

## LIPOPOLISACÁRIDOS DE *E. coli* AUMENTAN LA EXPRESIÓN MOLECULAR DE P $\beta$ D-2 EN YEYUNO DE LECHONES POSDESTETE

J. Ciro<sup>1,2</sup>, A. López<sup>2</sup>, J. Parra<sup>2\*</sup>

Artículo recibido: 5 de febrero de 2014 • Aprobado: 10 de abril de 2014

### RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar el efecto de la inflamación en yeyuno inducida por LPS de *E. coli* sobre la expresión molecular de P $\beta$ D-2 en lechones posdestete. **Materiales y métodos:** el trabajo de campo se realizó en el Centro de Producción San Pablo de la Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín. El estudio se realizó con 32 cerdos destetados a los 21 días de edad, los cuales fueron alimentados durante 10 días con una dieta basal que tuvo como componentes leche y algunos de sus derivados, y que además cumplía con todos los mínimos nutricionales. Los cerdos fueron sacrificados escalonadamente los días 1, 5, 7 y 10 posdestete y se les extrajo completamente el yeyuno. Para inducir la inflamación intestinal los animales fueron alimentados con la dieta basal adicionada con 0.3  $\mu$ g de LPS/mg de alimento. El diseño estadístico utilizado fue de bloques al azar en arreglo factorial de 2x4. **Resultados:** Se observó un aumento ( $P<0.01$ ) en la expresión de P $\beta$ D-2 en los animales que consumieron la dieta con mayor nivel de inclusión de LPS. **Conclusiones:** Los LPS de *E. coli* promueven la expresión molecular de P $\beta$ D-2 secretada para la defensa intestinal; esto lleva a un desequilibrio en la diferenciación celular a nivel intestinal, lo cual podría provocar la presentación de cambios morfológicos intestinales, como disminución en la altura de las vellosidades e incremento en la profundidad de las criptas, además de reducir en las actividades enzimática y absorbiva de nutrientes, lo que deriva en diarrea.

**Palabras clave:** destete, diarreas, fiebre, lechón.<sup>3</sup>

## *E. coli* LIPOPOLYSACCHARIDES INCREASES THE P $\beta$ D-2 MOLECULAR EXPRESSION IN JEJUNUM OF POSTWEANING PIGLETS

### ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the effect on jejunum inflammation induced by consumption of *E. coli* LPS on P $\beta$ D-2 molecular expression in weaned piglets. **Materials and methods:** The experiment was conducted in San Pablo Production Center of the Universidad Nacional de Colombia (Medellin). 32 weaned pigs at 21 days of age were used. Animals were fed for 10 days with a basal diet of milk and some of its derivatives, and that also fulfilled all

<sup>1</sup> Fundación Universitaria Autónoma de la Américas.

<sup>2</sup> Grupo Biodiversidad y Genética Molecular - BIOGEM, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. Calle 59A nro. 63 – 20, A. A. 1779, Medellín (Colombia).

\* Autor para correspondencia: jeparras@unal.edu.co

<sup>3</sup> Fuente de los descriptores: MeSH, *Medical Subject Headings*, es el tesoro de vocabulario autorizado que se usa para la indexación de artículos en PubMed.

the nutritions minimums. Pigs were sequentially slaughtered on days one, five, seven, and 10 days after weaning and a complete extraction of jejunum was realized. To induce intestinal inflammation animals were fed a basal diet supplemented with 0.3 µg de LPS/mg feed). A randomized block design in a 2x4 factorial arrangement was used. **Results:** There was increase ( $P<0.01$ ) in P $\beta$ D-2 molecular expression in animals fed the diet with higher levels of inclusion of LPS. **Conclusions:** LPS from *E. coli* increases expression of P $\beta$ D-2 secreted to the intestinal defense, this leads to imbalance in cellular differentiation in the intestine. This cellular imbalance may cause the presentation of intestinal morphological changes characterized by the decrease in villus height and increased crypt depth, reduction in enzyme activity and nutrient absorption, and eventually diarrhea.

**Key words:** Weaning, diarrheas, fever, piglet.<sup>4</sup>

## INTRODUCCIÓN

Los mecanismos de defensa innata se componen de dos elementos principales: 1) el reclutamiento y la activación de los componentes celulares como macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales y células dendríticas; y, 2) la liberación de un amplio espectro de mediadores extracelulares, tales como citoquinas, quimioquinas y péptidos antimicrobianos. Estos péptidos, también llamados 'péptidos de defensa del hospedero', incluyen una amplia gama de proteínas que se pueden clasificar en defensinas y catelicidinas (Sang y Blecha 2009).

Las defensinas están ampliamente distribuidas en los reinos animal y vegetal. En los vertebrados, múltiples tipos de estas defensinas son producidas por las células Paneth, células especializadas presentes principalmente en las criptas de la mucosa intestinal y en los epitelios que recubren los aparatos respiratorio, digestivo y urogenital (Tlaskalová-Hogenová *et al.* 2011). Las defensinas constituyen un grupo de péptidos antimicrobiales con actividad de amplio espectro contra diversas bacterias, hongos y virus (Linde *et al.* 2008). Dentro de este grupo de defensinas, la  $\beta$  defensina porcina-2

(P $\beta$ D-2) tiene actividad antimicrobiana directa contra gran variedad de patógenos porcinos como *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Streptococcus suis* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Sang y Blecha 2009). P $\beta$ D-2 posee al menos dos funciones basadas en ensayos *in vitro*: una actividad antibiótica directa y, además, una actividad quimiotáctica, lo que contribuye a la atracción de células del sistema inmune al sitio infectado, a la inflamación inicial y a la activación del sistema inmune (Yamaguchi y Ouchi 2012).

P $\beta$ D-2 se produce constitutivamente bajo condiciones fisiológicas normales; sin embargo, su expresión puede ser inducida por productos microbianos exógenos y por citoquinas proinflamatorias. Las citoquinas son péptidos importantes en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria. Aunque principalmente son producidas por linfocitos y macrófagos, en la actualidad está claro que las citoquinas también son producidas por células que tradicionalmente no eran consideradas como parte del sistema inmune, entre las que se incluyen células epiteliales, células endoteliales y fibroblastos (Colditz 2002). Las citoquinas son cruciales en el

<sup>4</sup> Key words source: MeSH, Medical Subject Headings, is the NLM controlled vocabulary thesaurus used for indexing articles for PubMed.

reclutamiento y activación de neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos T y B (Liu *et al.* 2008).

Algunas citoquinas y ciertas interleuquinas son expresadas constitutivamente por células epiteliales intestinales bajo condiciones fisiológicas normales, pero son sobreexpresadas como respuesta a infecciones microbianas (Gopal *et al.* 2008). Muchos estudios han reportado cambios en la expresión de citoquinas inflamatorias en el intestino de animales durante infecciones e inflamaciones intestinales (Oswald *et al.* 2001). Sin embargo, en algunas especies animales –y específicamente en cerdos–, la presentación de procesos inflamatorios a nivel intestinal se asocia con las consecuencias fisiológicas que produce el destete, lo cual favorece el cambio en los niveles intestinales de mRNA de algunas citoquinas proinflamatorias, específicamente del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Garriga *et al.* 2005).

El aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias, como el TNF- $\alpha$ , activa cascadas de señalización que afectan el desarrollo celular normal (Amador *et al.* 2007) e induce cambios importantes en la estructura intestinal, cuya recuperación total y eficiente puede llevar varias semanas (García-Herrera *et al.* 2008).

Dado que la administración de lipopolisacáridos (LPS) de *E. coli* es uno de los modelos más empleados en estudios de procesos infecciosos agudos, puesto que tiene acciones altamente reproducibles y carece de los efectos secundarios asociados a las infecciones bacterianas crónicas (Albin *et al.* 2007), y que el conocimiento sobre la función del LPS en el desarrollo de enfermedades infecciosas en los animales domésticos es escaso, específicamente en la fase de destete, el objetivo de este

estudio fue el de implementar un modelo experimental que permita determinar los efectos de la ingestión de LPS de *E. coli* sobre la expresión molecular de P $\beta$ D-2 en el yeyuno de lechones con diferentes edades 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” (CIOMS 1985). Esta investigación fue avalada por el Comité de Ética en la Experimentación Animal de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín (CEMED 001 del 26 de enero de 2009).

### Localización

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

### Animales

Se utilizaron 32 cerdos resultado de un cruce alterno Duroc x Landrace, destetados exactamente a los 21 días de edad, con un peso de  $6.5 \pm 0.5$  kg. Estos lechones se alojaron en jaulas provistas de comederos de canoa ubicadas en un cuarto con temperatura media controlada (26 ± 3°C). Los animales dispusieron de agua a voluntad durante todo el experimento. 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 (2012) (Tabla 1). 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 del destete hasta el sacrificio, el cual se realizó de manera secuencial o escalonada durante los primeros 10 días posdestete. En el período de lactancia no se suministró alimento sólido a los lechones.

## Dietas

En este experimento se evaluaron dos dietas experimentales: una dieta control [dieta basal, DB: sin adición de LPS] y otra experimental [dieta 1, D1: DB adicionada con 0.3 µg LPS de *E. coli*/mg de alimento] (LPS de *E. coli* serotipo 0111:B4<sup>®</sup>, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

## Toma de muestras de tejido intestinal

Durante la fase experimental se sacrificaron 32 lechones de la siguiente forma: el día inicial o día 1 (día del destete) se sacrificaron cuatro lechones (cuatro animales por tratamiento) 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 los LPS. Los días cinco, siete y 10 posdestete se sacrificaron 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

**TABLA 1.** Composición y análisis proximal de la dieta basal.

Ingredientes	%
Leche en polvo	59.00
Caseína	6.05
Dairylac 80 (lactosa) <sup>a</sup>	15.00
Proliant 1000 (suero) <sup>b</sup>	8.00
Hemoglobina	2.50
Almidón de maíz	4.32
Aceite de palma	2.36
Sal de mar	0.20
Fosfato monodicálcico	0.31
Sal común	0.40
Lisina	0.439
Metionina	0.326
Treonina	0.279
Triptófano	0.061
Adsorbente de toxinas <sup>c</sup>	0.050
Vitaminas <sup>d</sup>	0.360
Minerales <sup>e</sup>	0.120
Saborizantes <sup>f</sup>	0.217

### Análisis proximal de la dieta basal (DB):

Proteína cruda (%)	21.00
Extracto etéreo (%)	8.35
Cenizas (%)	5.42
Humedad (%)	7.22
Energía bruta (Kcal/kg)	3708.0

<sup>a</sup> Dairylac 80<sup>®</sup> (Pro-Ag Products Ltd., Winnipeg, Canadá)

<sup>b</sup> Proliant 1000<sup>®</sup> (Alitecnico S.A.C., Lima, Perú)

<sup>c</sup> Toxibond<sup>®</sup> (Biomix, Medellín, Colombia)

<sup>d</sup> Composición 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 y ácido fólico 0.75 mg.

<sup>e</sup> Composición por kg de alimento: cobre 14.40 mg, hierro 120 mg, manganeso 36 mg, selenio 0.30 mg, yodo 0.96 mg y zinc 144 mg.

<sup>f</sup> Vainilla dulce y esencia de frutas (Prodia, Medellín, Colombia).

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 ileocecal (Segalés y Domingo 2003). El intestino fue alineado y medido en una mesa sin ningún tipo de tensión;

posteriormente 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* (alimento en digestión) contenida en cada una de ellas se removió mediante lavado por infusión con solución salina fría, según lo descrito previamente por Montoya *et al.* 2012. Luego, a partir de cada segmento se obtuvieron varias submuestras (1 cm) las cuales fueron congeladas inmediatamente con nitrógeno líquido hasta realizar las determinaciones de laboratorio.

## Expresión molecular de P $\beta$ D-2

### Síntesis de cADN a partir de ARN total

Para sintetizar el *cDNA* (ADN copia, en español) a partir del *RNA* total extraído se empleó el QuantíTect® Reverse Transcription Kit (QUIAGEN). Este *kit* utiliza cebadores hexámericos aleatorios y cebadores de poli-timidinas para maximizar la reacción de retro-transcripción, obteniendo tanto *rRNA* (ARN ribosomal, en español) como *mRNA* (ARN mensajero, en español). Para todas las reacciones de retrotranscripción se utilizó la misma cantidad de muestra (1  $\mu$ g 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  $-20^{\circ}\text{C}$  durante los demás ensayos (Parra *et al.* 2013). 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* y el barrido que indica la presencia del *mRNA*. Cuando no se visualizó una buena cantidad de material o no se veían claramente las bandas de *rRNA*, se repitió la extracción bajo condiciones idénticas.

### RT-PCR a partir de cADN para P $\beta$ D-2 y el gen de expresión constitutiva

Los cebadores del gen de interés (P $\beta$ D-2) y de expresión constitutiva (ciclofilina) se muestran en la Tabla 2. Estos cebadores se obtuvieron a partir de la revisión de 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 lúpulas o dímeros entre sí o con el otro cebador.

**TABLA 2.** Secuencia de *primers* utilizados y referencia bibliográfica de donde fueron tomados / Sequence of primers used and reference from which were taken.

Gen	Secuencia	To alineación	Referencia
P $\beta$ D-2 F P $\beta$ D-2 R	5'-GCTGACTGTCTGCCTCCTCT-3' 5'-CCAAGACCCGTAAGCAGGT-3'	63°C	Kubista <i>et al.</i> 2006
Ciclofilina F Ciclofilina R	5'-GCTCCACGGGAGGTTCTG-3' 5'-GGTACACCTGTCAAACGGTAACG-3'	58°C	Mariani <i>et al.</i> 2009

La amplificación mediante *RT-PCR* del mRNA de P $\beta$ D-2 se realizó en muestras individuales de yeyuno. (Petersen *et al.* 2001). El protocolo general de la PCR fue el siguiente:

- Ciclofilina: 95 $^{\circ}$ Cx1 min; 37 ciclos 95 $^{\circ}$ Cx30 seg; 58 $^{\circ}$ Cx30 seg; 72 $^{\circ}$ Cx40 seg; 72 $^{\circ}$ Cx3 min; 10 $^{\circ}$ Cx $\infty$ .
- P $\beta$ D-2: 95 $^{\circ}$ Cx1 min; 37 ciclos 95 $^{\circ}$ Cx30 seg; 63 $^{\circ}$ Cx30 seg; 72 $^{\circ}$ Cx40 seg; 72 $^{\circ}$ Cx3 min; 10 $^{\circ}$ Cx $\infty$ .

### **Estrategia de normalización, tratamiento de datos obtenidos y cuantificación relativa**

Para establecer los niveles de expresión de P $\beta$ D-2 se empleó un método de cuantificación relativa usando un gen de expresión constitutiva (ciclofilina) y siguiendo las recomendaciones de diversas publicaciones en cuanto a la escogencia del gen y la estrategia global de normalización (Parra *et al.* 2011). 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 (Mariani *et al.* 2009). Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el software The ImageJ<sup>®</sup> (User Guide) Versión 1.43.

### **Detección de la expresión de mRNA de la proteína de defensa intestinal por RT-PCR y cuantificación de los productos de PCR**

La amplificación por RT-PCR del mRNA de P $\beta$ D-2 se realizó en muestras individuales de yeyuno (Huggett *et al.* 2005; Petersen *et al.* 2001). La densidad de los productos de RT-PCR de P $\beta$ D-2 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 2X4 (2 dietas experimentales por 4 edades posdestete) (Steel y Torrie 1985). 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 tratamientos y cada tratamiento tuvo un total de cuatro repeticiones. El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó utilizando el procedimiento GLM del SAS<sup>®</sup> (2008). Las diferencias entre tratamientos fueron determinadas mediante la prueba de Duncan ( $P < 0.05$ ).

### **RESULTADOS**

Los cerdos que consumieron la dieta basal (DB) presentaron un buen estado de salud, mientras que los animales que recibieron LPS en la dieta (D1) mostraron incrementos en la temperatura rectal por encima de 38 $^{\circ}$ C durante todo el experimento. No obstante, estos cerdos no presentaron síntoma alguno de enfermedad que causara su retiro o sacrificio inmediato. Además, no hubo sobrantes en la cantidad en que se fijó el suministro diario de alimento.

Los datos de expresión molecular de P $\beta$ D-2 se obtuvieron a partir de la relación entre la expresión del gen y la expresión del gen constitutivo (ciclofilina). Con el fin de determinar el efecto exclusivo del destete sobre la expresión de P $\beta$ D-2, en este trabajo se evaluó la expresión molecular de este gen en yeyuno de los animales que consumieron la DB durante los diferentes períodos posdestete. En la Tabla 3 pueden

observarse los datos obtenidos con la dieta basal (DB) durante los diferentes períodos experimentales en yeyuno.

La variable de expresión molecular de P $\beta$ D-2 presentó un incremento significativo ( $P<0.01$ ) a partir del día uno posdestete (0.24) y en el día cinco posdestete los animales presentaron los mayores valores de expresión (0.69). Sin embargo, con

el transcurso de los días se aprecia una disminución parcial en la expresión de P $\beta$ D-2, llegando a su nivel mínimo el día 10 posdestete, sin igualar los valores obtenidos el día 1 posdestete ( $P<0.01$ ).

Los promedios generales de la expresión molecular de P $\beta$ D-2 entre cada uno de los tratamientos y períodos de exposición se pueden observar en las Tablas 4 y 5. En

**TABLA 3.** Niveles de expresión del mRNA de P $\beta$ D-2 en yeyuno de lechones destetos sin exposición a LPS de *E. coli* a medida que avanza el período posdestete (efecto del destete sobre DB) / Mean expression levels of P $\beta$ D-2 mRNA in jejunum of weaned piglets not consuming LPS from *E. coli*, as post weaning days increase (effect of weaning on BD).

Variable	Días posdestete				EEM
	1	5	7	10	
P $\beta$ D-2	0.24 <sup>a</sup>	0.69 <sup>b</sup>	0.58 <sup>b</sup>	0.38 <sup>c</sup>	0.04

<sup>a,b,c</sup>: Las medias con diferente superíndice dentro de la misma fila son estadísticamente significativas ( $P<0.01$ ).

P $\beta$ D-2:  $\beta$  defensina porcina-2.

EEM: error estándar de la media.

**TABLA 4.** Niveles de expresión del mRNA de P $\beta$ D-2 en yeyuno de lechones destetos sin (DB) y con exposición (D1) a LPS de *E. coli*. / Expression levels of P $\beta$ D-2 mRNA in jejunum of weaned piglets with and without consumption of LPS from *E. coli*.

Variable	Tratamiento		EEM
	DB	D1	
P $\beta$ D-2	0.47 <sup>a</sup>	0.79 <sup>b</sup>	0.08

<sup>a,b</sup>: Las medias con diferente superíndice dentro de la misma fila son estadísticamente significativas ( $P<0.01$ ).

DB: Dieta basal.

D1: DB más la adición de 0.3  $\mu$ g de LPS /mg de alimento.

P $\beta$ D-2:  $\beta$  defensina porcina -2.

EEM: error estándar de la media.

**TABLA 5.** Niveles de expresión del mRNA de P $\beta$ D-2 en yeyuno de lechones destetos sin (DB) y con exposición (D1) a LPS de *E. coli* durante el período posdestete / Expression levels of P $\beta$ D-2 mRNA in jejunum of weaned piglets with and without consumption of LPS from *E. coli* during post weaning period.

Variable	Días de exposición a LPS				EEM
	1	5	7	10	
P $\beta$ D-2	0.24 <sup>a</sup>	0.99 <sup>b</sup>	1.15 <sup>b</sup>	1.43 <sup>c</sup>	0.08

<sup>a,b,c</sup>: Las medias con diferente superíndice dentro de la misma fila son estadísticamente significativas ( $P<0.01$ ).

P $\beta$ D-2:  $\beta$  defensina porcina-2.

EEM: error estándar de la media.

este experimento no hubo 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 expresión del *mRNA* de P $\beta$ D-2 se presentaron incrementos significativos ( $P<0.01$ ) entre las diferentes dietas (Tabla 4), donde los animales que consumieron D1 presentaron los mayores valores de expresión molecular (0.79) en comparación con los animales que consumieron DB (0.47).

Con respecto al parámetro expresión molecular de P $\beta$ D-2 durante los períodos de exposición a LPS, la evaluación en conjunto de todos los animales (DB y D1; Tabla 5) presentó un aumento significativo ( $P<0.01$ ) a partir del día uno posdestete, donde los animales con 10 días de destetados presentaron los mayores valores (1.43).

## DISCUSIÓN

La inmunidad innata sirve como la primera línea de defensa en los organismos vertebrados y actúa como barrera inicial en contra de microorganismos y antígenos específicos (Moser *et al.* 2002). Sin embargo, el evento propio del destete en lechones produce varias manifestaciones de estrés (Lai y Gallo 2009) caracterizadas principalmente por el cambio en la población microbiana intestinal, la presentación de signos de inflamación intestinal temprana y las reacciones alérgicas (Lallès *et al.* 2004). Por lo anterior, en este trabajo el aumento en la expresión de P $\beta$ D-2 en los animales que consumieron DB durante los primeros días posdestete (día cinco) podría deberse al evento del destete.

Durante las infecciones bacterianas crónicas se han identificado varias clases de defensinas, lo que sugiere que éstas –y específicamente P $\beta$ D-2–, juegan un papel importante en la inmunidad innata del hospedero (Linde *et al.* 2008). P $\beta$ D-2 es producida no sólo por el revestimiento de las células epiteliales (células Paneth) del tracto gastrointestinal, sino también por las células fagocíticas y linfocitos (Mejía *et al.* 2012). Sang (2009) reportó un estudio con *Bordetella pertussis* en lechones recién nacidos y encontró sobreexpresión de P $\beta$ D-2, la cual es fundamental para la protección de las células y la mucosa, sirviendo como una barrera física. Por lo anterior, aquellos animales que recibieron las dietas experimentales con LPS (D1), presentaron altos valores de expresión molecular de P $\beta$ D-2 respecto a los que consumieron DB, lo que sugiere que la amplia expresión de ésta contribuye a la defensa sistémica del hospedero con el fin de contrarrestar el agente patógeno (Oppenheim *et al.* 2003).

Como se mencionó anteriormente, P $\beta$ D-2 se produce constitutivamente bajo condiciones fisiológicas normales; sin embargo, su expresión puede ser inducida por productos microbianos exógenos, como el LPS. Por lo anterior, en este experimento los animales que recibieron LPS (D1), exhibieron una sobreexpresión de P $\beta$ D-2 en el día 10 posdestete. Aunado a esto, P $\beta$ D-2 tiene la capacidad de servir como señal para iniciar, movilizar y amplificar la respuesta inmune adaptativa del hospedero bajo situaciones de estrés, como lo es la producción de citoquinas proinflamatorias (Athman *et al.* 2005).

Estas citoquinas activan algunas cascadas de señalización, específicamente la vía Notch, la cual afecta el desarrollo

celular normal (Amador *et al.* 2007) e induce cambios importantes en la estructura intestinal, cuya recuperación total y eficiente puede llevar varias semanas (García-Herrera *et al.* 2008). A nivel intestinal, la vía de señalización Notch es de suma importancia, ya que es la encargada de mantener el equilibrio y la homeostasis entre el número células absortivas y secretoras generadas a partir de células madre (Liu *et al.* 2009). En este trabajo, la notable expresión de P $\beta$ D-2 encontrada podría disminuir la diferenciación de las células madre en enterocitos absortivos, lo que conlleva a la presentación de cambios morfológicos intestinales caracterizados por la disminución en la altura de las vellosidades, así como el incremento en la profundidad de las criptas, reducción en la actividad enzimática y absortiva de nutrientes, altas tasas de desnutrición y diarrea. Estos factores pueden contribuir a la presentación de tasas de mortalidad altas en los cerdos en esta etapa (Van der Flier y Clevers 2009).

Además de su importancia en los procesos digestivos, las citoquinas proinflamatorias también participan en la integridad de los tejidos intestinales, ya que afectan la permeabilidad intestinal a través de su efecto sobre la estructura de las uniones apretadas entre células epiteliales (Muller *et al.* 2002), principalmente a nivel del yeyuno (Liu *et al.* 2009). Aunado a esto, el LPS causa el acortamiento de los filamentos de actina en el enterocito, provocando la interrupción en la formación de las uniones apretadas y la reducción de la resistencia transepitelial (Turner 2009). Por tanto, el aumento en la expresión de P $\beta$ D-2, observada en este trabajo a partir del día uno hasta el día 10 posdestete,

afecta la barrera intestinal, incrementando el transporte paracelular indiscriminado de moléculas y el acceso de patógenos gastrointestinales (principalmente bacterias gram-negativas) a la circulación sistémica (García-Herrera *et al.* 2008).

## CONCLUSIONES

Durante el período del destete se presentan múltiples factores que generan la presentación de estrés en lechones, entre ellos el cambio en la población microbiana intestinal que provoca el aumento en la expresión de P $\beta$ D-2 y por tanto, en la respuesta inflamatoria temprana, son factores que derivan en la ocurrencia de alteraciones anatómicas y funcionales a nivel intestinal.

La alta expresión de P $\beta$ D-2 encontrada en los animales que consumieron LPS de *E. coli*, es el resultado de la disminución en los procesos de diferenciación de las células madre en enterocitos absortivos, lo que conlleva la presentación de cambios morfológicos intestinales caracterizados por la reducción de la altura de las vellosidades y el incremento en la profundidad de las criptas, reducción en la actividad enzimática y absortiva de nutrientes, altas tasas de desnutrición y episodios de diarrea. Estos factores pueden contribuir a la ocurrencia de altas tasas de mortalidad de cerdos en esta etapa posdestete.

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

## REFERENCIAS

- Albin DM, Wubben JE, Rowlett JM, Tappenden KA, Nowak RA. 2007. Changes in small intestinal nutrient transport and barrier function after lipopolysaccharide exposure in two pig breeds. *J Anim Sci.* 85:2517-2523.
- Amador P, García-Herrera J, Marca MC, de la Osada J, Acin S, Navarro MA, Salvador MT, Lostao MP, Rodriguez-Yoldi MJ. 2007. Intestinal D-galactose transport in an endotoxemia model in the rabbit. *J Membr Biol.* 215:125-133.
- Athman R, Fernández MI, Gounon P, Sansonetti P, Louvard D, Philpott D, Robine S. 2005. *Shigella flexneri* infection is dependent on villin in the mouse intestine and in primary cultures of intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol.* 7(8):1109-1116.
- [CIOMS] Council for International Organizations of Medical Sciences. 1985. International guiding principles for biomedical research involving animals. Geneva. 28 pp.
- Colditz IG. 2002. Effects of the immune system on metabolism: Implications for production and disease resistance in livestock. *Livest Prod Sci.* 75(3):257-268.
- García-Herrera J, Marca MC, Brot-Laroche E, Guillen N, Acin S, Navarro MA, Osada J, Rodríguez-Yoldi MJ. 2008. Protein kinases, TNF- $\alpha$  and proteasome contribute in the inhibition of fructose intestinal transport by sepsis in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 294:G155-G164.
- Garriga C, Pérez-Bosque A, Concepción A, Campbell JM, Russell L, Polo J. 2005. Spray-dried porcine plasma reduces the effects of staphylococcal enterotoxin B on glucose transport in rat intestine. *J Nutr.* 135:1653-1658.
- Gopal R, Birdsall D, Monroy FP. 2008. Regulation of toll-like receptors in intestinal epithelial cells by stress and *Toxoplasma gondii* infection. *Parasite Immunol.* 11-12:563-576.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. 2005. Real-time RT-PCR normalization; strategies and considerations. *Genes Immun.* 6:279-284.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et al. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 27(2-3):95-125.
- Lai Y, Gallo RL. 2009. AMPed up immunity: How antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol.* 30(3):131-141.
- Lallès JPL, Boudry G, Favier C, Le Floc'h N, Luron I, Montagne L, Oswald IP, Pié S, Piel C, Sèvre B. 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Anim Res.* 53:301-316.
- Linde A, Ross R, Davis G, Dib L, Blecha F, Melgarrejo T. 2008. Innate immunity and host defense peptides in veterinary medicine. *J Vet Intern Med.* 22(2):247-265.
- Liu Y, Huang J, Hou Y, Zhu H, Zhao S, Ding B, Yin Y, Yi G, Shi J, Fan W. 2008. Dietary arginine supplementation alleviates intestinal mucosal disruption induced by *Escherichia coli* lipopolysaccharide in weaned pigs. *Br J Nutr.* 100(3):552-560.
- Liu PT, Schenk M, Walker VP, Dempsey PW, Kanchanapoomi M, Wheelwright M, Vazirnia A, Zhang X, Steinmeyer A, Zügel U, Hollis BW, Cheng G, Modlin RL. 2009. Convergence of IL-1beta and VDR activation pathways in human TLR2/1-induced antimicrobial responses. *4(6):e5810.* doi: 10.1371.
- Mariani V, Palermo S, Fiorentini S, Lanubile A, Giuffra E. 2009. Gene expression study of two widely used pig intestinal epithelial cell lines: IPEC-J2 and IPI-2I. *Vet Immunol Immunop.* 131(3-4):278-84.
- Mejía MJ, Rincón RJ, Gutiérrez VC, Correa LG, López HA, Parra SJ. 2012. Valoración de parámetros clínicos y lesiones en órganos de cerdos durante el período posdestete. *Acta Agron.* 61(1):61-68.
- Montoya RC, López HA, Parra SJ. 2012. Alteraciones en la producción mRNA de enzimas intestinales de cerdos durante varios períodos posdestete. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial.* 10(2):126-134.
- Moser C, Weiner D, Lysenko E, Bals R, Weiser J, Wilson J. 2002.  $\beta$ -Defensin 1 contributes to pulmonary innate immunity in mice. *Infect Immun.* 70(6):3068-3072.
- Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, Dobbie Z. 2002. Processing of gene expression data generated by quantitative real time RT-PCR. *Bio-techniques.* 32:1372-1374, 1376, 1378-1379.

- [NRC] National Research Council. 2012. The nutrient requirements of swine. 11th ed. Washington: The Institute - National Academy Press.
- Oppenheim JJ, Biragyn A, Kwak LW, Yang D. 2003. Roles of antimicrobial peptides such as defensins in innate and adaptive immunity. *Ann Rheum Dis.* 62 (Suppl II):ii17-ii21.
- Oswald IP, Dozois CM, Barlagne R, Fournout S, Johansen MV, Bogh HO. 2001. Cytokine mRNA expression in pigs infected with *Schistosoma japonicum*. *Parasitology.* 122:299-307.
- Parra SJ, Agudelo TJ, Ortiz L, Ramírez M, Rodríguez B, López HA. 2011. Lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* has detrimental effects on the intestinal morphology of weaned pigs. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 24:598-608.
- Parra SJ, Agudelo TJ, Sanín PD, Forero DJ, Muskus C, López HA. 2013. Intestinal expression of pro-inflammatory cytokines induced by oral intake of lipopolysaccharides (LPS) from *E. coli* in weaned pigs. *Rev Colomb Cienc Pecu.* 26:108-118.
- Petersen YM, Burrin DG, Sangild PT. 2001. GLP-2 has differential effects on small intestine growth and function in fetal and neonatal pigs. *Am J Physiol-Reg I.* 281:1986-1993.
- Sang Y, Blecha F. 2009. Porcine host defense peptides: Expanding repertoire and functions. *Dev Comp Immunol.* 33(3):334-343.
- [SAS] Statistical Analysis Systems. 2008. SAS/STAT User's Guide. Version 9.2th. Statistical Analysis Systems Institute. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Segalés J, Domingo M. 2003. La necropsia en el ganado porcino, diagnóstico anatopatológico y toma de muestras. Madrid: Boehringer Ingelheim. p. 10-14.
- Steel RG, Torrie JH. 1985. Principles and procedures of statistics: A biometrical approach (2<sup>nd</sup> Ed). New York (USA). McGraw-Hill Book Co.
- Tlaskalová-Hogenová H, Stěpánková R, Kozáková H, Hudcovic T, Vannucci L, Tučková L, Rossmann P, Hrnčíř T, Kverka M, Zá kostelská Z, et al. 2011. The role of gut microbiota (commensal bacteria) and the mucosal barrier in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases and cancer: Contribution of germ-free and gnotobiotic animal models of human diseases. *Cell Mol Immunol.* 8(2):110-120.
- Turner JR. 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 9(11):799-809.
- Van der Flier LG, Clevers H. 2009. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol.* 71:241-260.
- Yamaguchi Y, Ouchi Y. 2012. Antimicrobial peptide defensin: identification of novel isoforms and the characterization of their physiological roles and their significance in the pathogenesis of diseases. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 88(4):152-166.

### Article citation:

Ciro J, López A, Parra J. 2014. Lipopolisacáridos de *E. coli* aumentan la expresión molecular de P $\beta$ D-2 en yeyuno de lechones posdestete. [*E. coli* lipopolysaccharides increases the P $\beta$ D-2 molecular expression in jejunum of postweaning piglets]. *Rev Fac Med Vet Zoot.* 61(2):142-152.