaminas y, en consecuencia favorece la regeneración del tejido epitelial dañado (Hirano et al., 1995), además del efecto del cortisol producido por efecto del destete (Wu et al., 2000a).

2.5.4. *Espermina/espermidina acetiltransferasa*

Esta enzima es clave en el metabolismo de poliaminas en células del intestino delgado (Pegg, 2008), dado que existe evidencia de que la enzima espermidina/espermina- N^1 -acetiltransferasa (SSAT), es factor limitante en la tasa de degradación de poliaminas (Wang, 2005), y por lo tanto, esta enzima participa en la regulación de la concentración intracelular de las poliaminas espermina, espermidina y putrescina (Murray-Stewart et al., 2003; Wang et al., 2004). La acción de esta enzima consiste en acetilar los grupos aminopropilos de espermidina y espermina (figura 1), esta acetilación reduce las cargas de las poliaminas modificando sus funciones, para interactuar con diferentes regiones de moléculas cargadas negativamente como el ADN, ARN, en la regulación de canales iónicos (Pegg, 2008; Wang et al., 2004).

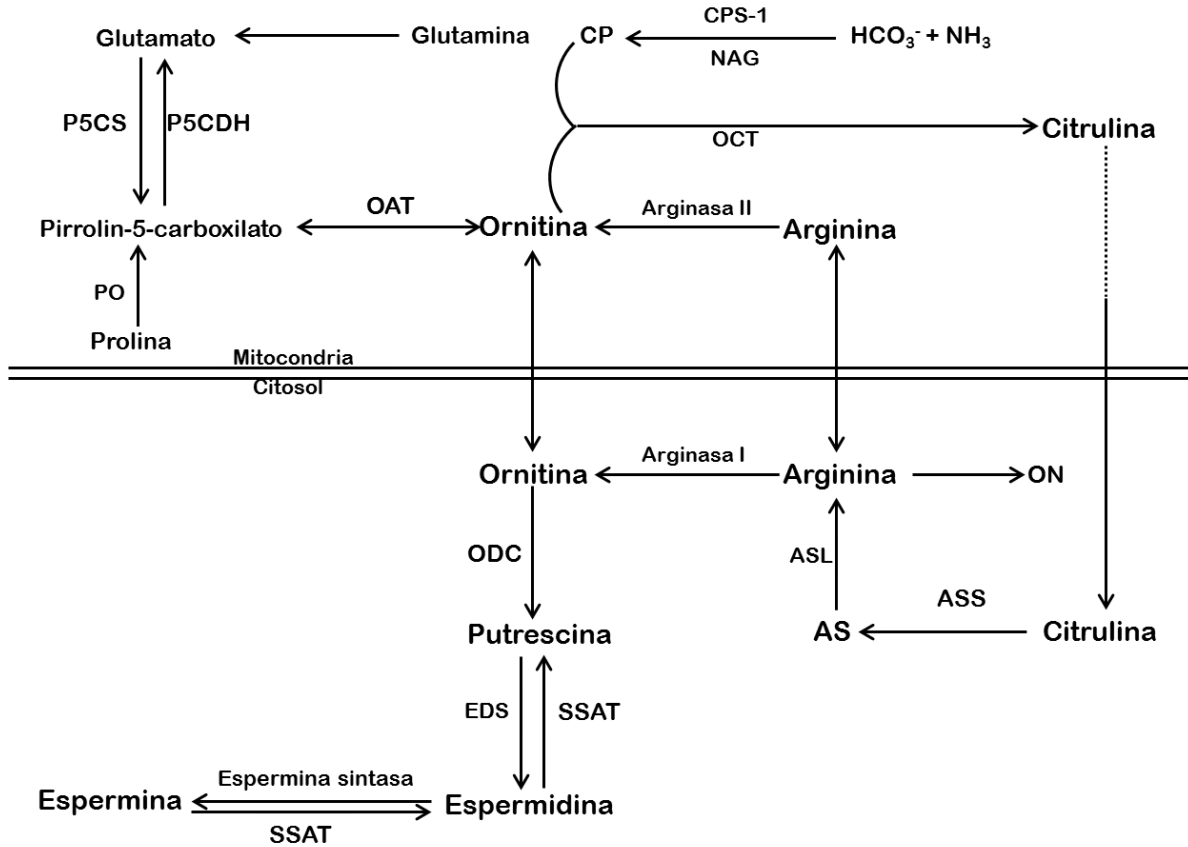


Figura 1. Ruta metabólica para la síntesis de poliaminas. ASS, argininina succinato sintasa; ASL, argininina succinato liasa; CP, carbamilfosfato; CPS-1, carbamil fosfato sintasa-1; NAG, N-acetilglutamato; OAT, ornitina aminotransferasa; ODC, ornitina descarboxilasa; ON, oxido nítrico; P5DH, pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa; P5CS, pirrolina-5-carboxilato sintasa;; SSAT, espermidina/espermina-N¹-acetiltransferasa. Adaptado de Wu et al. (2009).

3. HIPÓTESIS

El destete de los lechones modifica la expresión de enzimas involucradas en la biosíntesis de metabolitos asociados a la proliferación y migración celular en el intestino delgado durante los primeros días posdestete.

4. OBJETIVO

Analizar el efecto del destete la expresión de las enzimas relacionadas con el metabolismo de arginina y poliaminas, específicamente arginina succinato sintasa, ornitina descarboxilasa y espermina/espermidina acetiltransferasa en la mucosa del intestino delgado de lechones.

5. MATERIALES Y MÉTODO

5.1. Trabajo de campo

El experimento se realizó en la Granja Experimental Porcina del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, ubicada en el Ejido Nuevo León, Mexicali, B. C. Se utilizaron 24 lechones (12 machos y 12 hembras), de cruce de la raza York-Landrace-Duroc, seleccionados de diferentes camadas. Al tercer día de nacidos los lechones se les realizó el siguiente manejo: aplicación de hierro, descolmillado, descole, tatuaje y castración en el caso de los machos. A los 10 días de nacidos se les ofreció alimento sólido el cual consistió en una dieta de alimento preiniciador a base pasta de soya y trigo molido. Para cada día de muestreo (un día antes del destete, 3, 7 y 14 días postdestete) se utilizaron 6 lechones (machos y hembras), los cuales fueron sacrificados para tomar muestras de las tres porciones de intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon). Los lechones tenían un peso vivo promedio al nacimiento de 1.555 kg y peso al destete de 7.431 kg. Los lechones sacrificados un día antes del destete tenían un peso promedio de 7.438 kg, los lechones sacrificados el día 3, 7 y 14 días pos destete tenían un peso vivo promedio de 7.939, 6.316 y 9.456 kg respectivamente.

Las muestras de intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon) fueron tomadas inmediatamente después del sacrificio, de los lechones. Se colectaron tres muestras de 0.50 g de raspado de mucosa de cada porción intestinal (previamente lavado con solución salina) en tubos de 2 ml, los cuales se depositaron en un termo con nitrógeno líquido para posteriormente ser almacenados a -86 °C.

5.2. Trabajo de laboratorio

5.2.1. Extracción de ARN

Las muestras fueron procesadas para su extracción de ARN total, mediante la técnica de Trizol Reagent (Chomczynski and Sacchi, 1987). El procedimiento utilizado es el siguiente: la muestra colectada de tejido aún congelado se colocó en un mortero frío y se le adicionó nitrógeno líquido para macerarlo hasta obtener un polvo fino. El polvo fue recuperado en un microtubo y se le adicionaron 1000 μ l de Trizol Reagent (Invitrogen, USA), se homogenizó y centrifugó la muestra durante 10 minutos a 10000 rpm a 4 °C en una centrifuga refrigerada (Eppendorf). Posteriormente se recuperó la fase líquida en microtubo de 1.5 ml y se incubó en hielo durante 5 minutos, después se le agregaron 200 μ l de cloroformo frío, se agitó vigorosamente e incubó en hielo por 2 minutos y luego se centrifugo (15 minutos a 10000 rpm a 4 °C). Se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se adicionaron 500 μ l de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó reposar en hielo durante 10 minutos para volver a centrifugar (10000 rpm a 4 °C). Se decantó el sobrenadante y la pastilla de ARN queda adherida al tubo, para lavar la pastilla se le agregó 1000 μ l de etanol frío al 100%, y se volvió a centrifugar (5 minutos a 8500 rpm a 4 °C). Finalmente se decantó el etanol y se dejó secar la pastilla durante 10 min a temperatura ambiente. La pastilla fue resuspendida con 30 μ l de agua DEPC. La presencia y calidad del ARN total se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2%.

5.2.2. Retrotranscripción (RT)

En un microtubo de 500 µl se colocaron 5 µl de ARN, 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 ADNsa/ARNsa), se centrifugo por 10 segundos, y la reacción se incubó a temperatura ambiente 15 min y después 5 min a 70 °C en un baño seco, después se agregó a la reacción 1 µl de random primer con una concentración de 0.15 µg/ml (Invitrogen) y 1 µl de DNTP's 10 µM, se centrifugo 10 s, se incubó a temperatura ambiente 5 min, después se volvió a colocar en hielo y se le añadió 2 µl de buffer 5x, 3 µl de DTT 0.1 M y 1 µl de inhibidor de ARNsa 10 U/µl, se homogenizó y centrifugó (10 s). La reacción se incubó a 42 °C 2 min, posteriormente nuevamente en hielo se añadió la enzima transcriptasa reversa 200 U/µl (RT-Superscript III, Invitrogen) y se procedió a incubar a 42 °C por 50 min y a 70°C durante 15 min, al finalizar la reacción el ADNc fue guardado a -20°C para posteriormente realizar PCR y PCR cuantitativo.

5.2.3. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la estandarización de los oligonucleótidos específicos (Cuadro 1) de los ARNm de las enzimas arginina succinato sintasa (ASS, GenBank AY550053.1), ornitina descarboxilasa (ODC, Gen Bank NM_001122983), y espermina/espermedina acetiltransferasa (SSAT, Gen Bank NM_214358.1), y del RNA ribosomal 18s (RIB, Gen Bank AY265350). El RNA ribosomal se empleó como gen constitutivo. Se realizaron pruebas de PCR punto final para verificar la expresión de los ARNm en los productos de RT (ADNc). El protocolo utilizado fue el siguiente: en un microtubo de 0.2 ml se agregaron 3 µl de MgCl (Fermentas), 5 µl buffer 5X, 1 µl DNTP's, 1 µl de oligo sentido, 1µl de oligo

antisentido, 3 µl de cDNA, 35.5 de agua tratada con DEPC, y 0.5 µl de enzima ADN polimerasa, terminado esto se centrifugo por 10 segundos para homogeneizar y se colocaron en un termociclador (Eppendorf) de punto final por 45 ciclos (Cuadro 2).

Cuadro 1. Oligonucleótidos utilizados para la expresión de los ARNm de las enzimas arginina succinato sintasa (ASS), ornitina descarboxilasa (ODC), y espermina/espermedina acetiltransferasa (SSAT), y ARN ribosomal 18s (RIB).

Gen	Secuencia del fragmento		Tamaño
	Sentido:	Antisentido	
ASS	GCTGGTGTACCGGGTTTCT	TCTGGAGGCGATGATATTCC	262 pb
ODC	GTCTGTGCGCCTCAGTGTCAA	CTGGCTCCGCTATGATTCTC	340 pb
SSAT	AGTGCCAAGGAGCATCTAA	CCTCTGCTGCCATTTTTAGC	338 pb
ARN ribosomal	GGCCTCACTAAACCATCCAA	TAGAGGGACAAGTGGCGTTC	295 pb

Cuadro 2. Programa utilizado para la técnica de PCR punto final.

Etapa	Tiempo hh:mm:ss	Temperatura °C
Desnaturalización inicial	00:05:00	94
40 ciclos :		
Desnaturalización	00:00:45	94
Alineación	00:00:45	56
Elongación	00:01:00	72
Elongación final	00:05:00	10
Incubación	indefinido	10

5.2.4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR cuantitativo, qPCR)

En un espectrofotómetro se leyó a 260 nm la concentración de los ADNc obtenidos mediante el procedimiento de retrotranscripción descrito anteriormente. Con los valores de concentración obtenidos se realizaron diluciones de los ADNc para homogenizarlos a una concentración de 50 ng de ADNc/ μ l.

Para las reacciones de qPCR se emplearon 75 ng de ADNc de cada tejido específico; 1.5 μ l de cada oligonucleótido específico (Cuadro 2) a una concentración inicial de 0.5 μ M; se agregaron 12.5 μ l de SYBR Green Supermix (MaximaTM SYBR Green/Rox qPCR Master Mix 2X, fermentas), esta mezcla contiene a la enzima ADN polimerasa, un buffer con MgCl y el fluoróforo SYBR-Green; y finalmente la reacción fue completada a un volumen total de 25 μ l con agua tratada con DEPC. Las temperaturas de alineación para la amplificación de los fragmentos de los ARNm fueron de 56°C para ASS y SSAT y de 57°C para ODC y P5C, se realizaron con 45 ciclos de amplificación. Las condiciones de amplificación del qPCR fueron; 95°C por 1min, 45 ciclos [95°C por 30 segundos, 56°C por 15 segundos, 72 °C por 1minuto], se leyó la fluorescencia al final de cada ciclo; posteriormente se realizó una curva de desnaturalización 60°C a 90°C con lectura de fluorescencia cada 0.2 °C; y una incubación final de las muestras a 10 °C por tiempo indefinido. El equipo empleado para los análisis de qPCR fue un Cromo 4 (Bio Rad) adaptado a un termociclador ADN Engine (Bio Rad) y el software utilizado para el análisis de resultados fue MJ Opticom Monitor, versión 3.1.

5.3. Análisis estadístico

El análisis, se realizó con el programa estadístico Statistix 9.0, mediante la aplicación de un análisis de varianza (ANOVA) y contrastes polinomiales: Día 0 vs día 3, día 0 vs día 7, día 0 vs día 14.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La actividad de las poliaminas y de las enzimas que participan en la síntesis de estas durante el estado fisiológico normal y además durante un estado de daño de la mucosa epitelial, es importante para la renovación y regeneración de las células epiteliales que se ven afectadas por la descamación epitelial (Crosnier et al., 2006), además el daño asociado al efecto del estrés por destete, cambio de la alimentación, cambios en la secreción enzimática; la ocurrencia de estos daños incrementan la necesidad de estas poliaminas y por tanto la actividad de las enzimas para la rápida regeneración de la mucosa (Rhoads y Wu, 2009).

6.1. Expresión relativa de ARNm para la enzima ornitina descarboxilasa (ODC)

En este trabajo se estudio la expresión de los ARNm de las enzimas ODC, ASS y SSAT. En el caso de la enzima ornitina descarboxilasa se obtuvo amplificación de ARNm en las tres diferentes porciones duodeno, yeyuno e íleon, pero la eficiencia de amplificación fue muy baja y no permitió un análisis preciso de la expresión de su ARNm.

La enzima ODC sintetiza putrescina a partir de ornitina, proceso que es irreversible, esta enzima es considerada como regulador de la tasa de síntesis de poliaminas (Bejelakovic et al., 2010), caso contrario de SSAT a la cual se le considera como reguladora de la tasa de degradación de las poliaminas (espermina y espermidina) (Bejelakovic et al., 2010; Pegg, 2008). Ornitina es sintetizado a partir de arginina y

glutamina, aminoácidos que se encuentran en suficiente cantidad en las dietas típicas de cerdos (Araiza et al., 2003).

En procesos infecciosos o daño de la mucosa intestinal se requiere de protección contra estos agentes, como mecanismo de defensa la respuesta inmune del animal tiene un papel primordial, durante esta respuesta los macrófagos sintetizan citosinas antiinflamatorias, estas citosinas así como el óxido nítrico pueden regular la biosíntesis y transporte de poliaminas (Bejelakovic et al., 2010). Bauer et al. (2001) soportan esta hipótesis de que el óxido nítrico inhibe la actividad de ODC vía S-nitrosilación sobre el residuo de cisteína de ODC, dado que ODC requiere del centro activo de cisteína para su máxima actividad enzimática. Bajo estados de respuesta inmune, daños inflamatorios, y procesos neoplásticos (e. g. tuberculosis, neumonía, cáncer) las concentraciones de espermidina aumentan significativamente lo que sugiere el papel directo de espermidina en la salud. En datos presentados por Espinosa (2010) las concentraciones de espermidina incrementaron en la porción de yeyuno con la adición de glutamina, debido quizás a una mayor disponibilidad de ornitina por el metabolismo de glutamina por acción de ODC y además asociado a la respuesta inmune del lechón causado por el estrés postdestete.

Bajo condiciones de estrés se producen glucocorticoides como es el cortisol el cual se ha visto que tiene un efecto positivo sobre la actividad de ODC, llegándose a incrementar en un 230%, además de un incremento de poliaminas a partir de ornitina y prolina (Wu et al., 2000a); sin embargo falta identificar la relación que existe entre un incremento en la actividad de ODC y la expresión de ARNm de ODC, ya que en este experimento no se pudo determinar si hubo algún cambio en la expresión de esta enzima

debido al estrés provocado por el destete en los lechones. A pesar de ello no se han demostrado cambios en la concentración de poliaminas en enterocitos de lechones destetados en comparación con lechones sin destetar de la misma edad, aunque al administrar un bloqueador de receptores de glucocorticoides (RU-486) se observó una disminución en la concentración de putrescina, espermidina y espermina en enterocitos comparado con lechones destetados sin tratar y lechones sin destetar (Wu et al., 2000a).

6.2. Expresión relativa de ARNm para la enzima arginina succinato sintasa (ASS)

Arginina es un aminoácido importante en el mecanismo de reparación intestinal, proceso durante el cual la proliferación y la migración celular son eventos fisiológicos esenciales para la homeostasis de la mucosa intestinal (Leanaerts et al. 2007; Crosnier et al., 2006), además este aminoácido es el principal sustrato para la síntesis de poliaminas por lo que su metabolismo juega un papel importante para la producción de los metabolitos asociados a la salud intestinal (Wu et al., 2009).

En el cuadro 3 se presentan los resultados de la expresión de ARNm para el gen de ASS en el intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon). La expresión de ASS en duodeno tuvo una tendencia a incrementarse al 108 % el día 3 posdestete ($P=0.0514$; cuadro 3 y figura 2) comparado con la expresión del día 0; para el día 7 y 14 se observó la expresión fue semejante a las obtenidas para el día 0, y menor con respecto al día 3 ($P=0.0514$). En las porciones de yeyuno e íleon no se encontraron diferencias en los días posdestete estudiados ($P=0.8833$ y $P=0.3884$), respectivamente.

La actividad de la enzima ASS es clave en la síntesis de arginina a partir de citrulina, por tanto la presencia de este aminoácido o uno de sus metabolitos pueden actuar como moléculas de señalización sobre genes específicos, y especialmente sobre los que están involucrados en el metabolismo de arginina (Leanerts et al. 2007). Además, la deficiencia de arginina en células epiteliales se puede corregir al ser sintetizada a partir de citrulina y glutamina por acción de las enzimas ASS y arginina succinato liasa, de tal modo que arginina pueda ser reciclada para la síntesis de ornitina (Leanerts et al. 2007, Mori, 2007, Wu et al., 1997). Sin embargo, la síntesis de citrulina en intestino es regulada por tres enzimas claves, la pirrolina-5-carboxilato sintasa (P5CS), prolina oxidasa (PO) y N-acetilglutamato (NAG), las cuales, juntas solo son encontradas en enterocitos de mamíferos, incluido el cerdo y humano, lo que indica el papel esencial para el intestino (Flynn y Wu, 1996); NAG funciona como activador alosterico para P5C y carbamil fosfato sintasa-1 (figura 1), teniendo efecto regulador de la producción de citrulina en enterocitos (Wu et al., 2007; Wu et al, 2004).

Se conocen dos isoformas de P5C una corta expresada en células del intestino delgado y otra forma larga expresada en otros tipos de células, la forma corta es inhibida por ornitina, lo que sugiere menor síntesis de citrulina en intestino (Hu et al., 2008; W); si la síntesis de arginina a partir de otros sustratos es ampliamente regulado para mantener la homeostasis de la célula, nos podría sugerir que el no encontrar diferencias en su expresión en este experimento, con respecto al día 0, podría deberse a la regulación que existe en la rutas metabólicas antes de la reacción final de ASS y ASL.

Cuadro 3. Expresión relativa del gen de arginina succinato sintasa (ASS), en las tres porciones de intestino delgado (número de moléculas de ARNm de ASS/número de moléculas de ARN ribosomal).

Porción	Días posdestete					P		
	0	3	7	14	E.E.	C1	C2	C3
Duodeno	1.57E-3 ^b	3.28E-3 ^a	8.0E-4 ^b	8.08E-4 ^b	5.862E-04	0.0514	0.3642	0.3685
Yeyuno	1.04E-3	6.95E-4	1.09E-3	9.25E-4	3.725E-04	0.5290	0.9184	0.8382
Íleon	9.47E-3	7.96E-3	8.48E-3	2.38E-2	7.393E-03	0.8869	0.9259	0.1854

Valores con letra diferente sobre en la misma fila son diferentes ($P < 0.05$)

Contrastes: C1, día 0 vs día 3 ($P=0.0514$); C2, día 0 vs día 7; C3, día vs día 14.

Arginina es precursor de oxido nítrico (ON) el cual está relacionado con un incremento en la proliferación y migración de células del tejido epitelial. Esto sugiere una mayor actividad de la enzima oxido nítrico sintasa así como de ASS y ASL cuando existe mayor daño en la mucosa intestinal (Mori, 2007), lo cual ocurriría los primeros tres a cuatro días posdestete de lechones (Boudry et al., 2004). Estos datos concuerdan con los obtenidos en este experimento en el que se encontró un aumento en la expresión de ASS en duodeno para el día 3 posdestete (Figura 2), y que podría asociarse con una mayor actividad de la misma en intestino delgado. Pero, para los días posteriores (7 y 14 posdestete) en los cuales se observó una disminución de la expresión relativa de ASS a niveles similares a los observados el día 0. En yeyuno e íleon no se encontró una diferencia significativa en la expresión de ASS en ninguna de las fechas de muestreo, a pesar de que otros autores (Boudry et al., 2004) han observado una recuperación de la morfología intestinal en

lechones entre los días 5 y 14 posdestete. En un estudio por Brasse-Lagnel et al. (2003), en células Caco-2 de epitelio intestinal, encontraron que la expresión y actividad de ASS aumenta por la presencia de glutamina en el medio. Además, se menciona que la mayor actividad de síntesis de arginina por actividad de ASS y ASL es en células del hígado (hepatocitos), debido a que en éstos la concentración de arginina es baja (Wu et al., 2009), a diferencia de células epiteliales y células del riñón, donde el aumento de la actividad de ASS para síntesis de arginina a partir de citrulina (Granik, 2003, Wu et al., 1997).

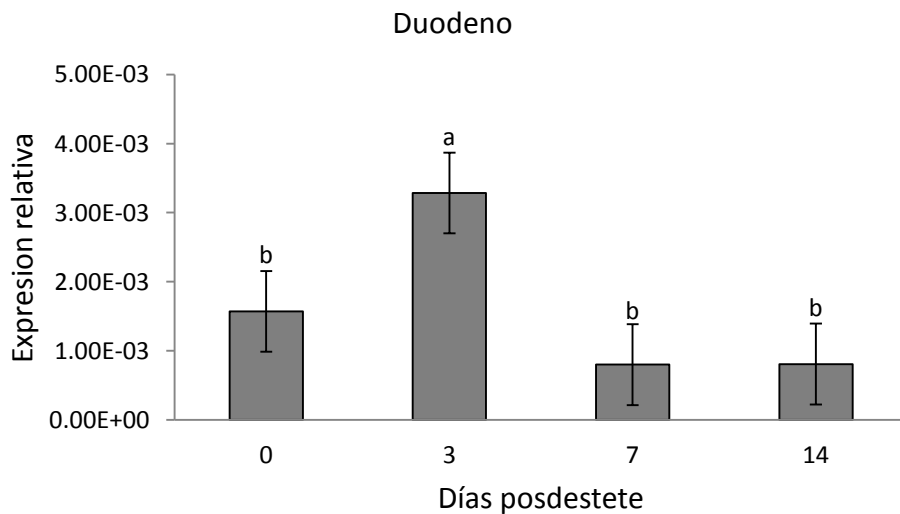


Figura 2. Expresión relativa de arginina succinato sintasa (ASS) en duodeno de lechones destetados. Los valores son medias de los tratamientos. Día 0 vs día 3 ($P = 0.0514$), día 0 vs día 7 y día 0 vs día 14 ($P > 0.05$).

El primer efecto causado por el destete es el estrés, el cual está asociado a un incremento en los niveles de cortisol en sangre (Wu et al., 2000b). En enterocitos de lechones de destete se ha observado que el cortisol incrementa la actividad de ASSL y P5C, pero no así sobre la actividad de ASS (Flynn y Wu, 1997). Esto sugiere que al no haber un incremento en la actividad de ASS, tampoco habría necesidad de incrementar expresión, lo que coincide con los resultados obtenidos en este experimento.

6.3. Expresión relativa de espermina/espermidina acetiltransferasa (SSAT).

Las poliaminas putrescina, espermidina, y espermina son cationes alifáticos derivado de ornitina por la actividad de enzimas como ODC y las espermidina/espermina sintasa, respectivamente; estas poliaminas tienen importante papel en la regulación celular por su participación en procesos de crecimiento, proliferación y apoptosis, por consiguiente la regulación de su concentración a nivel celular es importante para mantener la homeostasis celular (Butcher et al., 2007; Lee et al., 2010).

En el cuadro 4 se presentan los resultados de la expresión de SSAT en intestino delgado (duodeno, yeyuno e íleon). Los resultados obtenidos demuestran que el destete no afecta significativamente ($P > 0.05$) la expresión de SSAT en duodeno, yeyuno e íleon, analizada en los días 0, 3, 7 y 14 posdestete.

Cuadro 4. Expresión relativa del gen de espermina/espermidina acetiltransferasa (SSAT), en las tres porciones de intestino delgado (número de moléculas de ARNm de SSAT/número de moléculas de ARN ribosomal).

Porción	Días posdestete					P		
	0	3	7	14	E.E.	C1	C2	C3
Duodeno	1.37E-03	4.77E-03	1.59E-03	1.21E-03	7.56E-04	0.1353	0.8351	0.8901
Yeyuno	9.39E-04	1.03E-03	1.01E-03	6.21E-04	2.845E-04	0.8224	0.8497	0.4381
Íleon	1.80E-03	4.99E-03	2.19E-03	4.58E-03	1.534E-03	0.1579	0.8583	0.2147

El paso inicial para la biosíntesis de poliaminas es la producción de putrescina a partir de ornitina por la regulación de la enzima ODC. Espermidina es formada a partir de putrescina y espermina desde espermidina por la adición de grupos aminopropilos, esta síntesis es mediada por la enzima espermidina sintasa y espermina sintasa, respectivamente (Pegg, 2008). La biosíntesis de espermina y espermidina es un proceso reversible a putrescina, regulado o limitado por la actividad de SSAT. Además, las mismas poliaminas regulan e inducen la actividad de SSAT, esto contribuye a mantener la homeostasis de poliaminas a nivel celular (Ivanov et al., 2009; Pegg, 2008; Butcher et al., 2007).

En un estudio realizado por Wang et al. (2004) en cultivos celulares de hígado de rata, encontraron que la administración de tetraciclina aumenta la actividad enzimática de SSAT 24 horas después de la aplicación, además asociado a una reducción en las concentraciones de espermidina y espermina que se vio reflejado en un menor crecimiento celular. Por otro lado, la disminución de las poliaminas incrementó la concentración de putrescina 24 horas después de la aplicación y cayó a niveles basales a las 96 horas post-administración. Estos datos confirman la relación que hay entre la concentración intracelular de las poliaminas con la actividad de SSAT. Datos relacionados presentados por Butcher et al. (2007) muestran que la actividad de SSAT puede ser inducida por diferentes estímulos fisiológicos (e. g. estrés oxidativo, citotoxinas, choque térmico) pero algunos de éstos no tienen efecto sobre la expresión de SSAT, lo cual podría explicar en parte lo obtenido en este experimento en el que no se encontró diferencia en la expresión de SSAT en duodeno, yeyuno e íleon, en las diferentes fechas analizadas.

7. CONCLUSIÓN

La expresión de arginina succinato sintasa se incrementa a los tres días del destete en mucosa duodenal de los lechones, sin embargo ornitina descarboxilasa y espermidina/espermina acetiltransferasa no muestran cambios en su expresión en intestino delgado.

8. LITERATURA CITADA

- Adeola, O. y King, D. E. 2006. Developmental changes in morphometry of the small intestine and jejunal sucrase activity during the first nine weeks of postnatal growth in pigs. *J. Anim. Sci.* 84:112-118.
- Araiza P., A-B; M. C. Ramírez; A. M. Maldonado; S. E. Santana; M. C. Ramírez y N. T. Olivera. 2003. Digestibilidad ileal aparente de aminoácidos en sorgo, Maíz y trigo en dietas para cerdos en crecimiento. *Agrociencia* 37: 221-229.
- Baba R.; M. Yamami; Y. Sakuma; M. Fujita; S. Fujimoto. 2005. Relationship between glucose transporter and changes in the absorptive system in small intestinal absorptive cells during the weaning process. *Med Mol Morphol* 38:47–53.
- Banan A.; Shirley A. McCormack; and Leonard R. Johnson. 1998. Polyamines are required for microtubule formation during gastric mucosal healing. *Am. J. Physiol.* 274 (Gastrointest. Liver Physiol. 37): G879–G885.
- Bauer PM; Buga G. M.; Fukuto J. M.; Pegg A. E.; Louis J.; Ignarro L. J. 2001. Nitric oxide inhibits ornithine decarboxylase via S-nitrosylation of cysteine 360 in the active site of the enzyme. *J Biol Chem* 276(37):34458–34464.
- Barszcz, M y Skomial, J. 2010. The development of the small intestine of piglets - chosen aspects. *J. Anim. and Feed Sci.* 20:3-15.
- Bertolo R. F. and Douglas G. Burrin. 2008. Comparative Aspects of Tissue Glutamine and Proline Metabolism. *J. Nutr.* 138: 2032S–2039S.

- Boudry, G.; Péron, V.; Huërou-Luron, I. L.; Lallés, J. P.; Seve, B. 2004. Weaning Induces Both Transient and Long-Lasting Modifications of Absorptive, Secretory, and Barrier Properties of Piglet Intestine. *J. Nutr.* 134: 2256–2262.
- Butcher N. J.; G. M. Broadhurst; and R. F. Minchin. 2007. Polyamine-dependent Regulation of Spermidine-Spermine N1-Acetyltransferase mRNA Translation. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 282, 39:28530–28539.
- Bjelakovic´ G.; I. Stojanovic´ I.; T. J. Stoimenov; D. Pavlovic´; G. Kocic´; S. Rossi; C. Tabolacci; J. Nikolic´; D. Sokolovic´; Lj. Bjelakovic. 2010. Metabolic correlations of glucocorticoids and polyamines in inflammation and apoptosis. *Amino Acids* DOI 10.1007/s00726-010-0489-3.
- Braga-Neto M. B.; Cirle A. Warren; Reinaldo B. Oriá; Manuel S. Monteiro; Andressa A. S. Maciel; Gerly A. C. Brito; Aldo A. M. Lima; Richard L. Guerrant. 2008. Alanyl-Glutamine and Glutamine Supplementation Improves 5-Fluorouracil-Induced Intestinal Epithelium Damage In Vitro. *Dig Dis Sci* 53:2687–2696.
- Brasse-Lagnel C.; Alain Fairand, Alain Lavoinne; and Annie Husson. 2003. Glutamine Stimulates Argininosuccinate Synthetase Gene Expression through Cytosolic O-Glycosylation of Sp1 in Caco-2 Cells. *Journal of Biological Chemistry* 278, 52: 52504–52510.
- Bröer S. 2008. Amino Acid Transport Across Mammalian Intestinal and Renal Epithelia. *Physiol Rev* 88:249–286.
- Crosnier, C.; Despina Stamataki and Julian Lewis. 2006. Organizing cell renewal in the intestine: stem cells, signals and combinatorial control. *Nature reviews*. Vol 7:349-359.

- Elnif, J.; Buddington, R. K.; Hansen N. E.; Sangild, P. T. 2005. Cortisol increases the activities of intestinal apical membrane hydrolases and nutrient transporters before weaning in mink (*Mustela vison*). *J. Comp. Physiol. B* 176:233-241.
- Ferrufino, J. C.; Texas, L.; Angeles, G. 1996. Histología normal del intestino delgado. *Rev. Med. Hered.* 7:46-57.
- Flynn N. E.; and Wu G. 1997. Enhanced metabolism of arginine and glutamine in enterocytes of cortisol-treated pigs. *Am. J. Physiol.* 272 (Gastrointest. Liver Physiol. 35): G474-G480.
- Flynn N. E. and Wu G. 1996. An important role for endogenous synthesis of arginine in maintaining arginine homeostasis in neonatal pigs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 271:R1149–R1155.
- Granik V. G. 2003. Metabolism of L-arginine (a review). Vol. 37, No. 3:3–20.
- Hirano M.; Ryuichi Iwakiri; Kazuma Fujimoto; Hiroyuki Sakata; Takashi Ohyama; Takahiro Sakai; Takashi Joh; and Maikoto Itoh. 1995. Epidermal growth factor enhances repair of rat intestinal mucosa damaged by oral administration of methotrexate. *J Gastroenterol.* 30:169-176.
- Hong, T. T. T.; Linh, N. Q.; Ogle, B.; Linderberg, J. E. 2006. Survey on the prevalence of diarrhoea in pre-weaning piglets and on feeding systems as contributing risk factors in smallholdings in Central Vietnam. *Trop. Anim. Health Prod.* 38:397–405.
- Ivanov I. P.; J. F. Atkins; and A. J. Michael. 2009. A profusion of upstream open reading frame mechanisms in polyamine-responsive translational regulation. *Nucleic Acids Research*, Vol. 38, No. 2: 353–359.
- King, D. E.; Asem, E. K.; Adeola O. 2000. Ontogenetic Development of Intestinal Digestive Functions in White Pekin Ducks. *J. Nutr.* 130: 57-62.

- Kitt, S. J.; Miller, P. S. Lewis, A. J. 2001. Factors Affecting Small Intestine Development in Weanling Pigs. Pages 32-35 in Nebraska Swine Rep. Univ. Nebraska, Lincoln.
- Kiyono, H. y Fukuyama, S. 2004. NALT-versus Peyer's-patch-mediated mucosal immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 4:699-710.
- Lallès J-P; G. Boudry; C. Favier; N. Le Flocc'H; I. Luron; L. Montagne; I. P. Oswald; S. Pié; C. Piel; and B. Sève. 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Anim. Res.* 53:301-316.
- Lambert, G. P. 2009. Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects. *J. Anim. Sci.* 87:E101-E108.
- Lee S. B.; J. H. Park; P. M. Woster; R. A. Casero, Jr.; and M. H. Park. 2010. Suppression of Exogenous Gene Expression by Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase 1 (SSAT1) Cotransfection. *The Journal of Biological Chemistry.* 285(20): 15548–15556.
- Lenaerts K.; J. Renes; F. G. Bouwman; Jean-Paul N.; J. Robben; E. Smit; and E. C. Mariman. 2007. Arginine deficiency in preconfluent intestinal Caco-2 cells modulates expression of proteins involved in proliferation, apoptosis, and heat shock response. *Proteomics* 7:565–577.
- Ma X.; Y. Lin; Z. Jiang; C. Zheng; G. Zhou; D. Yu; T. Cao; J. Wang; and F. Chen. 2010. Dietary arginine supplementation enhances antioxidative capacity and improves meat quality of finishing pigs. *Amino Acids* 38:95–102.
- Mateo, R. D.; G. Wu; F. W. Bazer; J. C. Park; I. Shinzato; and S. W. Kim. 2007. Dietary L-Arginine Supplementation Enhances the Reproductive Performance of Gilts. *J. Nutr.* 137: 652–656.

- Miller H; J. Zhang; R. KuoLee; G. B Patel; and W. Chen. 2007. Intestinal M cells: The fallible sentinels?. *J Gastroenterology* 13(10): 1477-1486.
- Moeser, A. J.; Klok, C. V.; Ryan, K. A.; Wooten, J. G.; Little, D.; Cook, V. L.; Blikslager, A. T. 2006. Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292: G173–G181
- Mori M. 2007. Regulation of Nitric Oxide Synthesis and Apoptosis by Arginase and Arginine Recycling. *J. Nutr.* 137: 1616S–1620S.
- Moretó, M y Pérez-Bosque, A. 2009. Dietary plasma proteins, the intestinal immune system, and the barrier functions of the intestinal mucosa. *J. Anim. Sci.* 87: E92-E100.
- Pegg A. E. 2008. Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase: a key metabolic regulator. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 294: E995–E1010.
- Pluske, J.R.; Hampson. D.J.;Williams, I.H. 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig. *Review livestock production science*, 51:215-236.
- Rantzer, D.; Kiela, P.; Thaela, M-J.; Svendsen, J.; Ahrén, B.; Karlsson, S.; Pierzynowski, S. G. 1997. Pancreatic Exocrine Secretion During the First Days After Weaning in Pigs. *J. Anim. Sci.* 75:1324–1331.
- Rhoads J. M. and Guoyao Wu. 2009. Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine. *Amino Acids* 37:111–122.
- Rhoads, J M.; W Chen; J Gookin; G Y Wu; Q Fu; A T Blikslager; R A Rippe; R A Argenzio; W G Cance; E M Weaver; and L H Romer. 2004. Arginine stimulates intestinal cell migration through a focal Adhesion kinase dependent mechanism. *Gut* 53:514–522.

- Skrzypek T., Valverde Piedra J.L., Skrzypek H., Woliński J., Kazmierczak W., Szymańczyk S., Pawłowska M., Zabielski R., 2005. Light and scanning electron microscopy evaluation of the postnatal small intestinal mucosa development in pigs. *J. Physiol. Pharmacol.* 56, Suppl. 3, 71-87.
- Spreeuwenberg, M. A. M., J. M. A. J. Verdonk, H. R. Gaskins and M. W. A. Verstegen. 2001. Small intestine epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning. *J. Nutr.* 131:1520-1527.
- Stokes C. R.; M. Bailey; K. Haverson; C. Harris; P. Jones; C. Inman; S. PIÉ; I. P. Oswald; B. A. Williams, A. D. L. Akkermans; E. Sowa; H-J Rothkötter; B. G. Miller. 2004. Postnatal development of intestinal immune system in piglets: implications for the process of weaning. *Anim. Res.* 53:325–334. Review.
- Van Rens, B. T. T. M.; Koning, G.; Bergsma, R. and Van der Lende, T. 2005. Prewaning piglet mortality in relation to placental efficiency. *J. Anim. Sci.* 83:144–151.
- Vega L. M. A. 1994. Sistema immune intestinal porcino. *Ciencia Veterinaria* 6:145-172.
- Wang, J-Y. 2005. Polyamines regulate expression of E-cadherin and play an important role in control of intestinal epithelial barrier function. Review. *Inflammopharmacology*, Vol. 13, No. 1–3, pp. 91–101.
- Wang Z.; K. Zahedi; S. Barone; K.Tehrani; H. Rabb; K. Matlin; R. A. Casero; and M. Soleimani. 2004. Overexpression of SSAT in Kidney Cells Recapitulates Various Phenotypic Aspects of Kidney Ischemia-reperfusion Injury. *J Am Soc Nephrol* 15: 1844–1852.
- Wood I. S. and Paul Trayhurn. 2003. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition* 89:3–9.

- Wu G.; N. E. Flynn; D. A. Knabe; and L. A. Jaeger. 2000a. A cortisol surge mediates the enhanced polyamine synthesis in porcine enterocytes during weaning. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 279:R554–R559.
- Wu G, Flynn N. E. and Knabe D. A. 2000b. Enhanced intestinal synthesis of polyamines from proline in cortisol-treated piglets. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279:E395–E402.
- Wu G.; Knabe D.A.; Kim S. W. 2004. Arginine nutrition in neonatal pigs. *J Nutr* 134:2390S–2783S.
- Wu G.; Bazer F. W.; Davis T. A.; Jaeger L. A.; Johnson G. A.; Kim S. W.; Knabe D. A.; Meininger C. J.; Spencer T. E.; Y-L Yin . 2007. Important roles for the arginine family of amino acids in swine nutrition and production. *Livest Sci* 112:8–22.
- Wu G.; F. W. Bazer; T. A. Davis; S. W. Kim; P. Li; J. M. Rhoads; M. C. Satterfield; S. B. Smith; T. E. Spencer; and Y. Yin. 2009. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids* 37:153–168.
- Zhan Z., D. Ou, X. Piao, S. W. Kim, Y. H. Liu, and J. Wang. 2008. Dietary Arginine Supplementation Affects Microvascular Development in the Small Intestine of Early-Weaned Pigs. *J. Nutr.* 138: 1304–1309.