

LPS DE *E. COLI* AUMENTA LA EXPRESIÓN MOLECULAR DE PBD-2 EN

YEYUNO DE LECHONES POSDESTETE

LPS INCREASES THE PBD-2 MOLECULAR EXPRESSION IN JEJUNUM OF

POSTWEANING PIGLETS

J. Ciro^{1,2}, A. López², J. Parra^{2}*

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 β D-2 en lechones posdestete. **Materiales y métodos:** El trabajo de campo se realizó en el Centro San Pablo, perteneciente a la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín. El estudio se realizó con 52 cerdos destetados a los 21 días de edad. Los animales 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 una dieta basal, adicionada con 0.3 μ 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 β D-2 en los animales que consumieron la dieta con mayor nivel de inclusión de LPS. **Conclusiones:** El LPS de *E. coli* aumenta la expresión molecular de P β D-2 secretada para la defensa intestinal; esto lleva al desequilibrio en la diferenciación celular a nivel intestinal. Este desequilibrio celular podría provocar la

¹ Fundación Universitaria Autónoma de las Américas.

² 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).

presentación de cambios morfológicos intestinales caracterizados por la disminución en la altura de las vellosidades e incremento en la profundidad de las criptas, reducción en la actividad enzimática y absorbiva de nutrientes, y finalmente, diarrea.

Palabras clave: destete, diarreas, fiebre, lechón. (Fuente: MesH)

ABSTRACT

Objective: To evaluate the effect on jejunum inflammation induced by consumption of *E. coli* LPS on P β D-2 molecular expression in weaned piglet. **Materials and Methods.** The experiment was conducted in San Pablo Production Center of the Universidad Nacional de Colombia (Medellín). We used 52 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 the nutritional 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 ug LPS/mg feed). A randomized block design in a 2x4 factorial arrangement was used. **Results:** There was increase (P <0.01) in P β 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 β 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. (Source: MesH)

INTRODUCCION

Los mecanismos de defensa innata se componen de dos elementos principales: el reclutamiento y la activación de los componentes celulares como macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales y células dendríticas; y 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 por todo el reino animal y vegetal. Múltiples tipos de estas defensinas son producidas por las células Paneth, células especializadas presentes principalmente en las criptas de la mucosa intestinal y en células epiteliales que recubren el aparato respiratorio, digestivo y urogenital (Tlaskalová et ál. 2011).

Las defensinas constituyen un grupo de péptidos antimicrobiales, con actividad de amplio espectro contra diversas bacterias, hongos y virus, (Linde et ál. 2008). Dentro de este grupo de defensinas, la beta defensina porcina-2 (P β 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 β D-2 posee al menos dos funciones basadas en ensayos *in vitro*: función antibiótica directa y 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 β 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 son principalmente producidas por linfocitos y macrófagos, está claro ahora, que las citoquinas también son producidas por células que tradicionalmente no eran consideradas como parte del sistema inmune, éstas incluyen las células epiteliales, células endoteliales, y fibroblastos (Colditz 2002). Las citoquinas son cruciales en el reclutamiento y activación de neutrófilos, macrófagos, células dendríticas y linfocitos T y B (Liu et ál. 2008).

Algunas citoquinas y ciertas interleuquinas, son expresadas constitutivamente por células epiteliales intestinales bajo condiciones fisiológicas normales, pero son abundantemente sobreexpresadas en respuesta a infecciones microbianas (Gopal et ál. 2008). Muchos estudios han reportado cambios en la expresión de citoquinas inflamatorias en el intestino de animales durante infecciones e inflamaciones a nivel intestinal (Oswald et ál. 2001). Sin embargo, en algunas especies animales, específicamente en cerdos, la presentación de procesos inflamatorios a nivel intestinal está asociada a los procesos fisiológicos que produce el destete, lo cual favorece el cambio en los niveles intestinales de mRNA de algunas citoquinas proinflamatorias, específicamente de TNF- α (Garriga et ál. 2005).

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

Dado que la administración de LPS de *E. coli* es uno de los modelos más empleados en estudios de procesos infecciosos agudos, ya que tiene acciones altamente reproducibles y

carece de los efectos secundarios asociados a las infecciones bacterianas crónicas (Albin et ál. 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 β D-2 en 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 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 cerdos 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 jaulas provistas de comedero de canoa, las cuales fueron ubicadas en un cuarto con temperatura controlada a $26 \pm 3^\circ\text{C}$. 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 requirieran. 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. Durante la lactancia no se suministró alimento sólido a los lechones.

Dietas. En este experimento se evaluaron dos dietas experimentales, una dieta control (basal) y otra 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 mas la adición de 0.3 µg de LPS /mg de alimento.

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 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 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 (Segalés y Domingo 2003). 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 (Montoya et ál. 2012). Luego se obtuvieron varias submuestras (1 cm) de cada segmento, las cuales fueron congeladas inmediatamente con nitrógeno líquido hasta realizar las determinaciones de laboratorio.

Expresión molecular de P β D-2

Síntesis de cDNA a partir de RNA total.

Para sintetizar del 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 rRNA como mRNA. Para todas las reacciones de retrotranscripción se utilizó la misma cantidad de muestra (1 μ 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 almacena a -20°C durante los demás ensayos (Parra et ál. 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 (RNA ribosomal) y el barrido que indica la presencia del mRNA (RNA mensajero). Cuando no se visualizó una buena cantidad de material o no se venían claramente las bandas de rRNA, se repetía la extracción empleando condiciones idénticas.

RT-PCR a partir de cDNA para P β D-2 y el gen de expresión constitutiva.

Los cebadores del gen de interés (P β D-2) y de expresión constitutiva (Ciclofilina) se muestran en la Tabla 2. 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.

La amplificación por RT-PCR del mRNA de P β D 2 se realizó en muestras individuales de yeyuno. (Petersen et ál. 2001). El protocolo general de la PCR fue el siguiente:

- Ciclofilina: 95⁰Cx1 min; 37 ciclos 95⁰Cx30 sg; 58⁰Cx30 sg; 72⁰Cx40 sg; 72⁰Cx3 min; 10⁰Cx ∞ .
- P β D 2: 95⁰Cx1 min; 37 ciclos 95⁰Cx30 sg; 63⁰Cx30 sg; 72⁰Cx40 sg; 72⁰Cx3 min; 10⁰Cx ∞ .

Estrategia de normalización, tratamiento de datos obtenidos y cuantificación relativa.

Para establecer los niveles de expresión de P β D-2 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 (Parra et ál. 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 ál. 2009). Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el software The ImageJ (User Guide) Version 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 β D-2 se realizó en muestras individuales de yeyuno (Huggett et ál. 2005; Petersen et ál. 2001). La densidad de los productos de RT-PCR de P β 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 postdestete) (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 4 repeticiones. El análisis estadístico de los datos obtenidos, se realizó utilizando el procedimiento GLM del SAS (2006). Las diferencias entre tratamientos fueron determinadas por la 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 síntoma 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 P β D-2 se obtuvieron 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 β D-2, en este trabajo se evaluó la expresión

molecular de este gen en yeyuno de los animales que consumieron la dieta basal durante los diferentes periodos posdestete. En la tabla 3 pueden observarse los datos obtenidos con la dieta basal (DB) durante los diferentes periodos experimentales en yeyuno.

La variable expresión de P β D-2 se presentó un incremento significativo ($P < 0.01$) en la expresión molecular a partir del día uno posdestete, donde en el día 5 posdestete los animales presentaron los mayores valores de expresión (0.69 respectivamente). Sin embargo, con el transcurso de los días, se aprecia una disminución parcial en la expresión de P β 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 β D-2 entre cada uno de los tratamientos y periodos de exposición se pueden observar en las tablas 4 y 5. En 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 β D-2 se presentaron incrementos significativos ($P < 0.01$) entre las diferentes dietas (Tabla 5), 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 β D-2 durante los períodos de exposición a LPS, la evaluación en conjunto de todos los animales (DB y D1; Tabla 6) 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).

DISCUSION

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 ál. 2002). Sin embargo en lechones, el evento propio del destete, 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 ál. 2004). Por lo anterior, en este trabajo el aumento en la expresión de P β D-2 en los animales que consumieron DB durante los primeros días posdestete (día cinco) podría deberse al evento del destete.

Durante infecciones bacterianas crónicas, varias clases defensinas han sido identificadas, lo que sugiere que éstas, específicamente P β D-2, juegan un papel importante en la inmunidad innata del hospedero (Linde et ál. 2008). P β 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 ál. 2012). Sang (2009), reportó un estudio con *Bordetella pertusis* en lechones recién nacidos y encontró sobreexpresión de P β 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, presentaron altos valores de expresión molecular de P β D-2 respecto a los que consumieron DB, sugiriendo que la amplia expresión de ésta contribuye a la defensa sistémica del hospedero con el fin de contrarrestar el agente patógeno (Oppenheim et ál. 2003).

Como se mencionó anteriormente, P β 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, exhibieron una sobreexpresión de P β D-2 en el día 10 posdestete. Aunado a esto, P β 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 ál. 2005).

Estas citoquinas, activan algunas cascadas de señalización, específicamente la vía Notch, la cual afecta el normal desarrollo celular (Amador et ál. 2007), e induce cambios importantes en la estructura intestinal, cuya recuperación total y eficiente puede llevar varias semanas (García-Herrera et ál. 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 madres (Liu et ál. 2009). En este trabajo la alta expresión de P β 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 e 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 altas tasas de mortalidad de 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 ál. 2002), principalmente a nivel del yeyuno (Liu et ál. 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 disminución en la resistencia transepitelial (Turner 2009). Por tanto, el aumento en la expresión de P β 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 ál. 2009).

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, provocando el aumento en la expresión de P β D-2, y por ende, la respuesta inflamatoria temprana, lo que contribuyen a desordenes anatómicos y funcionales a nivel intestinal.

La alta expresión de P β 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 a la presentación de cambios morfológicos intestinales caracterizados por la disminución en la altura de las vellosidades e 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 altas tasas de mortalidad de cerdos en 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 postdestete.

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, Garcia-Herrera J, Marca MC, de la Osada J, Acin S, Navarro MA, et al. 2007. Intestinal D-galactose transport in an endotoxemia model in the rabbit. *J Membr Biol* 2007; 215: 125–133.
- Athman R, Fernandez MI, Gounon P, Sansonetti P, Louvard D, Philpott D, et ál. 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. *Livestock Production Science.* 75: 257–268.
- Garcia-Herrera J, Marca MC, Brot-Laroche E, Guillen N, Acin S, Navarro MA, et al. 2008. Protein kinases, TNF- α 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, Birdsell 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 normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun.* 6: 279-284.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, et ál. 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 JP, Boudry G, Favier C, LE Floc'h N, Pié S, Piel C, et ál. 2004. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology. *Anim Res.* 53: 301-316.
- Linde A, Ross R, Davis G, Dib L, Blecha F, Melgarejo 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, et al. 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, et ál. 2009. Convergence of IL-1beta and VDR activation pathways in human TLR2/1-induced antimicrobial responses. *5; 4(6): e5810.*
- 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 Immunopathol.* 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 Agronómica.* 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. β -Defensin 1 Contributes to Pulmonary Innate Immunity in Mice. *Infection and Immunity*. 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. *Biotechniques*. 32: 1372-1374, 1376, 1378-1379.
- NRC. National Research Council. 2012. *The Nutrient Requirements of Swine*. 11th ed. National Academy Press Washington: The institute.
- 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. Escherichia coli LPS lipopolysaccharide has detrimental effects on the intestinal morphology of weaned pigs. *Rev Colomb Cienc Pecu*. 24: 598-608.
- Parra SJ, Agudelo TJ, Sanin 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 Regulatory Integrative Comp Physiol*. 281: 1986-1993.

- Rescigno M. 2011. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends Immunol.* 32(6): 256-264.
- Sang Y, Blecha F. 2009. Porcine host defense peptides: expanding repertoire and functions. *Dev Comp Immunol.* 33(3): 334-343.
- SAS®. SAS/STAT User's Guide. 2008. Institute Inc. Statistical Analysis Systems Institute. Version 9.2th Ed. Cary, NC. SAS Institute Inc.
- Segalés J, Domingo M. 2003. La necropsia en el ganado porcino, diagnóstico anatomopatológico y toma de muestras. Madrid (España). Boehringer Ingelheim. 10-14.
- Steel RG, Torrie JH. 1985. Principles and Procedures of Statistics: a biometrical approach (2^a Ed). New York (USA). McGraw-Hill Book Co.
- Tlaskalová-Hogenová H, Stěpánková R, Kozáková H, Hudcovic T, Vannucci L, Tučková L, et ál. 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.

Tabla 1. Composición y análisis proximal de la dieta basal.

Ingredientes	%
Leche en polvo	59.00
Caseína	6.05
Dairylac 80 (lactosa) ^A	15.00
Proliant 1000 (suero) ^B	8.00
Hemoglobina	2.50
Almidón de maíz	4.32
Aceite de palma	2.36
Sal de mar	0.20
Fosfato monodivale	0.31
Sal común	0.40
Lisina	0.439
Metionina	0.326
Treonina	0.279
Triptófano	0.061
Adsorbente de Toxinas ^C	0.050
Vitaminas ^D	0.360
Minerales ^E	0.120
Saborizantes ^F	0.217
Análisis proximal de la dieta basal	
Proteína Cruda (%)	21.00
Extracto Etéreo (%)	8.35
Cenizas (%)	5.42
Humedad (%)	7.22
Energía bruta (Kcal/kg)	3708.0

^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).

MANUSCRITO ACEPTADO

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	t° alineación	referencia
PβD 2 F	5'-GCTGACTGTCTGCCTCCTCT-3'	63°C	1
PβD 2 R	5'-CCAAGACCCGTAAGCAGGT-3'		
Ciclofilina F	5'-GCTCCACGGGAGGTTTCTG-3'	58°C	2
Ciclofilina R	5'-GGTACACCTGTCAAACGGTAACG-3'		

¹(Kubista et ál. 2006), ²(Mariani et ál. 2009)

TABLA 3. Niveles de expresión del mRNA de PβD-2 en yeyuno de lechones destetos sin exposición a LPS de *E. coli* a medida que avanza el periodo postdestete (efecto del destete sobre DB). / Mean expression levels of PβD-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 postdestete				EEM
	1	5	7	10	
PβD-2	0.24 ^a	0.69 ^b	0.58 ^b	0.38 ^c	0.04

^{a, b, c} Dentro de una misma fila, medias con diferente superíndice son estadísticamente significativas (P < 0.01).

PβD-2: β defensina Porcina-2.

EEM: Error estándar de la media.

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

Variable	Tratamiento		EEM
	DB	D1	
PβD-2	0.47 ^a	0.79 ^b	0.08

^{a, b} Dentro de una misma fila, medias con diferente superíndice son estadísticamente significativas (P < 0.01).

DB: Dieta basal. D1: DB mas la adición de 0.3 µg de LPS /mg de alimento.

PβD-2: β defensina Porcina -2.

EEM: Error estándar de la media.

TABLA 5: Niveles de expresión del mRNA de P β D-2 en yeyuno de lechones destetos sin (DB) y con exposición (D1) a LPS de *E. coli* durante el periodo posdestete. / Expression levels of P β 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 β D-2	0.24 ^a	0.99 ^b	1.15 ^b	1.43 ^c	0.08

^{a, b, c} Dentro de una misma fila, medias con diferente superíndice son estadísticamente significativas (P < 0.01).

P β D-2: β defensina Porcina-2.

EEM: Error estándar de la media.

En prensa