

Molecular expression of villin in jejunum of weaned pigs after oral intake of LPS from *E. coli**

Expresión molecular de la vilina en yeyuno de lechones posdestete que consumieron LPS de E. coli

Expressão molecular da Vilina no jejuno de leitões recém desmamados que consumiram LPS de E. coli

Johana Andrea Ciro Galeano¹, Zoot, MSc, Dr Sci (C); Albeiro López Herrera², Zoot, MV, MSc, Dr Sci; Jaime Parra Suescún^{2*}, Zoot, MSc, Dr Sci

* Autor para correspondencia: Jaime Parra Suescún. Calle 59A No.63-20, Autopista Norte; Bloque 50, Piso 2, Oficina 202, Medellín, Antioquia, Colombia.

¹ Profesora, Fundación Universitaria Autónoma de las Américas. Estudiante Doctorado en Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia. Grupo BIOGEM. Colombia.

² Profesor. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Grupo BIOGEM. Colombia. Tel: +57 44309043; Fax: +57 443090425. A.A. 1779, Medellín, Colombia. Email: jeparrasu@unal.edu.co

(Recibido: 12 de julio, 2013; aceptado: 9 de noviembre, 2013)

Abstract

This experiment evaluated the effect of oral intake of *E. coli* lipopolysaccharide (LPS) by weaned pigs on the molecular expression of villin in jejunum. A total of 52 pigs were used. Pigs were sequentially slaughtered to take the jejunum on days 1 (weaning day, at 21 days of age), 5, 7, and 10 post-weaning. Intestinal inflammation was induced by feeding the animals a basal diet supplemented with one of four LPS levels (0, 0.3, 0.5, and 1.0 µg/mg feed). A completely randomized block design was used in 4X4 factorial arrangement. Animals fed the diet with the highest LPS level of inclusion showed a decreased ($P<0.01$) molecular expression of villin. In conclusion, LPS from *E. coli* decreases villin expression, which is directly implicated in intestinal morphology changes, specifically decreasing height and increasing the width of the villi. This effect probably contributes to decreased intestinal absorption of nutrients and also to occurrence of postweaning diarrhea syndrome.

Key words

diarrhea, fever, piglet, weaning.

Resumen

Con el objetivo de evaluar el efecto la adición de lipopolisacárido LPS de *E. coli* sobre la expresión molecular de vilina en yeyuno de lechones posdestete, se sacrificaron 52 lechones escalonadamente los días 1 (21 días de edad, día del destete), 5, 7 y 10 posdestete, y se les extrajo completamente el yeyuno para la evaluación de la expresión molecular de vilina. Para inducir la inflamación intestinal los animales fueron alimentados con una dieta basal, adicionada con cuatro niveles de LPS (0, 0.3, 0.5 y 1.0 µg/mg de alimento). El diseño estadístico utilizado fue de

*Para citar este artículo: Ciro Galeano JA, López Herrera A, Parra Suescún J. Expresión molecular de vilina en yeyuno de lechones posdestete que consumieron LPS de *E. coli*. Rev CES Med Zootec. 2013; Vol 8 (2): 32-41

bloques al azar en arreglo factorial de 4X4. Se observó una disminución ($P<0.01$) en la expresión molecular de vilina en los animales que consumieron la dieta con mayor nivel de inclusión de LPS. El LPS de *E. coli* disminuye la expresión de vilina, lo que está directamente implicado en los cambios morfológicos intestinales, específicamente en la disminución de la altura y el aumento del ancho de las vellosidades. Este efecto probablemente contribuye a la disminución de la absorción intestinal de nutrientes y a la presentación del síndrome de diarrea posdestete.

Palabras clave

destete, diarreas, fiebre, lechón.

Resumo

Teve-se como objetivo avaliar a adição de lipopolissacarídeos LPS de *E. coli* sobre a expressão molecular da Vilina no jejuno de leitões pós-desmame. Para isto, abateram-se 52 leitões nos dias 1, 5, 7 e 10 após desmame (desmame aos 21 dias de idade, este é o dia zero) e extraiu-se lhes completamente o jejuno para fazer a avaliação da expressão molecular da Vilina. Para induzir a inflamação intestinal os animais foram alimentados com uma dieta basal, adicionada com quatro níveis de LPS (0, 0.3, 0.5 y 1.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de alimento). O delineamento estatístico utilizado foi de blocos ao acaso com desenho fatorial de 4x4. Observou-se uma diminuição ($P<0.01$) na expressão molecular da Vilina nos animais que consumiram a dieta com maior nível de inclusão de LPS. O LPS da *E. coli* diminuiu a expressão da Vilina, fato este que explica as mudanças morfológicas intestinais, especificamente na diminuição da altura e o aumento da largura das vilosidades. Este efeito provavelmente contribuiu com a diminuição da absorção intestinal de nutrientes e à apresentação da síndrome de diarrea pós-desmame.

Palavras chave

desmame, diarrea, febre, leitão, suínos.

Introducción

Los sistemas modernos de producción porcina han avanzado hacia la obtención de animales destetados a edades más tempranas y con mejores índices de conversión de alimento^(37,10). Actualmente, los lechones son destetados entre los 14-28 días de edad, como resultado, al momento del destete los lechones son ahora más livianos y su sistema digestivo está menos desarrollado, especialmente el intestino delgado, lo que los hace más susceptibles a problemas digestivos en el periodo posdestete⁽³¹⁾.

Previo al destete, las vellosidades intestinales son largas, bien estructuradas y muy eficientes en la absorción de nutrientes. Esto se debe a que la renovación de los enterocitos durante la lactancia es mínima, ya que las

células de las glándulas intestinales son capaces de reemplazar los enterocitos de las vellosidades a la misma velocidad a la que son descamados⁽¹¹⁾. Al momento del destete, la longitud de las vellosidades se reduce casi a la mitad, provocando la aparición de una mayor proporción de enterocitos débiles e inmaduros en los extremos de las vellosidades³¹, lo que se traduce en la disminución en la absorción de nutrientes⁴⁸. El alimento que no es digerido y absorbido en intestino delgado queda disponible en ciego y colon, generando una intensa actividad y proliferación de la población microbiana, principalmente enteropatógena, desencadenando procesos diarreicos⁽¹⁹⁾. Para que los procesos de digestión y absorción de nutrientes se den de una manera satisfactoria, es necesario que se mantenga la integridad de las células funcionales

de las vellosidades, los enterocitos. Los enterocitos están conformados por diferentes estructuras, dentro de las cuales, la vilina es de gran importancia³¹. La vilina es una proteína cuya función es dar soporte, elasticidad y motilidad a las células de las vellosidades. Por lo anterior, la expresión de esta proteína es de gran importancia para el desarrollo de las vellosidades y por ende, para los procesos fisiológicos de éstas. Sin embargo, la expresión de esta proteína puede ser alterada drásticamente por los procesos fisiológicos desencadenados por el destete y por la presencia de infecciones microbianas en los animales⁽⁷⁾.

En la lactancia, las bacterias predominantes en estómago e intestino delgado suelen ser lactobacilos y estreptococos²³. El destete precoz y en particular si este se realiza bruscamente, provoca un periodo breve de ayuno y la desaparición de la población de lactobacilos del tracto gastrointestinal, favoreciendo el aumento de la población de *E. coli*, la cual al cumplir su ciclo, muere y libera desde sus paredes productos proinflamatorios como el lipopolisacárido (LPS). El LPS es un agente que causa sintomatología similar a una sepsis y es reconocido por cualquier hospedero mamífero como una entidad patogénica importante⁽¹⁾.

El LPS es reconocido por receptores específicos en la membrana celular, activando a su vez varias rutas de señalización celular, cuyas cascadas de traducción favorecen el aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias, las cuales producen cambios importantes en la estructura y capacidad funcional del intestino²⁰. Aunado a lo anterior, el LPS en el medio intestinal, causa el incremento en el transporte paracelular indiscriminado de moléculas, y en las alteraciones de la estructura y capacidad funcional del intestino. Estos cambios a nivel intestinal, están representados por la disminución en el tamaño de las vellosidades, debido posiblemente a la disminución en la expresión de vilina y a la consecuente aparición de enterocitos débiles e inmaduros que las conforman⁽⁹⁾.

Dado que la administración de LPS de *E. coli* es uno de los modelos más empleados en estudios para simular procesos infecciosos agudos, por tener acciones altamente reproducibles y carecer de los efectos secundarios asociados a las infecciones crónicas, el objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la adición de diferentes niveles de LPS de *E. coli* sobre la expresión molecular de vilina en yeyuno de lechones posdestete.

Materiales y métodos

Consideraciones éticas

Todos los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo de acuerdo a las guías propuestas por “The International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals”⁽⁵⁾. Esta investigación fue avalada por El Comité de Ética en la Experimentación Animal de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (CEMED 001del 26 de Enero de 2009).

Localización

El trabajo de campo se realizó en el Centro San Pablo, perteneciente a la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín, ubicado en el municipio de Rionegro, paraje “El Tablacito”, localizado a 2100 msnm, con una temperatura entre 12 y 18°C, correspondiendo a una zona de vida bosque muy húmedo Montano Bajo (bmh-MB).

Animales

Se utilizaron 52 lechones resultado de un cruce alterno Duroc x Landrace, destetados exactamente a los 21 días de edad, con un peso de 6.5 ± 0.5 kg. Estos lechones fueron alojados en grupos de ocho, en jaulas provistas de comedero de canoa y agua a voluntad, las cuales fueron ubicadas en un cuarto con temperatura controlada a $26 \pm 3^\circ\text{C}$.

Dietas

En este experimento se evaluaron cuatro dietas experimentales, una dieta control (basal) y otras tres conteniendo LPS de *E. coli*, serotipo 0111:B4 (Sigma-Aldrich, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) así:

- Dieta Basal (DB): Sin adición de LPS.
- Dieta 1 (D1): DB más la adición de $0.3 \mu\text{g}$ de LPS /mg de alimento.
- Dieta 2 (D2): DB más la adición de $0.5 \mu\text{g}$ de LPS /mg de alimento.
- Dieta 3 (D3): DB más la adición de $1.0 \mu\text{g}$ de LPS /mg de alimento.

La dieta basal ofrecida a los animales tuvo como componente leche y algunos de sus derivados; además, fue enriquecida con vitaminas, minerales y lisina HCL.

Las dietas se balancearon para cumplir con todos los mínimos nutricionales requeridos y propuestos por el NRC⁽²⁵⁾ (Tablas 1 y 2). La cantidad de alimento ofrecido por jaula fue de 300 g/día, sin embargo, se suministró alimento adicional cuando los animales lo requirieron. Las dietas experimentales se proporcionaron desde el día 1 del destete hasta el sacrificio, el cual se realizó de manera secuencial o escalonada durante los primeros 10 días posdestete. Durante la lactancia no se suministró alimento sólido a los lechones.

Tabla 1. Composición de la dieta basal.

<i>Tratamiento</i>	%
Leche en polvo	59.0
Caseína	6.05
Dairylac 80 (lactosa) ^A	15.0
Proliant 1000 (suero) ^B	8.0
Hemoglobina	2.5
Almidón de maíz	4.32
Aceite de palma	2.363
Sal de mar	0.203
Fosfato monodivale	0.314
Sal común	0.4
Lisina	0.439
Metionina	0.326
Treonina	0.279
Triptófano	0.061
Adsorbente de Toxinas ^C	0.05
Vitaminas ^D	0.36
Minerales ^E	0.12
Saborizantes ^F	0.217

^ADairylac 80 (Pro-Ag Products Ltd, Winnipeg, Canadá)

^BProliant 1000 (Alitecno S.A.C., Lima, Perú)

^CToxibond (Biomix, Medellín, Colombia)

^DComposición por kg de alimento: vitamina A 1020 UI, vitamina D 198 UI, vitamina E 6 UI, vitamina K 1.20 mg, riboflavina 7.20 mg, vitamina B₁₂ 0.04 mg, colina 968.58 mg, niacina 36 mg, ácido pantoténico 16.55 mg, tiamina 30 mg, piridoxina 31 mg, biotina 0.08 mg, ácido fólico 0.75 mg.

^EComposición por kg de alimento: cobre 14.40 mg, hierro 120 mg, manganeso 36 mg, selenio 0.30 mg, yodo 0.96 mg, zinc 144 mg.

^FVainilla dulce, esencia de frutas (Prodia, Medellín, Colombia).

Tabla 2. Análisis Proximal de la dieta basal.

<i>Tratamiento</i>	%
Proteína Cruda (%)	21.0
Extracto Etéreo (%)	8.35
Cenizas (%)	5.42
Humedad (%)	7.215
Energía bruta (Kcal/kg)	3708.0

Toma de muestras de tejido intestinal

Durante la fase experimental se sacrificaron 52 lechones de la siguiente forma: el día inicial o día 1 (día del destete), se sacrificaron 4 lechones, que representaron el grupo de referencia para verificar el estado general de salud y la evaluación macroscópica del estado de los órganos de los animales antes de suministrar el LPS. Los días cinco, siete y 10 posdestete fueron sacrificados cuatro lechones de cada tratamiento.

Todos los lechones fueron sacrificados 2.5 horas después de su última comida. Los animales se sedaron por inhalación de dióxido de carbono durante 3 minutos y fueron sacrificados por exanguinación, mediante sección de la vena yugular. Después del sacrificio, los lechones se colocaron en posición decúbito dorsal, se diseccionó la región abdominal y se extrajo completamente el intestino delgado desde la unión pilórica hasta la válvula íleo-cecal⁽³⁵⁾. El intestino fue alineado y medido en una mesa sin ningún tipo de tensión. Posteriormente éste se dividió en tres regiones (duodeno, yeyuno, e íleon) de igual tamaño y se tomaron 20 cm del centro del yeyuno. Una vez cortadas las porciones, la digesta contenida en cada una de ellas se removió mediante lavado por infusión con solución salina fría según lo descrito previamente^(21,30). Las muestras para análisis de RNA fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido, donde se conservaron hasta su análisis en el laboratorio. Las muestras de intestino para los estudios morfométricos se perfundieron con formalina buferada al 10% hasta realizar las determinaciones de laboratorio⁽⁴⁰⁾.

Extracción de RNA total y chequeo de la calidad del material de vilina

Se extrajo el RNA total de las muestras de intestinos previamente almacenadas en nitrógeno líquido empleando

el ULTRACLEAN™ Tissue & Cells RNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.). En todos los casos se pesaron 25 mg de tejido (lo máximo recomendado por el fabricante) en una balanza analítica y se continuo con el protocolo descrito en el Kit. Para llevar a cabo la ruptura del tejido se emplearon morteros de losa y nitrógeno líquido. Las superficies y el material de trabajo se trataron antes con DEPC (dietilpirocarbonato) para remover posibles RNAasas. Las muestras de RNA total obtenidas con el procedimiento permanecieron almacenadas a -70°C durante todo el experimento y sólo se tomaron alícuotas en hielo para realizar los análisis. Para evaluar la integridad del material extraído se corrieron todas las muestras en gel de agarosa con bromuro de etidio al 1% (100V por 50 min), para observar las bandas de rRNA (RNA ribosomal). En caso de no visualizar una buena cantidad de material o no ver claramente las bandas de rRNA, se repitió la extracción empleando condiciones idénticas ⁽⁸⁾.

Síntesis de cDNA a partir de RNA total

Para sintetizar cDNA (DNA copia) a partir del RNA total extraído se empleó el QuantiTect® Reverse Transcription Kit (QUIAGEN). El Kit utiliza cebadores hexámicos aleatorios y cebadores de poli-Timidinas para maximizar la reacción de retro-transcripción, obteniendo tanto copias del rRNA como mRNA. Para todas las reacciones de retrotranscripción se utilizó la misma cantidad de muestra (1 µg de RNA en cada reacción), con base en los resultados de la cuantificación. Brevemente el protocolo tiene dos pasos: una primera etapa en la que se remueven restos de DNA genómico, para luego adicionar la enzima (Taq polymerase, BIOLASE®) y los nucleótidos trifosfatados para hacer la síntesis del cDNA. Todo el ensayo se realizó teniendo en cuenta las recomendaciones del fabricante. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C durante los demás ensayos ⁽¹⁸⁾.

RT-PCR a partir de cDNA para vilina y el gen de expresión constitutiva

Los cebadores para el gen de interés y de expresión constitutiva (Ciclofilina) se muestran en la tabla 3. Estos cebadores fueron tomados de la literatura, verificando que su diseño hubiera sido realizado en los bordes intrón/exón para evitar la amplificación de DNA genómico. Adicionalmente, se sometieron a diversos análisis bioinformáticos para verificar su especificidad con el

fragmento de mRNA o rRNA estudiado y la ausencia de estructuras secundarias, como la formación de lupas o dímeros entre sí o con el otro cebador ^(4, 18).

Tabla 3. Secuencia de primers utilizados y referencia bibliográfica de donde fueron tomados.

<i>GenT</i>	<i>Secuencia</i>	<i>° alineación</i>	<i>Referencia</i>
Ciclofilina F	5'-GCTCCACGGGAGGTTTCTG -3'	58°C	1
Ciclofilina R	5'-GGTACACCTGTCAAACGGTAACG-3'		
Vilina F	5'-ACCCACAAACCCACCAA -3'	56.8°C	2
Vilina R	5'-CCATCTCTTGCTGCCAAACTATC-3'		

¹ (Paulin et al., 2007), ² (Xu et al., 2011)

Estrategia de normalización, procesamiento de datos obtenidos y cuantificación relativa

Para establecer los niveles de expresión del gen de vilina, se empleó un método de cuantificación relativa usando un gen de expresión constitutiva (Ciclofilina), siguiendo las recomendaciones de diversas publicaciones en cuanto a la escogencia del gen y la estrategia global de normalización ^{24, 38, 15}. La cantidad de material del que se extrajo el RNA, la cantidad de RNA en la reacción de retrotranscripción y la cantidad de cDNA para la amplificación en la PCR fue idéntica para todas las muestras. El gen de expresión constitutiva escogido fue validado en ensayos anteriores bajo condiciones experimentales similares ⁽²⁶⁾. Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el software The ImageJ (User Guide) Version 1.43.

Detección de la expresión de mRNA de Vilina por RT-PCR y cuantificación de los productos de PCR.

La amplificación por RT-PCR del mRNA de Vilina se realizó en muestras individuales de yeyuno ⁽²⁸⁾. El protocolo general de la PCR fue el siguiente:

- Ciclofilina: 95 °C x 1 min; 37 ciclos 95 °C x 30 seg; 58 °C x 30 seg; 72 °C x 40 seg; 72 °C x 3 min; 10 °C x ∞.

- Vilina: 95 °C x 1 min; 37 ciclos 95 °C x 30 seg; 57 °C x 30 seg; 72 °C x 40 seg; 72 °C x 3 min; 10 °C x ∞.

La densidad de los productos de RT-PCR de vilina se analizó en unidades relativas a la densidad de la banda del gen de expresión constitutiva (gen de ciclofilina).

Diseño estadístico

El experimento se realizó según un diseño de bloques al azar (para un total de dos bloques) en un arreglo factorial de 4X4 (4 dietas experimentales por 4 edades posdestete) ⁽³⁶⁾. Para la conformación de los bloques se tomó en consideración el peso inicial de los animales. A cada animal le fue asignado uno de los 16 tratamientos y cada tratamiento tuvo cuatro repeticiones. El análisis estadístico se realizó con el procedimiento de Modelos Lineales Generales (GLM) del programa SAS[®] ⁽³⁴⁾. Las diferencias entre las medias de los tratamientos fueron determinadas por mínimos cuadrados y analizadas por ANOVA. Para realizar la comparación de los promedios entre tratamientos se utilizó una prueba de Duncan ($P < 0,05$).

Resultados

Los cerdos que consumieron la dieta basal presentaron un buen estado de salud, mientras que los animales que recibieron LPS en la dieta basal mostraron incrementos en la temperatura rectal por encima de 38°C durante todo el experimento. No obstante, estos cerdos no presentaron signo alguno de enfermedad que causara su retiro o sacrificio inmediato. Además, al nivel en que se fijó el suministro diario de alimento no hubo sobrantes.

Los datos de expresión molecular de vilina se obtuvieron de la relación entre la expresión del gen de vilina y la expresión del gen constitutivo (Ciclofilina). En este trabajo se evaluó la expresión molecular de vilina en yeyuno en la dieta basal durante los diferentes periodos posdestete con el fin de determinar el efecto exclusivo del destete sobre la expresión de esta proteína. En la tabla 4 pueden observarse los datos obtenidos con la dieta basal (DB) durante los distintos periodos posdestete experimentales en yeyuno.

Tabla 4. Cambios en la expresión molecular de vilina en yeyuno de lechones destetos que consumieron la dieta basal (DB) durante el período posdestete (efecto del destete).

Variable	Período posdestete (días)				EEM
	1	5	7	10	
Vilina	1.17 ^a	0.78 ^b	0.81 ^b	1.00 ^c	0.04

^{a, b, c} Dentro de una misma fila, medias con diferente superíndice son estadísticamente significativas ($P < 0,01$).

EEM: Error estándar de la media.

Para la variable vilina se presentó una disminución estadística significativa ($P < 0,01$) en la expresión molecular a partir del día uno posdestete, donde en el día 5 posdestete los animales presentaron los menores valores de expresión (0,78). Sin embargo, con el transcurso de los días, se aprecia una recuperación parcial en la expresión de las proteínas, llegando a su nivel máximo el día 10 posdestete, sin igualar los valores obtenidos el día 1 posdestete ($P < 0,01$).

Los promedios generales de la expresión molecular de vilina estudiados entre cada uno de los tratamientos y periodos de exposición se pueden observar en las tablas 5 y 6. En este experimento, no se encontró interacción estadística entre las diferentes concentraciones de LPS y los períodos posdestete en que fueron sacrificados los cerdos para ninguna de las variables en estudio, por lo que no fue necesario analizar y desglosar dichos factores de manera independiente.

Para la proteína de arquitectura intestinal vilina se presentaron disminuciones significativas ($P < 0,01$) entre las diferentes dietas (Tabla 5), donde los animales que consumieron D3 presentaron los menores valores de expresión molecular (0,57) en comparación con los animales que consumieron DB (0,94). Sin embargo, no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre D2 y D3 ($P > 0,01$).

Tabla 5. Cambios en la expresión molecular de vilina en yeyuno de lechones destetos que consumieron las diferentes dietas experimentales hasta el día 10 posdestete.

	DB	D1	D2	D3	EEM
Vilina	0.94 ^a	0.72 ^b	0.69 ^b	0.57 ^c	0.03

^{a, b, c} Dentro de una misma fila, medias con diferente superíndice son estadísticamente significativas ($P < 0,01$).

EEM: Error estándar de la media.

Con respecto al parámetro expresión molecular de vilina durante los períodos de exposición a LPS, la evaluación en conjunto de todos los animales (DB, B1, D2 y D3; Tabla 6) presentó una disminución estadística significativa ($P < 0,01$) a partir del día uno posdestete, donde los animales con 10 días de destetados presentaron los menores valores (0,41).

Tabla 6. Cambios en la expresión molecular de vilina en yeyuno de lechones destetos que consumieron las dietas experimentales durante diferentes edades posdestete.

Variable	Período posdestete (días)				EEM
	1	5	7	10	
Vilina	1.17 ^a	0.63 ^b	0.56 ^b	0.41 ^c	0.03

^{a, b, c} Dentro de una misma fila, medias con diferente superíndice son estadísticamente significativas ($P < 0,01$).

EEM: Error estándar de la media.

Discusión

El epitelio intestinal sirve como una barrera física dinámica, la cual bajo condiciones normales regula la absorción de nutrientes, iones y agua (Pié *et al.*, 2004). Sin embargo, bajo diversas situaciones de estrés, como es el caso del destete, se presentan cambios en la estructura de las microvellosidades y a su vez en las proteínas de unión a actina, específicamente vilina, la cual es responsable de la organización y el mantenimiento del citoesqueleto de las vellosidades³². Por lo anterior, la disminución en la expresión molecular de la proteína vilina en los animales que consumieron DB, podría estar asociada con las respuestas inflamatorias e inmunes provocadas por diferentes manifestaciones de estrés durante el periodo del destete, dentro de las que se encuentran la separación abrupta de la madre, la ubicación en nuevos grupos sociales y el cambio de alimento⁽¹⁷⁾. Todo lo anterior podría verse representado en el acortamiento de las vellosidades.

Por otro lado, los animales que recibieron las diferentes dietas experimentales mostraron disminución en la expresión molecular de vilina, lo que es consecuente con los datos reportados por Athman⁽²⁾, donde ratones infectados con *S. flexneri* mostraron lesiones en las vellosidades, caracterizadas principalmente por descamación, edema e inflamación de enterocitos, provocando la ruptura de los filamentos de actina. Aunado a lo anterior, la dinámica del citoesqueleto de actina mediada por vilina, puede ser alterada por la presencia de algunos compuestos en altas concentraciones como sodio o sulfato de dextrano durante procesos infecciosos. Además, la actividad de vilina es afectada por diversas señales producidas por eventos característicos del destete, dentro de los cuales se encuentra el ayuno.

Las proteínas del citoesqueleto, específicamente vilina, desempeñan un papel fundamental en la organización y estructura del borde en cepillo de las microvellosidades. Debido a lo anterior, en este trabajo los animales que consumieron durante tiempos prolongados y en mayores concentraciones LPS, mostraron los menores valores de expresión molecular de vilina, siendo el día 10 posdestete el más crítico. Igualmente Peiffer⁽²⁷⁾, en un estudio in vivo en células caco-2 que fueron infectadas con cepas DAEC (*E.coli* difusamente adherente), se observó que las proteínas de unión a actina de las microvellosidades, incluida vilina, padecen un proceso de desprendimiento, alterando la estabilidad y resistencia de la estructura y a su vez el tamaño de las vellosidades.

Después del destete, en el intestino delgado se observan cambios a nivel funcional y estructural que suceden dentro de las primeras 24 horas posdestete y generalmente los cerdos manifiestan varios síntomas de estrés caracterizados por un período de subalimentación; disminución en la altura de las vellosidades (atrofia), incremento en la profundidad de las glándulas^(14, 39), reducciones en la actividad específica de las enzimas digestivas, reducción en la capacidad de absorción⁽⁴⁸⁾ y por ende, disminución en la tasa de crecimiento. La atrofia de las vellosidades, es producida por la reducción de las proteínas de arquitectura, entre ellas vilina, lo que produce una disminución en la superficie para la digestión y absorción de nutrientes 7 a 14 días posdestete, correspondiendo al tiempo en que se presenta el problema llamado “caída del destete”, representado por la reducción en los procesos de digestión y absorción de nutrientes, deshidratación, y diarreas³³. En la presente investigación se observaron disminuciones en la expresión del gen de vilina, causada por el estrés inducido por el destete y al consumo de los diferentes niveles de LPS, corroborando los resultados encontrados por Hedemann *et al.*⁽¹³⁾; Vente-Spreuwenberg *et al.*^(40, 41); Wang *et al.*⁽⁴²⁾. Efectos similares se han observado luego de la infección experimental con *E. coli* en cerdos gnotobióticos⁽⁴³⁾.

Según lo anterior, el periodo posdestete se caracteriza por una reducción inmediata pero transitoria en el consumo de alimento, que conduce a un estado de desnutrición y de retraso en el crecimiento; y por la aparición de signos de inflamación intestinal temprana. Estos factores afectan varios aspectos de la arquitectura y las funciones del intestino delgado, entre los cuales se han reportado la atrofia de las vellosidades^(3, 14, 39).

Conclusiones

El destete está asociado con múltiples factores que generan la presentación de estrés en los animales, provocando la disminución en la expresión del gen de vilina, y a su vez, cambios morfológicos en la mucosa intestinal, representados por el acortamiento de las vellosidades y la presentación del síndrome de diarrea posdestete.

El LPS de *E. coli* tiene un efecto sobre los parámetros morfológicos intestinales, debido específicamente a la disminución en la expresión del gen de vilina. Este efecto contribuye a la reducción de la altura de las vellosidades y al incremento del ancho de las mismas, afectando los procesos de absorción intestinal de nutrientes y por ende, los parámetros productivos durante esta etapa.

De los hallazgos obtenidos se desprende que es necesario realizar más investigaciones sobre la fisiología digestiva asociadas a la patología ocasionada por endotoxinas como LPS, para mejorar la comprensión de los mecanismos causantes de problemas digestivos y sus posibles estrategias terapéuticas en el crítico periodo posdestete.

Referencias

1. Amador P, Garcia-Herrera J, Marca MC, de la Osada J, Acin S, *et al.* Intestinal D-galactose transport in an endotoxemia model in the rabbit. *J Membr Biol* 2007; 215:125-133.
2. Athman R, Fernandez MI, Gounon P, Sansonetti P, Louvard D, *et al.* Shigella flexneri infection is dependent on villin in the mouse intestine and in primary cultures of intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* 2005; 7(8):1109-16.
3. Boudry G, Péron V, Le Huërou-Luron I, Lallès JP, Sève B. Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine. *J Nutr* 2004 Sep;134(9):2256-62.
4. Bustin, SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000, 25:169-193.
5. CIOMS (Council for International Organizations of Medical Sciences). International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, Geneva, 1985; 28pp.
6. Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, *et al.* The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal Biochem* 2005; 344:141-143.
7. Fan MZ. Growth and ontogeny of the gastrointestinal tract. In: Xu. RJ, Cranwell P editors. The neonatal pig. Gastrointestinal physiology. and nutrition. Nottingham University Press 2002; 31-60.
8. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques* 1999; 26(1): p. 112-22, 124-5.
9. Garcia-Herrera J, Marca MC, Brot-Laroche E, Guillen N, Acin S, *et al.* Protein kinases, TNF- α and proteasome contribute in the inhibition of fructose intestinal transport by sepsis *in vivo*. *Am. J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2008; 294:G155-G164.
10. Gómez A. El destete y la fisiología del lechón. En: I seminario internacional sobre sistemas sostenibles de producción en especies menores. Popayán, 2006. 34p.
11. Gómez IAS, Vergara D, Argote F. Efecto de la dieta y edad del destete sobre la fisiología digestiva del lechón. *Revista Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agronindustrial* 2008; 6:32-41.
12. Hataya Y, Akamizu T, Hosoda H, Kanamoto N, Moriyama K, *et al.* Alterations of Plasma Ghrelin Levels in Rats with Lipopolysaccharide-Induced Wasting Syndrome and Effects of Ghrelin Treatment on the Syndrome. *Endocrinology* 2003; 144: 5365-5371
13. Hedemann MS, Hojsgaard S, Jensen BB. Small intestine morphology and activity of intestinal peptidases in piglets around weaning. *J Anim Physiol Anim Nutr* 2003; 87:32-41.

14. Hedemann MS, Eskildsen M, Lærke HN, Pedersen C, Lindberg JE, et al. Intestinal morphology and enzymatic activity in newly weaned pigs fed contrasting fiber concentrations and fiber properties J Anim Sci 2006; 84:1375-1386.
15. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. Genes Immun 2005; 6:279-84.
16. Johnson GB, Brunn GJ, Samstein B. New insight into the pathogenesis of sepsis and the sepsis syndrome. Surgery 2005; 137:393-395.
17. Kojima CJ, Carroll JA, Matteri RL, Touchette KJ, Allee GL. Effects of weaning and weaning weight on neuroendocrine regulators of feed intake in pigs. J Anim Sci 2007; 85:2133-2139.
18. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, et al. The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspects Med 2006; 27(2-3):95-125.
19. Lallès JP, Boudry G, Favier C, LE Floc'h N, Pié S, Piel C, et al. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. Anim Res 2004; 53:301-316.
20. Lee SC, Han JS, Seo JK, Cha YN. Modulation of cyclooxygenase-2 expression by phosphatidylcholine specific phospholipase C and D in macrophages stimulated with lipopolysaccharide. Mol Cells 2003; 15(3):320-6.
21. Makkink CA, Berntsen PJM, op den Kamp BML, Kemp B, Verstegen WA. Gastric protein breakdown and pancreatic enzyme activities in response to two different dietary protein sources in newly weaned pigs. J Anim Sci 1994; 72:2843-2850.
22. Mariani V, Palermo S, Fiorentini S, Lanubile A, Giuffra E. Gene expression study of two widely used pig intestinal epithelial cell lines: IPEC-J2 and IPI-2I. Vet Immunol Immunopathol 2009; 15,131(3-4):278-84.
23. Marion J, Biernat M, Thomas F, Savary G, Le Breton Y, et al. Small intestine growth and morphometry in piglets weaned at 7 days of age. Effects of level of energy intake. Reprod Nutr Dev 2002; 42: 339-354.
24. Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie ZI. Processing of gene expression data generated by quantitative real time RT-PCR. Biotechniques 2002; 32: 1372-1374, 1376, 1378-1379.
25. NRC. National Research Council. The Nutrient Requirements of Swine. 8th rev. ed. Washington, DC, USA: National Academy Press, 1998.
26. Paulin SM, Jagannathan A, Campbell J, Wallis TS, Stevens MP, et al. Net replication of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Choleraesuis in porcine intestinal mucosa and nodes is associated with their differential virulence. Infect Immun 2007, 75: 3950-3960.
27. Peiffer I, Guignot J, Barbat A, Carnoy C, Moseley SL, et al. Structural and functional lesions in brush border of human polarized intestinal Caco-2/TC7 cells infected by members of the Afa/Dr diffusely adhering family of *Escherichia coli*. Infect Immun 2000; 68(10): 5979-90.
28. Petersen YM, Burrin DG, Sangild PT. GLP-2 has differential effects on small intestine growth and function in fetal and neonatal pigs. Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol 2001; 281: 1986-1993.
29. Pié S, Lallès JP, Blazy F, Laffitte J, Sève B, et al. Weaning Is Associated with an Upregulation of Expression of Inflammatory Cytokines in the Intestine of Piglets. J Nutr 2004; 134: 641-647.
30. Reis STC, Guerrero CMJ, Aguilera BA, Mariscal LG. Efecto de diferentes cereales sobre la morfología intestinal de lechones recién destetados. Téc Pecu Mex 2005; 43 (3): 309-321.
31. Reis STC, BAM, Mariscal LG, Guerrero MJC. Morfología del tracto digestivo de lechones alimentados con proteínas de soya aislada o concentrada. Asociación Latinoamericana de Producción Animal 2007; 4:139-146.
32. Revenu C, Courtois M, Michelot A, Sykes C, Louvard D, et al. Villin severing activity enhances actin-based motility in vivo. Mol Biol Cell 2007; 18(3):827-38.

33. Rodrigues MMA, Silva ODA, Taketomi, AE, Hernandez-Blazquez FJ. IgA production, coliforms analysis and intestinal mucosa morphology of piglets that received probiotics with viable or inactivated cells. *Pesq Vet Bras* 2007; 27: 241-245.
34. SAS®. SAS/STAT User's Guide. Institute Inc. Statistical Analysis Systems Institute. Version 9.1th Ed. Cary, NC.: SAS Institute Inc, 2006.
35. Segalés J, Domingo M. La necropsia en el ganado porcino, diagnóstico anatomopatológico y toma de muestras. Madrid (España). Boehringer Ingelheim 2003; pp 10-14.
36. Steel RG, Torrie JH. Principles and Procedures of Statistics: a biometrical approach (2a Ed), New York (USA) McGraw-Hill Book Co, 1985.
37. Touchette KJ, Carroll JA, Allee GL, Matter RL, Dyer CJ, *et al.* Effect of spray-dried plasma and lipopolysaccharide exposure on weaned pigs: I. Effects on the immune axis of weaned pigs. *J Anim Sci* 2002; 80: 494-501.
38. Vandesompele J. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3(7): p. Research 0034
39. Vente-Spreeuwenberg MAM, Verdonk AC, Gaskins HR, Verstegen MWA. Small intestine epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning. *J Nutr* 2001; 131: 1520-1527.
40. Vente-Spreeuwenberg MAM, Verdonk JMAJ, Verstegen MWA, Beynen AC. Villus height and gut development in weaned piglets receiving diets containing either glucose, lactose or starch. *Brit J Nutr* 2003; 90: 907-913.
41. Vente-Spreeuwenberg MAM, Verdonk JMAJ, Bakker GCM, Beynen AC, Verstegen MWA. Effect of dietary protein source on feed intake and small intestine morphology in newly weaned piglets. *Livest Prod Sci* 2004; 86: 169-177.
42. Wang Y, Shan T, Xu Z, Liu J, Feng J. Effect of lactoferrin on the growth performance, intestinal morphology, and expression of PR-39 and protegrin-1 genes in weaned piglets. *J Anim Sci* 2006; 84: 2636-2641
43. Willing BP, Van Kessel AG. Enterocyte proliferation and apoptosis in the caudal small intestine is influenced by the composition of colonizing commensal bacteria in the neonatal gnotobiotic pig. *J Anim Sci* 2007; 85:3256-3266.
44. Xu RJ, Sangild PT, Zhangc YQ, Zhangd SH. Bioactive compounds in porcine colostrum and milk and their effects on intestinal development in neonatal pigs. *Biology of Growing Animals* 2002; 1:169-192.
45. Xu ZR, Hu CH, Xia MS, Zhan XA, Wang MQ. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poult Sci* 2003; 82: 648-654.
46. Yen JT. Anatomy of the Digestive System and Nutritional Physiology. In: Lewis A.J. and L.L. Southern (Ed.). *Swine Nutrition* 2nd ed. Washington, DC. USA. CRC Press 2002; p 31.
47. Yoo D, Lo W, Goodman S, Ali W, Semrad C, Field M. Interferon-gamma downregulates ion transport in murine small intestine cultured *in vitro*. *Am J Physiol* 2000; 279: G1323-G1332.
48. Zhenfeng Z, Deyuan O, Xiangshu P, Sung WK, Yanhong L, *et al.* Dietary Arginine Supplementation Affects Microvascular Development in the Small Intestine of Early-Weaned. Pigs *J Nutr* 2008; 138: 1304-1309.