

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE CIENCIAS AGRÍCOLAS



**ADICIÓN DE ARGININA Y GLUTAMINA A DIETAS PARA CERDOS
DESTETADOS: EXPRESIÓN DE ENZIMAS DEL METABOLISMO DE
POLIAMINAS E HISTOLOGÍA DEL INTESTINO DELGADO.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS EN SISTEMAS EN PRODUCCIÓN ANIMAL**

**PRESENTA:
EDGAR OSVALDO YOCUPICIO CÓRDOVA**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. BENEDICTO ALFONSO ARAIZA PIÑA**

La presente tesis titulada “Adición de arginina y glutamina a dietas para cerdos destetados: expresión de enzimas del metabolismo de poliaminas e histología del intestino delgado.”, fue realizada por el alumno Edgar Osvaldo Yocupicio Córdova bajo la dirección del Comité Particular abajo indicado, como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN SISTEMAS DE PRODUCCIÓN ANIMAL

COMITÉ PARTICULAR

DIRECTOR _____

Dr. Benedicto Alfonso Araiza Piña

CO-CODIRECTORA _____

Dra. Adriana Morales Trejo

ASESOR _____

Dr. Miguel Cervantes Ramírez

Mexicali, Baja California. Agosto de 2013.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

A la Universidad Autónoma de Baja California (UABC).

Al Instituto de Ciencias Agrícolas (ICA).

A mi director de tesis, Dr. Benedicto Alfonso Araiza Piña, por su dirección y apoyo incondicional en el desarrollo de este trabajo y ser un buen guía desde antes de iniciar la maestría.

A la Dra. Adriana Morales Trejo, por su objetividad y valiosas sugerencias en este trabajo.

Al Dr. Miguel Cervantes, por sus valiosas aportaciones, comentarios en todo el desarrollo tanto de la maestría como en la de este trabajo.

Al Dr. Ramón Miguel Molina Barrios, por su valioso aporte y apoyo en este trabajo y sobre todo por ser un gran amigo y profesor desde mi formación profesional.

A mis compañeros del Cuerpo Académico de Nutrición Animal: Dalila, Gilberto, Nely, Lorenzo y Margarita, por su gran apoyo brindado y experiencias.

.....Muchas gracias!

Este trabajo de investigación fue financiado por la 14va Convocatoria interna de la Universidad Autónoma de Baja California, modalidad cuerpos académicos.

DEDICATORIA

A DIOS.

A mis padres, por su gran amor y la formación que me siguen dando....

A mis hermanos, porque los cuatro siempre nos hemos apoyado, por nuestro amor y unión....

A toda la familia, por quienes ya no están físicamente, pero que siguen siendo un gran ejemplo e inspiración; por los que están y por su lucha nos transmiten las fuerzas de seguir con la frente en alto....

A mis grandes amigos (carnales y carnalas): Casandra, Yeya, Rolando, Win, Inés, Cecy, Joaquín, Héctor, Ricardo, Nestor y Ariel.

A mis amigos del posgrado: Tere, Raquel, Sacra, Liz, Tavo, Nibardo, Rodrigo, Claudia, Angel y Ricardo Vicente.

A las personas con las que he trabajado, por su gran apoyo y fuente de inspiración: Álvaro Franco, Sandra Peña, Jason Pooley, Juan Pedro Romero, Claudia Campos, Louisa Elliot y Kiley Allen.

Sinceramente, Edgar Osvaldo.

RESUMEN

En el presente trabajo, se evaluó el efecto de la inclusión de arginina, glutamina y la combinación de ambos aminoácidos a dietas para lechones recién destetados sobre su comportamiento productivo, integridad del epitelio de intestino delgado y la expresión de enzimas relacionadas con la síntesis de poliaminas, ornitina descarboxilasa (ODC) y espermidina/espermina-N¹-acetiltransferasa (SSAT) en mucosa. Se utilizaron 100 lechones (Large White X Landrace X Duroc) con un peso inicial de 6.03 ± 0.12 kg al destete, la unidad experimental fue de 5 lechones, distribuidos en bloques completos al azar en cuatro tratamientos: T1, Dieta base trigo-pasta de soya (TPS); T2, TPS + 0.8% de glutamina (Gln); T3, TPS +0.8 de arginina (Arg); T4, TPS + 0.8% de Gln + 0.8% de Arg. En el comportamiento productivo, la adición de Gln, Arg y Gln + Arg, incrementaron ($P=0.055$, $P=0.006$ y $P=0.001$, respectivamente) la ganancia diaria de peso (GDP) al día 7 posdestete; pero al día 14, la dieta suplementada con glutamina, tuvo un efecto negativo ($P=0.054$), con una GDP 33% menor al testigo. Se tomaron muestras de duodeno y yeyuno, previa eutanasia de lechones seleccionados al azar. En cada muestra de tejido se analizó la expresión de ODC y SSAT, así como los índices: altura de las vellosidades (AV) y profundidad de las criptas. La expresión de ODC en duodeno, en la dieta con a Arg, tuvo una disminución ($P=0.04$) del 55.93%, en comparación con la expresión con la dieta TSP. En el análisis histológico, en duodeno, la dieta con Gln + Arg al día 3, mostró una menor pérdida ($P<0.05$) de la continuidad de las vellosidades (37%); al día 7, se empieza a observar la regeneración de las vellosidades, siendo el tratamiento con Gln el que tuvo una mejor ($P<0.05$) recuperación en la longitud de vellosidades. En conclusión, la expresión de ODC en duodeno se disminuye con la adición de Arg; la adición de Arg más Gln a la dieta, mejora la GDP en la primer semana posdestete y con respecto a la morfología de intestino delgado, se observa una menor pérdida en la AV en duodeno al día 3; mientras que al día 7 con la adición de Gln se observa una pronta recuperación de la altura de vellosidades.

CONTENIDO

COMITÉ PARTICULAR.....	i
RESUMEN	iv
ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
1. INTRODUCCIÓN	10
2. REVISIÓN DE LITERATURA	12
2.1. Destete.....	12
2.1.1. Edad	12
2.1.2. Estrés.....	13
2.1.3. Alimentación	13
2.1.4. Cambio de dieta.....	14
2.2. Intestino delgado de lechones.....	15
2.2.1. Histología.....	16
2.2.2. Barrera intestinal.....	17
2.2.3. Daños	18
2.2.4. Respuesta al daño intestinal.....	19
2.3. Aminoácidos.....	19
2.3.1. Aminoácidos esenciales condicionales.....	20
2.3.2. Funcionales	21
2.4. Glutamina.....	22
2.4.1. Funciones fisiológicas.....	23
2.4.2. Digestión y absorción.....	24
2.5. Arginina	25
2.5.1. Metabolismo	25
2.5.2. Precursor de ornitina.....	26
2.6. Poliaminas	27
2.6.1. Funciones e importancia.....	27
2.6.2. Precursores y síntesis.....	28
2.7. Interacción e importancia de ornitina descarboxilasa y de espermina- espermidina acetiltransferasa	28

3. HIPÓTESIS	31
4. OBJETIVO.....	31
4.1 General	31
4.2 Específicos.....	31
5. MATERIALES Y MÉTODOS	33
5.1 Animales y manejo.....	33
5.2. Dietas y diseño experimental	33
5.3. Variables de respuesta	35
5.4. Eutanasia y toma de muestras.....	35
5.5. Análisis de laboratorio.....	35
5.5.1. Extracción del ARN total	36
5.5.2. Transcripción Reversa (RT).....	36
5.5.3. Reacción en cadena de la polimerasa en punto final.....	37
5.5.4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real	38
5.6. Morfología del intestino delgado	40
5.7. Análisis estadístico.....	40
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	42
6.1. Comportamiento productivo	42
6.2. Expresión relativa de ARNm para las enzimas ODC y SSAT	44
6.3. Morfología intestinal (histología)	46
7. CONCLUSIÓN	50
8. LITERATURA CITADA.....	51

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Composición y análisis de las dietas experimentales.....	34
Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados para la expresión de los ARNm de las enzimas ornitina descarboxilasa (ODC), espermina/espermidina acetiltransferasa (SSAT) y ARN ribosomal 18s (RIB).....	37
Cuadro 3. Programa usado para la técnica de PCR punto final.....	37
Cuadro 4. Ganancia diaria de peso (GDP), consumo de alimento (CDA) y conversión alimenticia (CA) de lechones destetados, alimentados con las dietas experimentales.....	44
Cuadro 5. Expresión relativa del gen de ornitina descarboxilasa (ODC) y espermina/espermidina acetiltransferasa (SSAT), en duodeno y yeyuno.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología del epitelio intestinal... ..	17
Figura 2. Ruta metabólica para la síntesis de poliaminas.....	30
Figura 3. Altura de vellosidades (A) y profundidad de criptas (B) en duodeno de lechones a los días: 0, 3 y 7, sometidos a diferentes tratamientos o dietas: testigo, Gln, Arg y Gln + Arg (P<0.05).....	48
Figura 4. Altura de vellosidades (C) y profundidad de criptas (D) en yeyuno de lechones a los días: 0, 3 y 7, sometidos a diferentes tratamientos o dietas: testigo, Gln, Arg y Gln + Arg (P<0.05).....	49

1. INTRODUCCIÓN

Los lechones destetados antes de los 21 días de nacidos, consumen poco alimento durante la primera semana posdestete, además de que presentan diarreas y pierden peso. Una de las causas de los efectos negativos del destete precoz es la atrofia de las vellosidades de intestino delgado, presentándose una mayor descamación de las células intestinales en relación a la renovación del intestino, la cual es insuficiente, dando como resultado una menor superficie de absorción y a la vez traduciéndose a un crecimiento retardado, aunado a esto los agentes patógenos pueden agravar el problema. El intestino delgado de lechones es muy importante, ya que al mantenerlo integro, con el menor daño por efectos del destete brinda un óptimo desarrollo, reflejándose en la productividad de la granja.

Las poliaminas participan en el crecimiento, división celular, y tienen un papel muy importante en la maduración y renovación del intestino. La arginina sirve de sustrato para la síntesis de poliaminas, ya que de esta se puede sintetizar ornitina, de ella putrescina, y a partir de esta última las poliaminas espermidina y espermina. La arginina es un aminoácido esencial para los lechones y su aporte en el alimento puede ser deficiente. A partir de prolina y glutamina se puede sintetizar arginina en las células del intestino delgado pudiendo satisfacer los requerimientos de arginina. Glutamina modula la expresión de genes que regulan el metabolismo de nutrientes y la supervivencia celular, en los cuales se incluye

ornitina descarboxilasa (ODC), la cual es una enzima clave para la conversión de ornitina en poliaminas, que estimulan la síntesis de ADN y proteínas. El objetivo de este estudio fue evaluar la adición de glutamina y arginina cristalinas y la interacción de ambos aminoácidos a dietas para lechones recién destetados, en su comportamiento productivo, histología de intestino delgado y la expresión de genes que codifican las enzimas involucradas en la síntesis de arginina y poliaminas en los enterocitos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Destete

El destete, es la etapa donde el lechón es retirado de su madre, dando por terminada la etapa de lactancia; este también involucra el cambio a una sala de destete o área de iniciación. El desarrollo de la capacidad digestiva del lechón es complejo y varía dependiendo de la edad cronológica, edad al destete y composición de la dieta de iniciación. La función digestiva y absorción de nutrientes tienden a desarrollarse de acuerdo a señales fisiológicas y dietéticas. Los cambios morfológicos por el destete, en el intestino delgado, están asociados más con la actividad enzimática que con la absorción de nutrientes (Miller *et al.* 1986).

2.1.1. Edad

El destete natural puede llegar a ocurrir cuando el lechón tiene de 10 a 12 semanas de edad, que es cuando la producción de leche por parte de la marrana disminuye y se vuelve insuficiente para el mantenimiento y desarrollo de los lechones. Sin embargo, debido a la productividad en la industria porcina, los lechones son destetados a las 3 ó 4 semanas de edad, considerándose un destete temprano, el cual requiere de una mayor atención en el manejo y la nutrición;

tomando en cuenta que los anticuerpos maternos están presentes en niveles óptimos hasta los 21 días de edad (Fangman, 1997).

2.1.2. Estrés

El destete es una etapa crítica del crecimiento posnatal y desarrollo intestinal en los mamíferos, incluyendo a los cerdos (Fan, 2003). La transición de un destete temprano es comúnmente asociado a un mayor cuidado de los lechones hasta que pasan a la fase de crecimiento (Maxwell y Carter, 2001), incrementa la aparición de enfermedades entéricas y diarrea (Gaskins, 1995) y disminuye la capacidad digestiva (Fan, 2003). También se asocia a un bajo consumo de alimento, contribuyendo a las alteraciones en la estructura de la mucosa intestinal y funciones de absorción de nutrientes en los lechones (Kelly *et al.*, 1991; Pluske *et al.*, 1997).

En adición al tipo de dieta, los factores sociales, el estrés debido a la separación de la marrana y el cambio de instalaciones en un nuevo ambiente colectivo, contribuyen a los cambios en la integridad de la mucosa intestinal (Pluske *et al.*, 1997; Bruininx *et al.*, 2001). Además suele presentarse una pérdida progresiva de peso en la primera semana posdestete.

2.1.3. Alimentación

El almidón es la principal fuente de energía en las dietas de cerdos (Vicente *et al.*, 2009). El maíz es el cereal más comúnmente usado en las dietas de destete en el mundo porque es bajo en fibra y con un alto contenido de energía (Parera *et al.*, 2010). El trigo, también es usado en las dietas de cerdos predominantemente como fuente de energía (Kim *et al.*, 2005).

La pasta de soya es el ingrediente usado como una fuente de proteína en dietas para especies no ruminantes, porque es relativamente alta en proteína (44 a 49%), posee un excelente perfil de aminoácidos (AA) y es de suministro confiable (Kim *et al.*, 1999; Cromwell, 2000); sin embargo, la pasta de soya contiene cantidades variadas de inhibidores de tripsina y otros factores antinutricionales que reducen el desempeño productivo, especialmente en la etapa de inicio (Parera *et al.*, 2010). Las dietas comerciales para lechones en un destete temprano actualmente contienen relativamente poca pasta de soya (Lenehan *et al.*, 2007).

2.1.4. Cambio de dieta

Es común que en los lechones, varias horas después del destete, el consumo de alimento sea poco o nulo. Una vez iniciado el destete, el sistema digestivo tiene que irse adaptando a una dieta sólida, es por eso que las dietas para lechones deben ser de alta digestibilidad para evitar la llegada de un exceso de sustrato fermentable al intestino grueso y deben ir exentas de sustancias que puedan agravar este hecho.

El sabor juega un papel clave en el consumo de alimento, siendo especialmente importante cuando el apetito está reprimido por alguna razón, como lo es el destete (Hellekant y Danilova, 1999). El proveer un edulcorante en el alimento antes y después del destete puede mejorar las visitas efectivas al comedero, mejorando el consumo alimenticio y desempeño productivo en etapas posteriores de crecimiento (Sterk, *et al.*, 2008).

2.2. Intestino delgado de lechones

El intestino delgado se divide anatómicamente en tres porciones duodeno, yeyuno e íleon. Histológicamente, el intestino está constituido por mucosa, submucosa, muscular y serosa (Ferrufino *et al.*, 1996). Los cambios adversos en la morfología intestinal incluyen acortamiento y cambio en la forma de las vellosidades, de tener la forma de dedos, pasa a forma de lengua, con una hiperplasia de células en las criptas y el incremento en la mitosis de células epiteliales (Nabuurs, 1991; van Beers-Schreurs, 1996).

Los cambios morfológicos intestinales pueden provocar una disminución de las funciones intestinales, reflejándose en la actividad enzimática (Pluske, 2001) del borde de cepillo y en la habilidad de absorción (Kenworthy y Allen, 1966; Smith, 1984; Hampson y Kidder, 1986; Miller *et al.*, 1986; Li *et al.*, 1991b; Nabuurs, 1991; Vente Spreeuwenberg *et al.*, 2003), que luego resulta en diarrea y bajo rendimiento de los cerdos recién destetados.

Varios estudios han demostrado una reducción en la altura de las vellosidades (atrofia de las vellosidades) y un aumento de la profundidad de las criptas (hiperplasia de las criptas) después del destete (Hampson 1986; Miller *et al.*, 1986; Cera *et al.*, 1988; Dunsford *et al.*, 1989; Kelly *et al.*, 1990, 1991a, b; Li *et al.*, 1990, 1991a, b; Nabuurrs *et al.*, 1993a, b; Markkink *et al.*, 1994; van Beers-Schreurs, 1995; Pluske *et al.*, 1996a, b).

2.2.1. Histología

El revestimiento del lumen de intestino delgado, está compuesto de muchas proyecciones en forma de dedos llamadas vellosidades, mientras que las microvellosidades son proyecciones de las células del epitelio intestinal. La función de las vellosidades y microvellosidades es aumentar la superficie de absorción. La vellosidad está recubierta principalmente por células de la absorción llamadas enterocitos y células caliciformes productoras de moco. Las criptas de Lieberkuhn (o simplemente "criptas") son depresiones tubulares encontradas entre las vellosidades (Figura 1) y son la fuente de nuevas células que migran a la vellosidad (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).

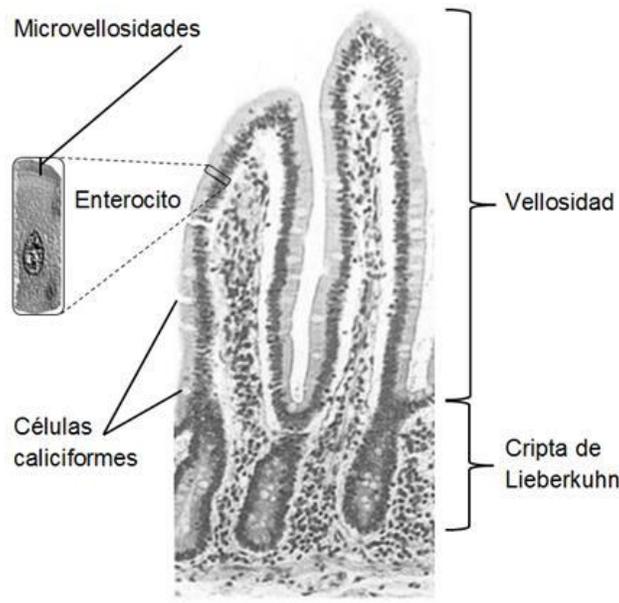


Figura 1. Morfología del epitelio intestinal.

Las vellosidades y parte de las criptas están recubiertas por enterocitos (células de absorción) que constituyen arriba del 90% de las células epiteliales en la cripta y más del 95% de células de las vellosidades (Cheng y Leblond, 1974). El estudio de la diferenciación del enterocito en neonatos es complicado, debido a los cambios en el desarrollo asociado con los efectos de la dieta y genética del individuo (Henning *et al.*, 1994). 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).

2.2.2. Barrera intestinal

Las células del epitelio intestinal están conectadas por estrechas uniones que ayudan a bloquear la transferencia paracelular de materiales del lumen intestinal. El incremento en la expresión de proteínas que forman las uniones puede reforzar la barrera intestinal y mejorar la salud animal. Diferentes tipos de estrés, como al calor (Hall *et al.*, 2001; Lambert *et al.*, 2002) y antígenos bacterianos (Pérez-Bosque *et al.*, 2006), debilitan estas uniones, permitiendo que toxinas y patógenos en el lumen entren al tejido (Liu *et al.*, 2013).

La colonización de diferentes porciones del tracto intestinal por microorganismos probióticos es la primera barrera de defensa contra la invasión de agentes patógenos, esta colonización es considerada como una importante característica para la salud del hospedador (Lee *et al.*, 2003). Las células epiteliales del intestino están cubiertas por una capa relativamente gruesa (400 μ m) de moco que consiste en mucina, que es una glicoproteína, además participan un gran número de pequeñas glicoproteínas, proteínas, glicolípidos y lípidos (Piel *et al.*, 2004).

2.2.3. Daños

El destete de los lechones a edad temprana, también se asocia a un menor crecimiento o pérdida de peso, con cambios muy marcados en la histología del intestino delgado, principalmente atrofia de las vellosidades (Pluske *et al.*, 1997). La atrofia de las vellosidades es causada por el incremento en la pérdida de células y/o por la tasa baja de renovación celular en el intestino, esto causa una

disminución en la capacidad de digestión y absorción. Smith (1984), demostró que los cambios histológicos son inducidos en la mucosa del intestino delgado de cerdos sometidos a un destete temprano, ya que al destetar a las 2 semanas de edad, se disminuye la longitud de las vellosidades e incrementa la profundidad de las criptas.

2.2.4. Respuesta al daño intestinal

Cuando se daña la integridad de la mucosa del intestino delgado, esta tiene la habilidad de repararse por sí misma rápidamente. Una mayor proliferación de células en la cripta, reemplazará las células perdidas y restaurará la arquitectura de vellosidades, así como la función de digestión y absorción de nutrientes (Blikslager *et al.*, 1997; Ray *et al.*, 2005; Blikslager *et al.*, 2007). Se presenta también un incremento en las actividades de biosíntesis de citrulina y poliaminas (Wu *et al.*, 2000a; Wu *et al.*, 2000b). Además, por efecto de la adaptación a esta nueva etapa, se originan cambios en la expresión génica de la mucosa intestinal de manera única por individuo (Lackeyram *et al.*, 2010).

2.3. Aminoácidos

Basándose en el crecimiento o balance de nitrógeno (es decir, síntesis neta de proteínas en todo el cuerpo), los aminoácidos (AA) tradicionalmente han sido clasificados como nutricionalmente esenciales (indispensables) o no esenciales

(dispensables) para animales y humanos (Baker, 2009; Wu, 2009). Los AA nutricionalmente esenciales (AAE) son aquellos que no son sintetizados por las células animales, por lo tanto, deben ser suministrados a través de la dieta. La esencialidad dietética de algunos AA (por ejemplo, arginina, glicina, prolina y taurina) depende de la especie y la etapa de desarrollo (Wu, 2009). En contraste, los AA no esenciales (AANE) son todos aquellos que son sintetizados de novo de una manera dependiente de la especie (Watford, 2008; Wu *et al.*, 2009).

Sin mucha evidencia, se supone que los animales o los seres humanos podrían sintetizar cantidades suficientes de todos AANE y no se necesitan en la dieta para la nutrición y salud óptima, sin embargo, la evidencia creciente en cultivo celular y estudios en animales muestran que algunos AA clasificados tradicionalmente como AANE (por ejemplo, glutamina, glutamato y arginina) desempeñan papeles importantes en múltiples vías de señalización, regulando la expresión de genes, recambio proteico intracelular, metabolismo de nutrientes, y la defensa oxidativa (Brasse-Lagnel *et al.*, 2009; Bruhat *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2008).

2.3.1. Aminoácidos esenciales condicionales

Los aminoácidos esenciales condicionales (AAEC), son los que normalmente pueden estar sintetizados en cantidades adecuadas por el organismo, pero deben incluirse en la dieta para satisfacer las necesidades en condiciones donde son mayores los índices de utilización, a los índices de

síntesis. Igualmente, las necesidades funcionales en la prevención de enfermedades deben ser un criterio importante para su clasificación en esenciales o esenciales condicionales (Cynober, 2004; Wu, 2009). Glutamina y arginina son considerados AAEC bajo estados hipermetabólicos como ocurre en el destete (Chamorro *et al.*, 2010).

2.3.2. Funcionales

Aminoácidos funcionales (AAF), son aquellos que regulan las vías metabólicas claves para mejorar la salud, supervivencia, crecimiento, desarrollo, lactancia, y reproducción de organismos (Wu, 2009). Una deficiencia de AAF (ya sea AAE o AANE) no sólo afecta la síntesis de proteínas, sino también la homeostasis de todo el cuerpo. Cabe destacar, que al suplementar AAF específicos (por ejemplo, glutamina o arginina) a una dieta convencional, que tradicionalmente se pensaba aportaba los AA adecuados, puede maximizar el potencial de crecimiento en animales jóvenes (Wu, 2009; Wu, 2010; Wu *et al.*, 2004) y la prevención de enfermedades (por ejemplo, la obesidad, diabetes y enterocolitis necrosante) en animales y seres humanos (Wu *et al.*, 2009). El potencial de los AAF (ya sea AAE o AANE) para estimular la síntesis de proteínas indica que juegan papeles reguladores importantes más allá de servir como bloques de construcción de proteínas (Wu, 2010).

2.4. Glutamina

Los químicos saben desde hace más de un siglo sobre L-glutamina (Gln) como un AA neutro que contiene 2 átomos de nitrógeno por molécula (peso molecular = 146.15). Se obtuvo primero a partir de jugo de betabel en 1883, primer aislado a partir de una proteína (edestina) en 1932 y por primera vez fue sintetizada químicamente en 1933 (Meister, 1965). Sin embargo, Gln tradicionalmente no ha sido considerada como un nutriente esencial en las dietas para ganado (Maynard *et al*, 1979; Bondi, 1987).

Se mencionan dos razones principales que explican el por qué Gln se ha ignorado por mucho tiempo en la nutrición animal: primera, hay dificultades técnicas en el análisis de Gln en proteínas y alimentos para animales, porque Gln está completamente convertida en glutamato bajo las condiciones estándar de hidrólisis ácida (es decir, HCl 6 M, 110 ° C, y 24 h; Wu y Knabe, 1994); en segunda, las generaciones de los nutricionistas de animales tenían poco conocimiento sobre Gln porque no se les había enseñado acerca de este nutriente (Wu *et al.*, 2010). De acuerdo a los avances en los métodos de análisis y de investigación bioquímica, ahora se sabe que Gln es particularmente abundante en los fluidos fisiológicos (por ejemplo, el plasma, el citoplasma, la leche, fluidos fetales; Wu, 2009) y tanto las proteínas vegetales como animales (Li *et al.*, 2010). En efecto, Gln es un combustible metabólico importante para la rápida división celular (Rhoads y Wu, 2009).

2.4.1. Funciones fisiológicas

Las funciones fisiológicas de Gln incluyen su participación en múltiples vías metabólicas, así como en la regulación de la expresión de genes y la transducción de señales. L-glutamina es un sustrato de energía, importante para una división celular rápida de los enterocitos, linfocitos (inmunológicamente desafiados) y otros tipos celulares, proporciona ATP para el recambio proteico intracelular; el transporte de nutrientes a través de la membrana plasmática, crecimiento y migración celular, así como el mantenimiento de la integridad de las células (Curi *et al.*, 2005).

Es importante tener en cuenta que Gln es un AA importante para la síntesis endógena de citrulina y Arg en la mayoría de los mamíferos, como los cerdos, a través del eje intestinal-renal (Wu y Morris, 1998). Esta ruta sintética compensa: 1) una deficiencia de Arg (un AA nutricionalmente esencial para cerdos jóvenes) en la leche durante el período de lactancia y 2) el extenso catabolismo de Arg dietética por el intestino delgado de los animales destetados (Wu *et al.*, 2009).

Glutamina modula la expresión de genes que regulan el metabolismo de nutrientes y la supervivencia celular (Curi *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008a; Brasse-Lagnel *et al.*, 2009). Estos genes incluyen los de ornitina descarboxilasa (ODC) y el óxido nítrico (ON) sintasa (ONS) en múltiples tipos de células (Kwon *et al.*, 2004; Rhoads y Wu, 2009). ODC es una enzima clave para la conversión de

ornitina en poliaminas, que estimulan la síntesis de ADN y proteínas (Wu *et al.*, 2009).

2.4.2. Digestión y absorción

Las proteínas de la dieta son hidrolizadas por las proteasas en los fluidos lumbinales del estómago (pepsina A, B, C y renina; pH óptimo de 2 a 3) y de intestino delgado (tripsina, quimotripsina, elastasa, carboxipeptidasas A, B y aminopeptidasa; pH óptimo de 6 a 7.5) para formar dipéptidos, tripéptidos (que contienen Gln) y glutamina libre. El medio alcalino en el lumen de intestino delgado resulta de las sales biliares, jugo pancreático y las secreciones duodenales. Prolidasa, una peptidasa derivada de la mucosa (en el caso de péptidos que contienen tanto Gln como prolina) puede hidrolizar los péptidos pequeños lumbinales para dejar Gln libre. Además, los dipéptidos o tripéptidos que contiene Gln en el lumen del intestino delgado pueden ser transportados directamente a los enterocitos a través de su membrana apical por transportadores de péptidos de gradiente de H^+ 1 (PepT1; Daniel, 2004).

Aproximadamente el 67% de Gln en la dieta es utilizado por el intestino delgado (es decir, células de la mucosa, más microorganismos lumbinales) en los cerdos, la Gln restante entra en la circulación portal (Stoll y Burrin, 2006; Wu *et al.*, 2010a).

2.5. Arginina

La arginina (Arg) es clasificada como AA semiesencial o esencial condicional en mamíferos porque la habilidad del cuerpo para sintetizar cantidades suficientes que satisfagan sus necesidades, varía de acuerdo a la edad y a la incidencia de diarrea (Morris, 2004). Es sintetizada a partir de citrulina por la acción secuencial de las enzimas arginosuccinato sintasa y argiosuccinato liasa en citoplasma. A su vez la citrulina puede ser derivada de fuentes como: prolina o glutamina/glutamato (Morris, 2004). Además Arg se sintetiza vía eje intestinal-renal en humanos, cerdos, ovejas y ratas. La degradación de arginina ocurre a través de múltiples rutas metabólicas en las cuales se produce óxido nítrico, poliaminas, prolina, glutamato, creatina y agmatina, las cuales tienen una gran importancia biológica (Wu *et al.*, 2009).

2.5.1. Metabolismo

La base metabólica para el crecimiento submáximo de los lechones amamantados es desconocida, pero puede ser debido a una ingesta inadecuada de proteína (o un aminoácido esencial) y/o energía. Curiosamente, se ha demostrado recientemente que la arginina (un aminoácido esencial para los recién nacidos) es notablemente deficiente en la leche de la cerda en base a la proporción lisina-arginina contenida en la leche y en el cuerpo lechón (Wu *et al.*, 1994; Lewis *et al.*, 1994). Por ejemplo, en base al aporte de Arg a partir de leche de la cerda (1.06 g/d) y el requerimiento de los lechones (2.7 g/d, con base a la

acumulación de arginina en proteínas más su catabolismo), se estimó que la leche de cerda proporciona 40% del requerimiento diario total de arginina en lechones de 7 días de edad (Wu y Knabe, 2000).

Los enterocitos son casi las células exclusivas para la síntesis de citrulina y arginina a partir de glutamina y prolina en lechones (Wu *et al.*, 1994; Wu y Knabe, 1995; Wu, 1997). Paradójicamente, la síntesis intestinal de citrulina y arginina disminuye de un 60 a 75% en cerdos de 7 días de edad en comparación con los cerdos recién nacidos, y declina aún más de los 14 a los 21 días de edad (Flynn *et al.*, 2000).

2.5.2. Precursor de ornitina

Arginina, que es hidrolizada por la enzima arginasa, es la responsable de la formación de la ornitina y la urea. Lo cual desempeña un papel esencial en la síntesis de urea hepática e intestinal a partir del amoníaco, así como el abastecimiento de la ornitina para la síntesis de prolina, glutamato y poliaminas (Wu *et al.*, 1998; Jobgent *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2009). Así mismo, las poliaminas (putrescina, espermidina, y espermina) son esenciales para la proliferación, la diferenciación y la migración de células en mamíferos, incluyendo las células del epitelio intestinal (Cheng *et al.*, 2006).

2.6. Poliaminas

Las poliaminas son esenciales para el crecimiento y proliferación de las células epiteliales del intestino, tienen un rol muy importante en la maduración y renovación del intestino (Johnson, 1988). El calostro y la leche de las cerdas contienen las poliaminas: putrescina, espermidina y espermina, contribuyen en la maduración del intestino de los lechones mientras están con la marrana (Cheng *et al.*, 2006). Al destete, la menor concentración o la total ausencia de las poliaminas en la dieta de lechones, puede ser la causa de los cambios observados en la función y estructura del intestino posdestete (Wu *et al.*, 2000).

Se considera a las poliaminas como moléculas policatiónicas nitrogenadas presentes en todos los organismos vivos, son el 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).

2.6.1. Funciones e importancia

Las poliaminas son esenciales para la reparación de daños en las células epiteliales de estómago e intestino delgado. Bajo condiciones de estrés, la actividad de enzima Ornitina descarboxilasa aumenta y se inicia la síntesis de poliaminas (Banan *et al.*, 1998); Flynn *et al.* (2009), demuestran que en

condiciones de estrés, el cortisol incrementa la síntesis de poliaminas a partir de arginina, prolina y ornitina. Las poliaminas también se involucran en una amplia variedad de funciones biológicas como la estabilización del ADN, modulación de la expresión génica y la regulación de síntesis de proteínas a través de la señalización para la transducción, además su papel en el crecimiento y la diferenciación celular (Wang, 2005; Wang *et al.*, 2004).

2.6.2. Precursores y síntesis

Arginina es un precursor para la síntesis, no sólo de las proteínas, sino también de óxido nítrico (ON), urea, creatina, glutamato, prolina, agmatina y poliaminas (Wu y Morris, 1998; Tenenbaum *et al.*, 1998).

2.7. Interacción e importancia de ornitina descarboxilasa y de espermina-espermidina acetiltransferasa

Ornitina es descarboxilada por la ornitina descarboxilasa (ODC) para producir putrescina (Figura 2), que se convierte secuencialmente en espermidina y espermina por espermidina-espermina sintasa, utilizando los residuos de aminopropilo con la acción de S-adenosil metionina descarboxilasa. Todas estas reacciones son irreversibles en la práctica. Sin embargo, otras enzimas pueden convertir espermidina y espermina de nuevo a putrescina en células de mamíferos. En esta vía, citosólica espermina/espermidina N1-acetiltransferasa

(SSAT) primero acetila a espermina o espermidina a sus derivados acetilo que, oxidados por la poliamina oxidasa, pasan a espermidina de espermina y a putrescina de espermidina (Figura 2; Wu y Morris, 1998; Pegg, 1986). Además, la importación de poliaminas celulares y de su exportación hacia el espacio extracelular contribuye, en caso necesario, a la regulación de los niveles de poliaminas individuales en los tejidos (Seiler *et al.*, 1996).

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). La enzima SSAT, participa en la regulación de la concentración intracelular de las poliaminas espermina, espermidina y putrescina (Wang *et al.*, 2004), y es un factor limitante en la tasa de degradación de poliaminas (Wang, 2005).

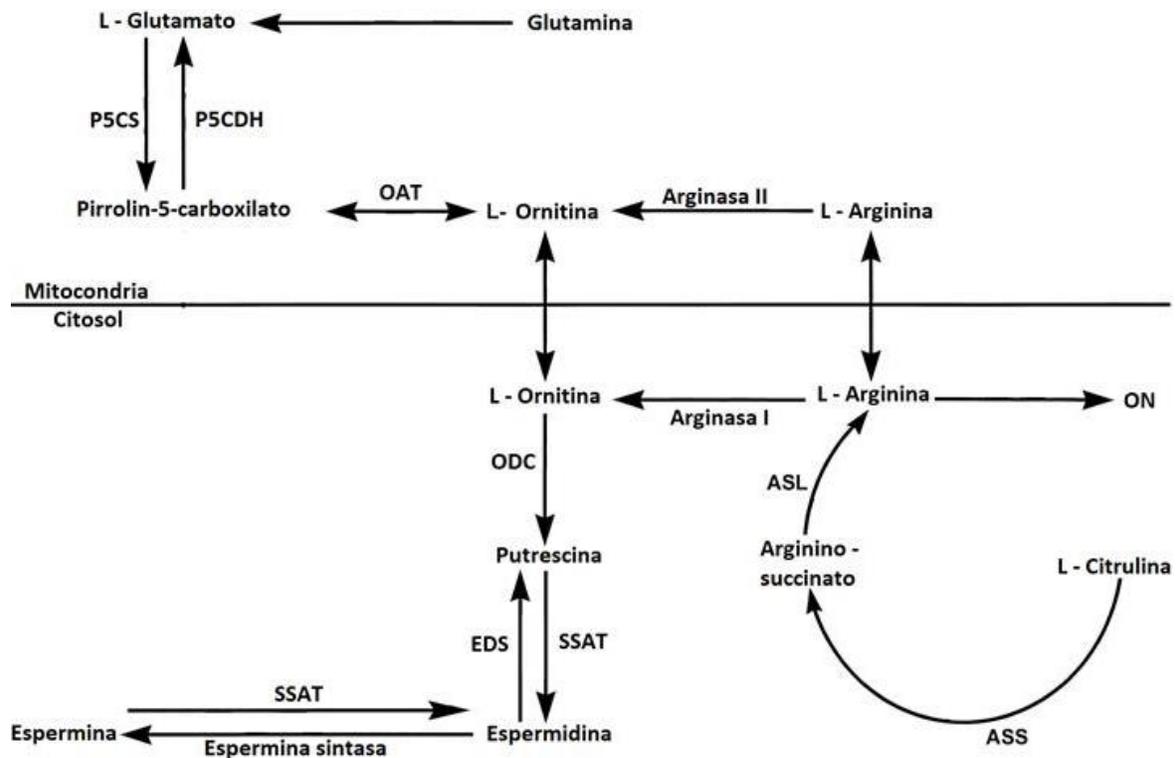


Figura 2. Ruta metabólica para la síntesis de poliaminas. ASS, argininina succinato sintasa; ASL, argininina succinato liasa; OAT, ornitina aminotransfersa; ODC, ornitina descarboxilasa; ON, óxido nítrico; P5DH, pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa; P5CS, pirrolina-5-carboxilato sintasa; SSAT, espermidina/espermina-N1-acetiltransferasa. (Fang *et al.*, 2002).

3. HIPÓTESIS

La adición de L-arginina y glutamina a dietas trigo-pasta se soya para lechones destetados, modifica el comportamiento productivo de los mismos, la morfología intestinal (vellosidades y criptas) y la expresión de las enzimas ornitina descarboxilasa y espermina/espermidina acetiltransferasa en enterocitos.

4. OBJETIVO

4.1 General

Evaluar el efecto de la inclusión de diferentes niveles dietéticos de arginina, glutamina y la combinación de ambos aminoácidos sobre el comportamiento productivo, integridad del epitelio de intestino delgado y la expresión de enzimas relacionadas con la síntesis de poliaminas en lechones recién destetados.

4.2 Específicos

Evaluar el comportamiento productivo de cerdos en etapa de destete alimentados con dietas a base trigo-pasta de soya adicionadas con diferentes niveles de arginina y glutamina.

Comparar a nivel histológico la respuesta a la adición de arginina y glutamina en intestino delgado (duodeno y yeyuno), a través de los índices: altura de vellosidad y profundidad de criptas.

Determinar en cerdos de destete la expresión ARN mensajeros de enzimas claves en el metabolismo de poliaminas ornitina descarboxilasa y espermina/espermidina acetiltransferasa en enterocitos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en la Unidad Experimental Porcina en el área Fisiología y Metabolismo del Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, ubicada en el Ejido Nuevo León, Mexicali, Baja California (32°24'25.00" N, 115°12'04.14" W).

5.1 Animales y manejo

Se utilizaron 100 lechones Yorkshire x Landrace x Duroc (peso corporal de 6.03 ± 0.12 kg, media \pm E.E.) de la Unidad experimental porcina del Instituto de Ciencias Agrícolas; destetados a los 21 días de edad distribuidos en bloques completos al azar en cuatro tratamientos en base a su peso inicial (al destete), sexo y camada. Estos animales se alojaron en corrales (1.2 X 1.1 m), equipados con bebederos automáticos con agua y alimento *ad libitum*; cinco lechones por corral y cinco corrales por tratamiento. Los efectos principales fueron la adición de arginina (0.8%), glutamina (0.8%) y arginina + glutamina (0.8 + 0.8%). La temperatura de la sala se mantuvo a $26 \pm 5^\circ\text{C}$. Se monitoreó el consumo diario de alimento (CDA), ganancia diaria de peso (GDP) y la eficiencia alimenticia (EA).

5.2. Dietas y diseño experimental

Las dietas experimentales (cuadro 1) fueron formuladas a base TPS, para cubrir los requerimientos para cerdos en la etapa de iniciación con un rango de 5 a 10 kg de peso vivo (NRC, 1998). Los tratamientos fueron: dieta testigo de TPS; dieta glutamina (TPS + 0.8% Gln); dieta arginina (TPS + 0.8% Arg) y dieta Gln + Arg (TPS + 0.8% Gln + 0.8% Arg).

Cuadro 1.- Composición de las dietas experimentales.

Ingredientes (%)	Dietas			
	Testigo	Glutamina	Arginina	Gln+ Arg
Trigo	63.90	63.90	63.90	63.90
Almidón	1.60	0.80	0.80	0
Aceite	0.50	0.50	0.50	0.50
Pasta de soya	30.00	30.00	30.00	30.00
Glutamina	0	0.80	0	0.80
Arginina	0	0	0.80	0.80
Lisina	0.45	0.45	0.45	0.45
Treonina	0.18	0.18	0.18	0.18
Metionina	0.06	0.06	0.06	0.06
Carbonato de calcio	1.32	1.32	1.32	1.32
Ortofosfato	1.24	1.24	1.24	1.24
Sal yodatada	0.25	0.25	0.25	0.25
Premezcla vitaminas*	0.40	0.40	0.40	0.40
Antibiótico	0.10	0.10	0.10	0.10
Total	100.00	100.00	100.00	100.00
Análisis calculado				
EM, Mcal/kg	3.19	3.19	3.19	3.19
Proteína, %	21.00	21.00	21.00	21.00
Lisina, %	1.43	1.43	1.43	1.43
Treonina, %	0.76	0.76	0.76	0.76
Metionina, %	0.32	0.32	0.32	0.32
Calcio, %	0.80	0.80	0.80	0.80
Fósforo, %	0.68	0.68	0.68	0.68
Fósforo disponible, %	0.40	0.40	0.40	0.40

*Premezcla de vitaminas compuesta por 3000 UI de Vitamina A, 300 UI de Vitamina D3, 30 UI de Vitamina E, 2 mg de Vitamina K, 1.8 mg de Tiamina, 0.11 de Vitamina B12, 3.6 mg de Riboflavina, 0.55 mg de Ac. Fólico, 0.15 mg de Biotina, 10 mg de Pantotenato de Ca y 35 mg de Niacina. Antibiotico (oxitetraclina).

5.3. Variables de respuesta

Los 100 cerdos se distribuyeron completamente al azar en cuatro tratamientos previamente mencionados, formando cinco repeticiones (bloques). Las variables de respuesta evaluadas fueron: GDP, CDA y EA. Las mediciones de peso vivo se realizaron los días 0, 3, 7 y 21; mientras que el consumo se monitoreo diariamente. La duración del experimento fue de 21 días.

5.4. Eutanasia y toma de muestras

Se utilizaron 8 unidades experimentales, divididas en 2 repeticiones en base a la distribución de los 4 tratamientos; al día 3 del experimento de campo, se sacrificó por eutanasia un cerdo por unidad experimental, para la posterior toma de muestras, al igual que para el día 7; mientras que para el día 0, se tomaron muestras de duodeno y yeyuno por cerdo por repetición. Para el análisis de biología molecular, la cantidad de la muestra fue de aproximadamente 0.5 g de tejido (mucosa intestinal), que se colocó en tubos de 2 ml previamente identificados, los cuales se guardaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a - 85°C. Para el análisis de histología, se tomaron secciones de duodeno y yeyuno que se conservaron en formol al 10%.

5.5. Análisis de laboratorio

5.5.1. Extracción del ARN total

La extracción del ARN, se realizó mediante la técnica de Trizol Reagent (Chomczynski and Sacchi, 1987). Se pulverizó aproximadamente 0.1 g de tejido en nitrógeno líquido, se agregó 1 ml de Trizol y se homogenizó, se prosiguió a centrifugar por 10 min a 10,000 rpm a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un tubo de 2 ml dejando reposar en hielo por 5 minutos. Para después añadir 0.2 ml de cloroformo, se mezcló y se dejó reposar por 3 min. Después se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, la fase acuosa fue transferida a un tubo estéril de 2 ml añadiendo 0.5 ml isopropanol, se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm a 4 °C. Se removió el sobrenadante para recuperar el sedimento (pastilla) y se le agregó 1 ml de etanol al 100%. Después, se centrifugó a 8,500 rpm a 4 °C, posteriormente se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla, la cual fue resuspendida con 35 µl de agua DEPC, por último en una cámara de electroforesis (BIORAD) se corrió un gel de agarosa al 1.2% para verificar la integridad del ARN.

5.5.2. Transcripción Reversa (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), 18.25 µl de agua tratada con DEPC (agua libre de DNAsa/ARNsa) en hielo, la reacción se incubó a temperatura ambiente 15 min y después 5 min a 70 °C en un heat-block, se agregó a la reacción 1 µl de random primer con una concentración de 0.15 µg/ml (Invitrogen), 1 µl de DNTP's

10 μ M, se incubó a temperatura ambiente 5 min, después se volvió a colocar en hielo mientras se añadió 2 μ l de buffer 5x, 3 μ l de DTT 0.1 M, 1 μ l de inhibidor de ARNsa 10 U/ μ l, se homogenizó y centrifugó (10 seg). A continuación la reacción, se incubó a 42 °C 2 min, se añadió la enzima transcriptasa reversa 200 U/ μ l (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.

5.5.3. Reacción en cadena de la polimerasa en punto final

Para determinar la calidad del ADN complementario (ADNc) se realizaron reacciones de PCR con oligonucleótidos específicos (cuadro 2). Como testigo se empleó el gen constitutivo ribosomal 18S, 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 μ l de MgCl (Fermentas), 5 μ l buffer 5X, 1 μ l DNTP's, 1 μ l de oligo sentido, 1 μ l de oligo antisentido, 3 μ l de cDNA, 35.5 de agua tratada con DEPC, y 0.5 μ l 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 3).

Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados para la expresión de los ARNm de las enzimas ornitina descarboxilasa (ODC), espermina/espermidina acetiltransferasa (SSAT) y ARN ribosomal 18s (RIB).

Secuencia del fragmento			
Gen	Sentido	Antisentido	Tamaño
ODC	GTCTGTTCGCCTCAGTGTCAA	CTGGCTCCGCTATGATTCTC	340 Kb
SSAT	AGTGCCAAGGAGCATCTAA	CCTCTGCTGCCATTTTTAGC	338 Kb
RIB	GGCCTCACTAAACCATCCAA	TAGAGGGACAAGTGGCGTTC	295 Kb

Cuadro 3. Programa usado para la técnica de PCR punto final.

Etapa	Tiempo hh:mm:ss	Temperatura °C
Desnaturalización inicial	00:05:00	95
40 ciclos:		
Desnaturalización	00:00:45	95
Alineación	00:00:45	56
Elongación	00:00:30	72
Elongación final	00:02:00	72
Incubación	indefinido	10

5.5.4. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

La expresión de las enzimas ODC y SSAT en duodeno y yeyuno de los animales en experimentación se analizó mediante la técnica cuantitativa de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Sambrook and Russell, 2001).

El equipo empleado para los análisis de PCR cuantitativo 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. La metodología a seguir fue en un espectrofotómetro se realizó la lectura a 260 nm para determinar la concentración de los ADNc obtenidos mediante el procedimiento de retrotranscripción. Una vez determinado los valores de concentración obtenidos se realizaron diluciones de los ADNc para homogeneizarlos 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 para SSAT y 3 μ l para ODC, 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 ODC y SSAT, 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.

5.6. Morfología del intestino delgado

Muestras de aproximadamente 5 cm de duodeno y yeyuno colectadas al día 0, 3 y 7 fueron empleadas para la determinación de morfología e integridad intestinal. El segmento de duodeno se colectó aproximadamente a 15 cm de distancia de la unión pilórica y aproximadamente a 60 cm de distancia de la unión pilórica se consideró como la porción de yeyuno. Para cada muestra se cortó y amarró la porción colectada por ambos lados, se inyectó por un extremo la solución de formol al 10% y estas fueron inmersas en tubos de 10 ml con formol para su fijación. Una parte de la muestra se embebió en parafina mediante técnicas estandarizadas en el laboratorio de Histopatología del Instituto Tecnológico de Sonora. De cada muestra, se seleccionaron cinco secciones transversales, se tiñeron con hematoxilina y eosina, posteriormente se examinaron con un estereomicroscopio electrónico Leica EZ4 (Leica Application Suite, versión 1.8.0) para analizar los índices altura de vellosidad (AV) y profundidad de cripta (PC).

5.7. Análisis estadístico

Para analizar los datos del experimento de comportamiento productivo se utilizó un diseño de bloques completos al azar (Steel y torrie 1988) y la razón de bloqueo fue peso inicial, el análisis de las medias fue con contrastes ortogonales

Modelo: $Y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + \epsilon_{ij}$

Donde:

Y_{ij} = Variable dependiente. Valor de la j -ésima observación del tratamiento i .

μ = Media general.

τ_i = Efecto relativo del i -ésimo tratamiento.

β_j = Efecto relativo del j -ésimo bloque.

ϵ_{ij} = Error experimental.

Supuestos del modelo: $\epsilon_{ij} \sim NI(0, \sigma^2)$.

El análisis estadístico se realizó con el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS, (2003) versión 9.0, de acuerdo con el diseño propuesto. Se analizaron los efectos principales de las variables de comportamiento productivo (GDP, CDA y EA), así como los efectos de arginina, glutamina y su interacción, mediante la aplicación del análisis de varianza (ANOVA) y contrastes ortogonales. El análisis de la expresión de enzimas, se realizó con el programa estadístico Statistix 9.0, mediante la aplicación de un análisis de varianza (ANOVA) y contrastes ortogonales para: 1) comportamiento productivo, el contraste 1 (C1), fue la dieta testigo contra la dieta con Gln; el contraste 2 (C2), fue dieta testigo contra Arg y el contraste 3 (C3) fue la dieta testigo contra Gln + Arg; 2) Los contrastes para la expresión relativa de ODC y SSAT en duodeno y yeyuno, los contrastes fueron los siguientes: C1, Testigo contra Arg y C2, Testigo contra Gln + Arg. Se consideró como significativa cualquier diferencia cuya $P < 0.05$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Después de que los mamíferos neonatos son destetados, experimentan grandes cambios en la estructura y en la función intestinal (Miller *et al.*, 1986; Gu *et al.*, 2002). Sin embargo, los mecanismos moleculares y celulares subyacentes son en gran parte desconocidos. Debido a la continua y exhausta investigación bioquímica sobre el desarrollo intestinal, el lechón proporciona un modelo animal útil para estudiar las respuestas del intestino neonatal hasta el destete (Wu *et al.*, 1996).

6.1. Comportamiento productivo

En el cuadro 4, se muestran los resultados del comportamiento productivo de los lechones destetados. La adición de Gln, Arg y Gln + Arg, incrementó ($P=0.055$, $P=0.006$ y $P=0.001$, respectivamente) la GDP al día 7 posdestete comparada con la dieta testigo, en la que presentaron una pérdida de peso; además al día 14, la dieta suplementada con glutamina, tuvo un efecto negativo ($P=0.054$), con una GDP 33% menor al testigo. Por otra parte y ligado a la diferencia en la GDP, la EA al día 7 en la dieta con Gln + Arg, se observa que por kg de alimento se incrementa el peso 283 g más que el testigo ($P=0.089$).

Puiman *et al.* (2011), encontraron que la ganancia de peso corporal se redujo en los cerdos suplementados con arginina. Este hallazgo contrasta con los

estudios publicados previamente en cerdos en donde arginina dio como resultado un aumento de la ganancia de peso en los cerdos destetados (Bertolo *et al.*, 2003; Urchel *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2009; Wu, 2009).

Jiang *et al.* (2009), mostraron que durante la segunda semana del experimento, la dieta suplementada con Gln, se mantuvo sin ningún efecto en el desempeño productivo, debido a que los lechones fueron incapaces de compensarlo por una reducción en el CDA. Wang *et al.* (2008), mostró que el CDA y la GDP entre 21 y 28 días de edad (primer semana posdestete) se redujeron; la adición de Gln al 1.0% en la dieta para lechones destetados no afectó a la ingesta de alimento, pero aumentó la ganancia diaria de peso corporal entre 21 y 28 días de edad. Mientras que Lackeyram *et al.* (2001), observaron que la suplementación de las dietas a base de maíz y soya con Gln al 0.8%, fue eficaz en el aumento de la ganancia de peso de destete precoz.

Espinosa-García (2010), mostró que en la primera semana posdestete, la adición de 1.5% de Gln a la dieta de manera individual, mejoró la GDP y EA, sin afectar el CDA. Zhong *et al.* (2011), mostraron que la suplementación de Gln no tuvo efecto en el desempeño productivo durante la primer semana, quizás porque el CDA disminuyó en la primer semana por efecto del estrés por destete. Durante la segunda semana y hasta que finalizó el periodo, la GDP y el CDA mejoraron con la adición de Gln.

Cuadro 4. Ganancia diaria de peso (GDP), consumo de alimento (CDA) y conversión alimenticia (CA) de lechones destetados, alimentados con las dietas experimentales.

Días posdestete	Tratamientos				E.E.	P		
	Testigo	Glutamina	Arginina	Gln + Arg		C1	C2	C3
Ganancia diaria de peso, kg/d								
3	0.003	-0.022	-0.023	-0.015	0.009	0.312	0.289	0.461
7	-0.010	0.019	0.031	0.043	0.005	0.055	0.006	0.001
14	0.136	0.091	0.140	0.135	0.008	0.054	0.865	0.958
21	0.228	0.198	0.232	0.219	0.008	0.212	0.851	0.725
Consumo de alimento kg/d								
3	0.099	0.070	0.062	0.077	0.009	0.281	0.182	0.406
7	0.141	0.126	0.119	0.140	0.007	0.467	0.299	0.949
14	0.195	0.179	0.178	0.197	0.007	0.467	0.432	0.926
21	0.356	0.324	0.335	0.349	0.016	0.484	0.637	0.878
Eficiencia alimenticia								
3	-0.115	-0.415	-0.384	-0.664	0.239	0.670	0.702	0.441
7	0.037	0.167	0.116	0.320	0.052	0.401	0.601	0.089
14	0.510	0.389	0.568	0.500	0.034	0.247	0.566	0.915
21	0.650	0.654	0.652	0.651	0.023	0.948	0.972	0.984

6.2. Expresión relativa de ARNm para las enzimas ODC y SSAT

En el cuadro 5, se muestran los resultados de la expresión de ARNm para el gen de ODC en duodeno y yeyuno. La expresión de ODC en duodeno, en el tratamiento de la dieta con arginina ($P=0.040$), tuvo una disminución del 55.93%, en comparación con la expresión con el tratamiento de la dieta testigo. Mientras

que para la expresión de SSAT tanto en duodeno como en yeyuno, no se encontraron diferencias.

La proliferación y la diferenciación de las células, es críticamente dependiente de su contenido de poliamina (Thomas y Thomas, 2001; Igarashi y Kashiwagi, 2000; Morgan, 1999; Wallace, 1998) que se puede sostener por varios mecanismos (Seiler, 1990; Pegg, 1986; Pegg y McCann, 1982; Seiler et al., 1996; Seiler y Dezeure, 1990). Uno de ellos podría ser la disponibilidad de arginina para mantener la síntesis de putrescina (Kepka-Lenhart et al., 2000; Li et al., 2001; Nelin et al., 2001; Durante et al., 2001). Sin embargo, el aumento de putrescina con la privación de arginina, y los cambios de órganos específicos en las tres poliaminas con la ingesta de arginina no son compatibles con una relación directa entre los niveles de arginina u ornitina y el estado de poliaminas; de hecho, el nivel de putrescina y la actividad ODC no están necesariamente relacionados (Schertel, 1991). Varios procesos pueden conducir a la acumulación de putrescina, es decir, aumento de la síntesis de ornitina por ODC; aumento de la conversión de espermidina y espermina de nuevo en putrescina; disminución de la conversión de putrescina en espermidina y espermina y/o aumento de la captación de la putrescina liberado por otros tejidos (Teixeira *et al.*, 2002)

Espinosa-García (2010), observó que 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. Arce-Vázquez (2012), observó que la enzima ornitina descarboxilasa,

amplificó ARNm en duodeno y yeyuno, pero la eficiencia de amplificación fue muy baja y no permitió un análisis preciso de la expresión de su ARNm, además, menciona que el destete no afecta la expresión de SSAT en duodeno y yeyuno al día 0, 3 y 7 posdestete.

Cuadro 5. Expresión relativa del gen de ornitina descarboxilasa (ODC) y espermina/espermidina acetiltransferasa (SSAT), en duodeno y yeyuno.

	Tratamiento			E.E.	P	
	Testigo	Arginina	Arg + Gln		C1	C2
ODC						
Duodeno	2.36	1.32	1.72	0.43	0.040	0.173
Yeyuno	1.71	1.29	1.50	0.38	0.275	0.600
SSAT						
Duodeno	4.86	4.16	4.10	1.92	0.722	0.700
Yeyuno	2.86	2.38	3.80	1.18	0.675	0.450

6.3. Morfología intestinal (histología)

En la figura 3, se muestran los resultados de la morfología de duodeno. De manera general y con respecto a la lectura basal (día 0), se observa la reducción en la altura de las vellosidades (19 a 52%), siendo más crítica al día 3, donde el tratamiento con la adición de Gln + Arg tuvo una menor pérdida ($P < 0.05$) de la continuidad (37%), en relación a los otros tratamientos; mientras que al día 7, se empieza a notar la regeneración de las vellosidades, siendo el tratamiento con Gln el que tuvo una mejor ($P < 0.05$) recuperación en la longitud de vellosidades. Con

respecto a la lectura basal (día 0), de manera general, se presentó un incremento en la profundidad de las criptas (12 a 35%), siendo más notorio al día 7.

La morfología y las funciones del tracto gastrointestinal se deterioran notablemente en los lechones destetados (Moeser *et al.*, 2007). Se ha informado de que la suplementación con Gln estimula la proliferación de enterocitos, por lo tanto, aumenta la altura de las vellosidades intestinales, previene las infecciones bacterianas, y mantiene la integridad intestinal (Wu *et al.*, 1996, 2007; Basivireddy *et al.*, 2004).

Jiang *et al.* (2009), mostraron que la suplementación con Gln al 0.8%, no afectó la integridad enteral en la primer semana. Yi *et al.* (2002), reportaron que no se presentó mejora alguna en el intestino delgado de lechones a la semana de destete, suplementados con Gln al 1.2%. Espinosa-García (2010), observó que la profundidad de las criptas intestinales no cambió por efecto de la adición de glutamina a la dieta, en duodeno y yeyuno. Tampoco se observó diferencia en la altura de las vellosidades por efecto de la adición de Gln.

Zhan *et al.* (2008), indican que la suplementación con Arg al 0.7% a la dieta, tiene un efecto positivo en la altura de las vellosidades y a su vez estas disminuyen al suplementar con 1.2% de Arg, además de provocar hiperplasia en las criptas.

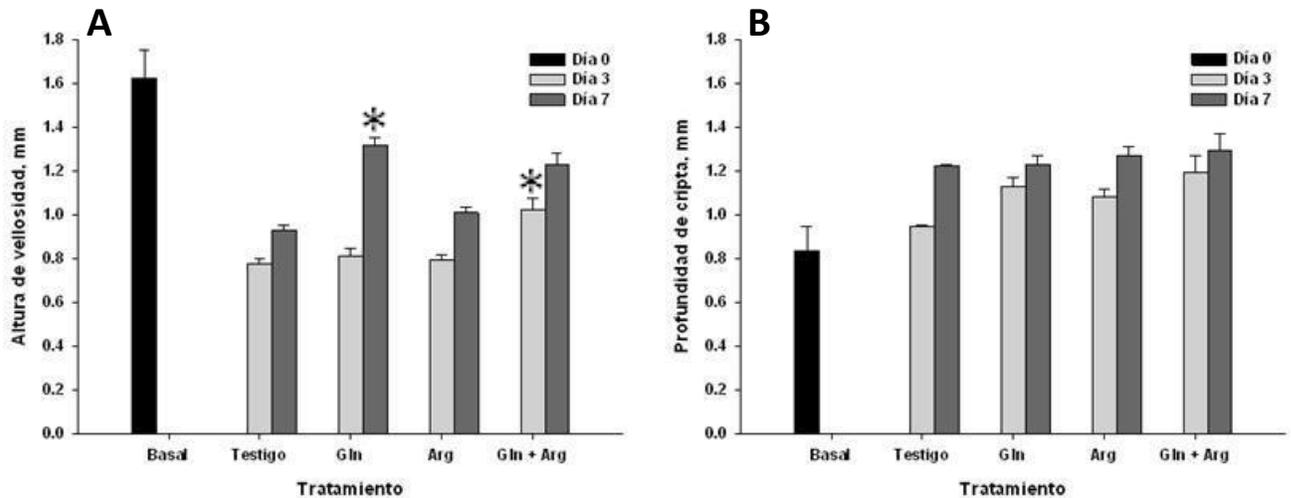


Figura 3. Altura de vellosidades (A) y profundidad de criptas (B) en duodeno de lechones a los días: 0, 3 y 7, sometidos a diferentes tratamientos o dietas: testigo, Gln, Arg y Gln + Arg ($P < 0.05$).

Después del destete, los lechones a menudo experimentan una reducción en el consumo de alimento y el crecimiento, además disminuye la altura de las vellosidades e incrementa la profundidad de las criptas (Wu *et al.*, 2009). Sakiyama *et al.* (2009) mostraron que la Gln puede prevenir estos problemas intestinales. Sin embargo, los mecanismos subyacentes no se han dilucidado completamente. La glutamina es el AA libre más abundante en la sangre, fluidos, y leche de los mamíferos (Wu *et al.*, 1995). Se ha demostrado que la Gln promueve la proliferación celular y ejerce efectos citoprotectores en respuesta a la privación de nutrientes, lesión oxidativa y el desafío inmunológico (Haynes *et al.*, 2009). También se ha informado de que la suplementación con Gln aumenta la altura de las vellosidades intestinales, previene las infecciones bacterianas, y mantiene la integridad intestinal (Wu *et al.*, 1996, 2007).

En la figura 4, se muestran los resultados de la morfología de yeyuno, no se observó una mejora con la adición de Arg y Gln en los días 3 y 7 postdestete ($P>0.05$). De manera general y con respecto al día 0, se observa una reducción del tamaño de las vellosidades al día 3 de 37 a 52% y al día 7 de 19 a 43% ($P<0.05$) al destetar a 21 días. Mientras que en la profundidad de las criptas, con respecto al día 0 (basal), al día 3 se observó un incremento de 25 a 55% y al día 7 de 28 a 50% ($P<0.05$).

Wang *et al.* (2008), observaron que la suplementación de Gln dietética, la altura de las vellosidades en yeyuno se redujo en un 43% a los 28 días de edad en lechones, mientras que en la profundidad de criptas, no hubo diferencias. Zhong *et al.* (2011), observaron que con la adición de Gln, la altura de las vellosidades en el yeyuno fue mayor en los lechones al día 7 y 14 postdestete, respectivamente.

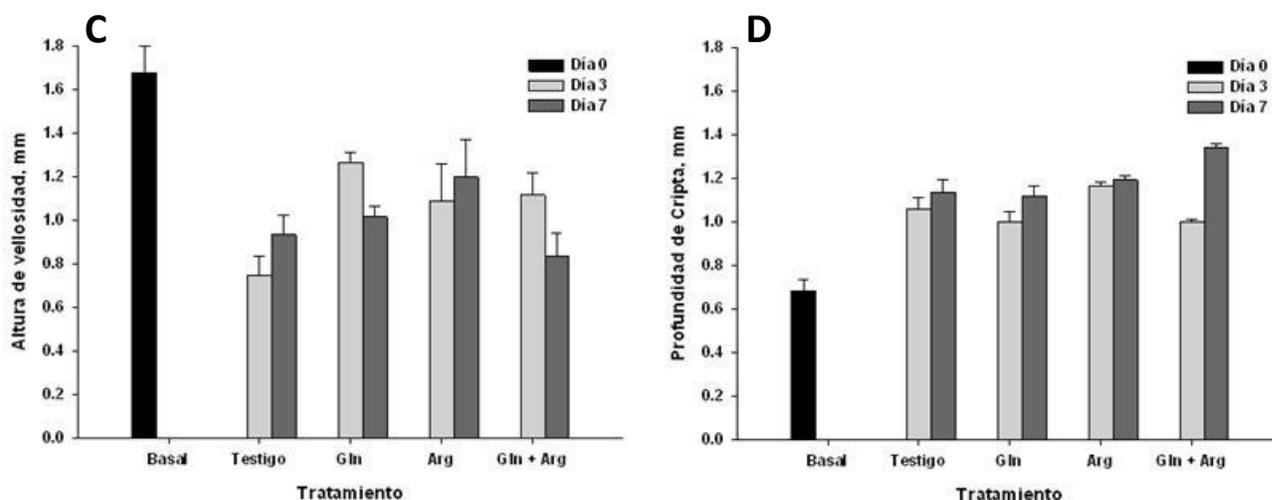


Figura 4. Altura de vellosidades (C) y profundidad de criptas (D) en yeyuno de lechones a los días: 0, 3 y 7, sometidos a diferentes tratamientos o dietas: testigo, Gln, Arg y Gln + Arg ($P<0.05$).

7. CONCLUSIÓN

En conclusión, con la adición de arginina al 0.8% y glutamina al 0.8% a la dieta se mejora la ganancia diaria de peso en la primer semana posdestete; sin embargo la expresión de ODC en duodeno se disminuye con la adición de Arg; con respecto a la morfología de intestino delgado, se observa una menor pérdida en la altura de vellosidades en duodeno al día 3 con la combinación de Gln y Arg, mientras que al día 7 con la adición de Gln a la dieta se observa una pronta recuperación de la altura de vellosidades.

8. LITERATURA CITADA

- Arce-Vázquez, N. 2012. Expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo de arginina y poliaminas en mucosa intestinal de lechones recién destetados. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma de Baja California. Mexicali, B. C., México.
- Baba, R., Yamami, M., Sakuma, Y., Fujita, M., Fujimoto, S. 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.
- Baker, D.H. 2009. Advances in protein-amino acid nutrition of poultry. *Amino Acids.*37:29–41.
- Basivireddy, J., Jacob, M., and Balasubramanina, K. A.. 2004. Oral glutamine attenuates indomethacin-induced small intestinal damage. *Clin. Sci.* 107:281–289.
- Bertolo, R.F., Brunton J.A., Pencharz P.B., Ball R.O. 2003. Arginine, ornithine, and proline interconversion is dependent on small intestinal metabolism in neonatal pigs. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284:E915–22.
- Blikslager, A., Moeser, A., Gookin, J., Jones, S. L., and Odle, J. 2007. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol, Rev.* 87: 545-564.
- Blikslager, A. T., Roberts, M. C., Rhoads, J. M., Argenzio, R. A. 1997. Is reperfusion injury an important cause of mucosal damage after porcine intestinal ischemia? *Surgery.* 121: 526-534.

- Bondi, A. A. 1987. *Animal Nutrition*. John Wiley and Sons, New York, NY.
- Brasse-Lagnel, C., A. Lavoine, and A. Husson. 2009. Control of mammalian gene expression by amino acids, especially glutamine. *FEBS J.* 276:1826–1844.
- Brasse-Lagnel, C., Lavoine A., Husson, A. 2009. Control of mammalian gene expression by amino acids, especially glutamine. *FEBS J.* 276:1826–44.
- Bröer, S. 2008. Amino Acid Transport Across Mammalian Intestinal and Renal Epithelia. *Physiol. Rev* 88:249–286.
- Bruhat, A., Cherasse, Y., Chaveroux, C., Maurin, A.C., Jousse, C., Fafournous, P. 2009. Amino acids as regulators of gene expression in mammals: molecular mechanisms. *Biofactors* 35:249–57.
- Bruininx, EM, van der Peet-Schwering CM, Schrama JW, Vereijken PF, Vesseur PC, Everts H, den Hartog LA, Beynen AC. 2001. Individually measured feed intake characteristics and growth performance of group housed weanling pigs: effects of sex, initial body weight, and body weight distribution within groups. *J. Anim. Sci.*; 79:301–8.
- Cera, K. R., Mahan, D. C., Cross, R. F., Reinhart, G. A. and Whitmoyer, R. E. 1988. Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. *J. Anim. Sci.* 66:574-584.
- Chamorro, S., de Blas C., Grant, G., Badiola, I., Menoyo, D., Carabaño, R. 2010. Effect of dietary supplementation with glutamine and a combination of glutamine-arginine on intestinal health in twenty-five-day-old weaned rabbits. *J. Anim. Sci.* 88:170–180.

- Cheng, H., y Leblond, C. P. 1974. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. I. Columnar cell. *Am. J. Anat.* 141:461–480.
- Cheng, Z. B., Li, D. F., Ge, C.R., Xing, J. J. 2006. Polyamines in sow colostrum and milk at different stages of lactation. *Anim. Sci.* 82:95-99.
- Cromwell, G. L. 2000. Utilization of soy products in swine diets. Pages 258–282 in *Soy in Animal Nutrition*. J. K. Drackley, ed. Fed. Anim. Sci. Soc., Savoy, IL.
- Curi, R., Lagranha, C. J., Doi, S. Q., Sellitti, D. F., Procopio, J., Pithon-Curi, T. C., Corless, M., and Newsholme, P. 2005. Molecular mechanisms of glutamine action. *J. Cell. Physiol.* 204:392–401.
- Cynober, L. 2004. Amino acid metabolism. In: *Encyclopedia of Biological chemistry*, Vol.1. Elsevier Inc, New-York, 90 p.
- Daniel, H. 2004. Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu. Rev. Physiol.* 66:361–384.
- Davis, T. A., Nguyen, H. V., Garcia-Bravo, R., Fiorotto, M. L., Jackson, E. M., Lewis, D. S., Lee, D. R. & Reeds, P. J. 1994 Amino acid composition of human milk is not unique. *J. Nutr.* 124: 1126–1132.
- Dunsford, B. P., Knabe, D. A. and Haensly, W. E. 1989. Effect of dietary soybean meal on the microscopic anatomy of the small intestine in the early-weaned pig. *J. Anim. Sci.* 67:1855-1863.
- Durante, W., Liao, L., Reyna, S. V., Peyton, K. J. & Schafer, A. I. 2001. Transforming growth factor- β_1 stimulates L-arginine transport and metabolism in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 103: 1121–1127.

- Espinosa-García, N. S. 2010. Adición de glutamine y metionina en dietas para lechones recién destetados. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma de Baja California. Mexicali, B. C., México.
- Fan, M. Z. 2003. Growth and ontogeny of the gastrointestinal tract. In: Xu RJ, Cranwell P. D., editors. Neonatal pig gastrointestinal physiology and nutrition. Thrumpton (UK): Nottingham University Press; p. 31–60.
- Fang, Y.Z., Yang S, Wu G. 2002. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*.18:872–879.
- Fangman, T. J., 1997, Segregated early weaning, *Swine Health and Production*, 195-198.
- Ferrufino, J. C., Texas, L., Angeles, G. 1996. Histología normal del intestino delgado. *Rev. Med. Hered.* 7:46-57.
- Flynn, N. E., Knabe, D. A., Mallick, B. K. & Wu, G. 2000. Postnatal changes of plasma amino acids in suckling pigs. *J. Anim. Sci.* 78: 2369–2375.
- Gaskins, H.R., Kelley K.W., 1995. Immunology and neonatal mortality. In: Varley MA, editor. *The neonatal pig: development and survival*. Oxon (UK): CAB International; p. 39–55.
- Gu, X., Li, D, She, R. 2002. Effect of weaning on small intestinal structure and function in the piglet. *Arch Anim Nutr.* 56:275–86.
- Hall, D. M., G. R. Buettner, L. W. Oberley, L. Xu, R. D. Matthes, and C. V. Gisolfi . 2001. Mechanisms of circulatory and intestinal barrier dysfunction during

- whole body hyperthermia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280:H509–H521.
- Hampson, D. J. and Kidder, D. E. 1986. Influence of creep feeding and weaning on brush border enzyme activities in the piglet small intestine. *Res. Vet. Sci.* 40:24-31.
- Hellekant, G., and Danilova, V. 1999. Taste in domestic pig, *Sus scrofa*. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 82:8–24.
- Henning, S. J., Rubin, D. C., and Shulman, R. J. 1994. Ontogeny of the intestinal mucosa. In: L. R. Johnson (ed.) *Physiology of the Gastrointestinal Tract*. Raven Press, New York.
- Hirano, M., Ryuichi I., Fujimoto, K., Sakata, H., Ohyama, T., Sakai, T., Joh, T., and Itoh, M., 1995. Epidermal growth factor enhances repair of rat intestinal mucosa damaged by oral administration of methotrexate. *J. Gastroenterol.* 30:169-176.
- Igarashi, K. & Kashiwagi, K. 2000. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271: 559–564.
- Jiang, Z. Y., Sun, L. H., Lin, Y. C., Ma, X. Y., Zheng, C. T., Zhou, G. L., Chen, F. and Zou, S. T. 2009. Effects of dietary glycyl-glutamine on growth performance, small intestinal integrity, and immune responses of weaning piglets challenged with lipopolysaccharide. *J. Anim. Sci.* 87:4050–4056.
- Jobgen, W. S., Fried, S. K., Fu, W, J. et al 2006. Regulatory role for the arginine-nitric oxide pathway in metabolism of energy substrates. *J. Nutr. Biochem.* 17:571-588

- Johnson, L.R. 1988. Regulation of gastrointestinal mucosal growth. *Physiol. Rev.* 68:456-502.
- Kelly, D., Smith, J. A. and McCracken, K. J. 1991a. Digestive development in the early-weaned pig. I. Effect of continuous nutrient supply on the development of the digestive tract and on changes in digestive enzyme activity during the first week post-weaning. *Br. J. Nutr.* 65:169-180.
- Kelly, D., Smith, J. A. and McCracken, K. J. 1991b. Digestive development in the early-weaned pig. II. Effect of level of food intake on digestive enzyme activity during the immediate post-weaning period. *Br. J. Nutr.* 65:181-188.
- Kenworthy, R. and Allen, W. D. 1966. Influence of diet and bacteria on small intestine morphology, with special reference to early weaning and *Escherichia coli*. *J. Comp. Patho.* 76:291-298.
- Kepka-Lenhart, D., Mistry, S. K., Wu, G. & Morris, S. M. 2000. Arginase I: a limiting factor for nitric oxide and polyamine synthesis by activated macrophages? *Am. J. Physiol.* 279: R2237–R2242.
- Kim, I. H., Hancock, J. D., Jones, D. B., and Reddy, P. G. 1999. Extrusion processing of low-inhibitor soybeans improves growth performance of early-weaned pigs. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 12:1251–1257.
- Kim, J. C., Simmins, P. H., Mullan, B. P., and Pluske, J. R. 2005. The digestible energy value of wheat for pigs, with special reference to the post-weaned animal. *Anim. Feed Sci. Technol.* 122:257–287.
- 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.

- Kwon, H., G. Wu, C. J. Meininger, F. W. Bazer, and T. E. Spencer. 2004. Developmental changes in nitric oxide synthesis in the ovine placenta. *Biol. Reprod.* 70:679–686.
- Lambert, G. P., C. V. Gisolfi, D. J. Berg, P. L. Moseley, L. W. Oberley, and K. C. Kregel. 2002. Selected contribution: Hyperthermia-induced intestinal permeability and the role of oxidative and nitrosative stress. *J. Appl. Physiol.* 92:1750–1761.
- Lee, Y. K., K. Y. Puong, A. C. Ouwehand, and S. Salminen. 2003. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *J. Med. Microbiol.* 52:925–930.
- Lenahan, N. A., DeRouchey J. M., Goodband R. D., Tokach M. D., Dritz, S. S., Nelssen J. L., Groesbeck C. N., and Lawrence K. R. 2007. Evaluation of soy protein concentrates in nursery pig diets, *J. Anim. Sci.* 85:3013-3021.
- Li, D. F., J. L. Nelssen, P. G. Reddy, F. Blecha, R. D. Klemm and R. D. Goodband. 1991b. Interrelationship between hypersensitivity to soybean proteins and growth performance in early-weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 69:4062-4069.
- Li, H., Meininger, C. J., Hawker, J. R., Haynes, T. E., Kepka-Lenhart, D., Mistry, S. K., Morris, S. M. & Wu, G. 2001. Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 280: E75–E82.
- Li, X., R. Rezaei, P. Li, and G. Wu. 2010. Composition of amino acids in feed ingredients for animal diets. *Amino Acids* doi:10.1007/s00726-010-0740-y.

- Liu Y., Ipharraguerre I. R. and Pettigrew J. E. 2013. Potential applications of knowledge of gut chemo sensing in pig production, *J ANIM SCI*, 91:1982-1990.
- Makkink, C. A., G. P. Negulescu, G. X. Qin and M. W. A. Verstegen, 1994. Effect of dietary protein source on feed intake, growth, pancreatic enzyme activities and jejunal morphology in newly-weaned piglets. *Br. J. Nutr.* 72:353-368.
- Maxwell, C.V. and Carter S.D. 2001. Feeding the weaned pig. In: Lewis AJ, Southern LL, editors. *Swine nutrition*. Boca Raton (FL): CRC Press; p. 691–715.
- Maynard, L. A., J. K. Loosli, H. F. Hintz, and R. G. Warner. 1979. *Animal Nutrition*. 7th ed. McGraw-Hill Book Co., New York, NY.
- Meister, A. 1965. *Biochemistry of Amino Acids*. Academic Press, New York, NY.
- Miller, B. G., P. S. James, M. W. Smith and F. J. Bourne. 1986. Effect of weaning on the capacity of pig intestine villi to digest and absorb nutrients. *J. Agric. Sci. Camb.* 107:579-589.
- Moeser, A. J., C. V. Klok, K. A. Ryan, J. G. Wooten, D. Little, V. L. Cook, and A. T. Blikslager. 2007. Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292:G173–G181.
- Morgan, D. M. 1999. Polyamines. An overview. *Mol. Biotechnol.* 11:229–250.
- Morris, S.M., Jr. 2004. Enzymes of Arginine Metabolism. *J. Nutr.* 134: 2743–2747.
- Nabuurs, M. J. A. 1991. *Etiologic and Pathogenic Studies on Post-Weaning Diarrhoea*. PhD dissertation, State University, Utrecht, The Netherlands.

- Nabuurrs, M. J. A., A. Hoogendoorn, E. J. van der Molden and A. L. M. Van Osta. 1993a. Villous height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in the Netherlands. *Res. Vet. Sci.* 55:78-84.
- Nabuurrs, M. J. A., F. G. van Zijderveld, P. W. De Leeuw. 1993b. Clinical and microbiological field studies in the Netherlands of diarrhea in pigs at weaning. *Res. Vet. Sci.* 55:70-77.
- Nelin, L. D., Nash, H. E. & Chicoine, L. G. 2001. Cytokine treatment increases arginine metabolism and uptake in bovine pulmonary arterial endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 281: L1232–L1239.
- NRC. 1998. *Nutrient Requirements of Swine*. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Parera, N., Lázaro R. P., Serrano M. P., Valencia D. G., and Mateos G. G. 2010. Influence of the inclusion of cooked cereals and pea starch in diets based on soy or pea protein concentrate on nutrient digestibility and performance of young pigs, *J. Anim. Sci.* 88:671–679.
- Pegg, A. E. & McCann, P. P. 1982. Polyamine metabolism and function. *Am. J. Physiol.* 243: C212–C221.
- Pegg, A. E. 1986. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.* 234: 249–262.
- Pérez-Bosque, A., C. Amat, J. Polo, J. M. Campbell, J. Crenshaw, L. Russell, and M. Moretó. 2006. Spray-dried animal plasma prevents the effects of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B on intestinal barrier function in weaned rats. *J. Nutr.* 136:2838–2843.

- Piel, C., L. Montagne, P. Salgado, and J. Lallès. 2004. Estimation of ileal output of gastro-intestinal glycoprotein in weaned piglets using three different methods. *Reprod. Nutr. Dev.* 44:419–435.
- 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.
- Pluske, J. R., I. H. Williams and F. X. Aherne. 1996a. Maintenance of villous height and crypt depth in piglets by providing continuous nutrition after weaning. *Anim. Sci.* 62:131-144.
- Pluske, J. R., I. H. Williams and F. X. Aherne. 1996b. Villous height and crypt depth in piglets in response to increases in the intake of cow's milk after weaning. *Anim. Sci.* 62:145-158.
- Pluske, J.R., Hapmpson D.J.,Williams I.H. 1997. Factors influencing the structure and function of the small intestine in the weaned pig: a review. *Livest Prod Sci.* 51:215–36.
- Puiman P.J., Stoll B., van Goudoever J.B., Burrin D.G. 2011. Enteral arginine does not increase superior mesenteric arterial blood flow but induces mucosal growth in neonatal pigs. *J Nutr.* 141(1):63-70.
- Ray, R. M., Bhattacharya, S., and Johnson, L. R. 2005. Inhibition of PP2A in polyamine depleted cells is responsible for their resistance to apoptosis. *J. Biol. Chem.* 280: 31,091-31,100.
- Rhoads, J. M., and G. Wu. 2009. Glutamine, arginine, and leucine signaling in the intestine. *Amino Acids* 37:111–122.

- Sakiyama, T., Musch, M. W., Ropeleski, M. J., Subouchi, T. H., and Chang, E. B. 2009. Glutamine increase autophagy under basal and stressed conditions in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 136:924–932.
- Schertel, B. & Eichler, W. 1991. Polyamine biosynthesis in arginine-starved and re-fed rats. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. 372: 27–33.
- Seiler, N. & Dezeure, F. 1990. Polyamine transport in mammalian cells. *Int. J. Biochem.* 22: 211–218.
- Seiler, N., Delcros, J. G. & Moulinoux, J. P. 1996. Polyamine transport in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 28: 843–861.
- Smith, M. W. 1984. Effect of postnatal development and weaning upon the capacity of pig intestinal villi to transport alanine. *J. Agric. Sci. Camb.* 102:625-633.
- Sterk, A., Schlegel, P., Mul, A. J., Ubbink-Blanksma, M. and Bruininx, E. M. A. M. 2008. Effects of sweeteners on individual feed intake characteristics and performance in group-housed weanling pigs. *J ANIM SCI*, 86:2990-2997.
- Stoll, B., and D. G. Burrin. 2006. Measuring splanchnic amino acid metabolism in vivo using stable isotopic tracers. *J. Anim. Sci.* 84(E. Suppl.):E60–E72.
- Tan, B, Yin Y, Liu Z, Li X, Xu H, Kong X, Huang R, TangW, Shinzato I, et al. 2009. Dietary L-arginine supplementation increases muscle gain and reduces body fat mass in growing-finishing pigs. *Amino Acids.* 37:169–75.
- Teixeira, D., Santaolalia, M. L., Meneu, V. and Alonso E. 2002. Dietary Arginine Slightly and Variably Affects Tissue Polyamine Levels in Male Swiss Albino Mice. *J. Nutr.* 132: 3715–3720.

- Tenenbaum, A., Fisman, E. Z. & Motro, M. 1998. L-Arginine: rediscovery in progress. *Cardiology* 90: 153–159.
- Thomas, T. & Thomas T. J. 2001. Polyamines in cell growth and cell death: molecular mechanisms and therapeutic applications. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 244–258.
- Urschel KL, Evans AR, Wilkinson CW, Pencharz PB, Ball RO. 2007. Parenterally fed neonatal piglets have a low rate of endogenous arginine synthesis from circulating proline. *J Nutr.*; 137:601–6.
- van Beers-Schreurs, H. M. G. 1996. Changes in the Function of the Large Intestine of Weaned pigs. PhD dissertation, University of Utrecht, The Netherlands.
- van Beers-Schreurs, H. M. G., M. J. A. Nabuurrs, L. Vellenga and H. J. Breukink. 1995. The effect of weaning and diets on villous height and crypt depth in the small intestines of piglets. In *Proc. of IXth Int'l Conf. Prod. Dise. Farm Anim.* Berlin, Germany, p. 103.
- Vente, M. A. M., Spreeuwenberg J. M. A. J. Verdnok, A. C. Beynen and M. W. A. Verstegen. 2003. Interrelationships between gut morphology and feces consistency in newlyweaned piglets. *Anim. Sci.* 77:85-94.
- Vicente, B., D. G. Valencia, M. P. Serrano, R. Lázaro, and G. G. Mateos. 2008. The effects of feeding rice in substitution of corn and the degree of gelatinization of rice on digestibility of dietary components and productive performance of young pigs. *J. Anim. Sci.* 86:119–126.
- Wallace, H. M. 1998. Polyamines: specific metabolic regulators or multifunctional polycations? *Biochem. Soc. Trans.* 26: 569–571.

- 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.
- 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.
- Watford, M. 2008. Glutamine metabolism and function in relation to proline synthesis and the safety of glutamine and proline supplementation. *J Nutr.* 138:S2003–7.
- 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, X., Ruan Z, Gao YL, Yin YL, Zhou XH,Wang L, Geng MM, Hou YQ, Wu, G, Bazer FW, Davis TA, Kim SW, Li P, Rhoads JM, Satterfield MC, Smith SB, Spencer TE, et al. 2009. Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease. *Amino Acids.* 37:153–68.
- Wu, G, Flynn NE, Knabe DA, Jaeger LA. 2000a. A cortisol surge mediates the enhanced polyamine synthesis in porcine enterocytes during weaning. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*;279:R554–9.
- Wu, G., Meininger CJ, Kelly K, Watford M, Morris SM Jr. 2000b. A cortisol surge mediates the enhanced expression of pig intestinal pyrroline- 5-carboxylate synthesis during weaning. *J Nutr.* 130:1914–9.

- Wu, G, Knabe DA, Kim SW. 2004. Arginine nutrition in neonatal pigs. *J Nutr.* 134:S2783–90.
- Wu, G. & Knabe, D. A. 1994. Free and protein-bound amino acids in sow's colostrum and milk. *J. Nutr.* 124: 437–2444.
- Wu, G. & Knabe, D. A. 1995. Arginine synthesis in enterocytes of neonatal pigs. *Am. J. Physiol.* 269: R621–R629.
- Wu, G. & Morris, S. M. 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 336: 1–17.
- Wu, G. 1997. Synthesis of citrulline and arginine from proline in enterocytes of postnatal pigs. *Am. J. Physiol.* 272: G1382–1390.
- Wu, G. 2009. Amino acids: Metabolism, functions, and nutrition. *Amino Acids.* 37:1-17.
- Wu, G. 2010. Dietary supplementation with L-arginine or N-carbamylglutamate enhances intestinal growth and heat shock protein-70 expression in weanling pigs fed a corn- and soybean meal-based diet. *Amino Acids.* 39:831–9.
- Wu, G. 2010. Functional Amino Acids in Growth, Reproduction, and Health. American Society for Nutrition. *Adv. Nutr.* 1: 31–37.
- Wu, G., and D. A. Knabe. 1994. Free and protein-bound amino acids in sow's colostrum and milk. *J. Nutr.* 124:415–424.
- Wu, G., and S. M. Morris Jr. 1998. Arginine metabolism: Nitric oxide and beyond. *Biochem. J.* 336:1–17.
- Wu, G., F. W. Bazer, R. C. Burghardt, G. A. Johnson, S. W. Kim, D. A. Knabe, X. L. Li, M. C. Satterfield, S. B. Smith, and T. E. Spencer. 2010a. Functional

- amino acids in swine nutrition and production. Pages 69–98 in *Dynamics in Animal Nutrition*. J. Doppenberg, ed. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands.
- Wu, G., F. W. Bazer, T. A. Davis, L. A. Jaeger, G. A. Johnson, S. W. Kim, D. A. Knabe, C. J. Meininger, T. E. Spencer, and 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., Knabe, D. A. & Flynn, N. E. 1994. Synthesis of citrulline from glutamine in pig enterocytes. *Biochem. J.* 299: 115–121.
- Wu, G., Meier S.A., Knabe, D.A. 1996. Dietary glutamine supplementation prevents jejunal atrophy in weaned pigs. *J. Nutr.* 126:2578–84.
- Wu, G., Meininger, C. J., Knabe, D. A., Bazer, F. W. & Rhoads, J. M. 2000. Arginine nutrition in development, health and disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 3: 59–66.
- Yao, K, Yin YL, Chu WY, Liu ZQ, Deng D, Li TJ, Huang RL, Zhang JS, Tan BE, et al. 2008. Dietary arginine supplementation increases mTOR signaling activity in skeletal muscle of neonatal pigs. *J Nutr.* 138:867–72.
- Yi, G. F., Allee, G. L., Toride, Y., Usry, J. L., and Gaines, A. M. 2002. Impact of glutamine, glutamate, and nucleotide on the growth performance and intestinal morphology of weaned piglets. *J. Anim. Sci.* 80(Suppl. 1):198. (Abstr.).
- Zhan, Z., Ou, D., Piao, X., Kim, S. W., Liu, Y. and Wang, J. Dietary Arginine Supplementation Affects Microvascular Development in the Small Intestine of Early-Weaned Pigs. *J. Nutr.* 138: 1304–1309.

Zhong, X., Zhang, X. H., Li, X. M., Zhou, Y. M., Li, W., Huang, X. X., Zhang, L. L., and Wang, T. 2011. Intestinal growth and morphology is associated with the increase in heat shock protein 70 expression in weaning piglets through supplementation with glutamine. *J. Anim. Sci.* 89:3634–3642.