

Expresión de enzimas relacionadas con la síntesis de poliaminas en mucosa intestinal de cerdos recién destetados

Arce, N.¹, Cervantes, M.², Araiza, B.² y Morales, A.^{2*}

¹Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de Nuevo León. México.

²Instituto de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma de Baja California. México.

RESUMEN

El estrés del destete puede alterar la salud intestinal de los cerdos; en esta etapa arginina se vuelve esencial ya que participa en la síntesis de poliaminas y éstas son importantes para mantener la viabilidad y proliferación celular en el epitelio intestinal. Se analizó la expresión de las enzimas arginino-succinato-sintasa (ASS) y espermina-espermidina-acetil-transferasa (SSAT) relacionadas con la síntesis de arginina y poliaminas, en mucosa de intestino delgado de cerdos destetados. Veinticuatro cerdos destetados a los 28 días de edad, fueron sacrificados a los 0, 3, 7 y 14 días postdestete. Se colectaron muestras de mucosa de duodeno, yeyuno e íleon en las que se analizó la expresión relativa de ASS y SSAT. La expresión de ASS en duodeno se incrementó en el d3 ($P<0.05$), pero fue menor en los d7 y d14 comparado con el d0 ($P<0.05$). En yeyuno la expresión de ASS se redujo en el d14 en comparación con el d0 ($P<0.05$). La expresión de SSAT tendió a incrementarse al d3 postdestete ($P<0.10$) en íleon, pero no se fue diferente en otros segmentos del intestino delgado ($P>0.10$). En general, la expresión de ASS y SSAT fue mayor en íleon en comparación con duodeno y yeyuno ($P<0.05$). En conclusión, el estrés postdestete incrementa la expresión de ASS y SSAT en mucosa intestinal de lechones durante los primeros días postdestete.

Expression of enzymes related to polyamine synthesis in intestinal mucosa of weaned piglets

SUMMARY

The weaning stress can modify the intestinal health of piglets; at this period arginine become essential, because its role at the polyamine synthesis, that are important to maintain cell viability and proliferation in the intestinal epithelium. The expression of enzymes argininosuccinate synthetase (ASS) and spermine/spermidine acetyl transferase (SSAT), associated to arginine and polyamines synthesis on mucosae of small intestine from weaned pigs, was analyzed. Twenty-four pigs, weaned at 28 days of age were slaughtered at 0, 3, 7 and 14 days postweaning. Mucosal samples were collected of duodenum, jejunum and ileum, to analyze the relative expression of ASS and SSAT. The ASS expression in duodenum increased at d3 ($P<0.05$), but was lower on d7 and d14 compared to d0 ($P<0.05$). In jejunum, the expression of ASS was reduced on d14 compared to d0 ($P<0.05$). The expression of SSAT tended to increase at d3 postweaning in ileum ($P<0.10$), but no difference was observed in another sections of the small intestine ($P>0.10$). In general, the expression of ASS and SSAT was higher in ileum compared to duodenum and jejunum ($P<0.05$). In conclusion postweaning stress increases the expression of ASS and SSAT in intestinal mucosa from piglets in the first three days after weaning.

PALABRAS CLAVE

Poliaminas.
Lechones.
Destete.
Argininosuccinato sintetasa.
Espermina/espermidina acetiltransferasa.

ADDITIONAL KEYWORDS

Polyamine.
Piglets.
Weaning.
Argininosuccinate synthetase.
Spermine/spermidine acetyl transferase.

INFORMATION

Cronología del artículo.
Recibido/Received: 06.12.2019
Aceptado/Accepted: 12.03.2020
On-line: 15.04.2020
Correspondencia a los autores/Contact e-mail:
adriana_morales@uabc.edu.mx

INTRODUCCIÓN

El estrés debido al destete puede provocar problemas de diarrea, anorexia y retraso en el crecimiento (Chen et al. 2014; Wang et al. 2016). En esta condición, a nivel intestinal se observa atrofia o acortamiento

de vellosidades, pérdida de la integridad del epitelio intestinal y predisposición a la entrada de toxinas o microorganismos nocivos (Moeser et al. 2017). En la búsqueda de mecanismos para acelerar la reparación del epitelio, estos cambios requieren ser bien entendidos a nivel celular.

La restitución del epitelio intestinal ocurre gracias a la proliferación de células localizadas en las criptas intestinales y a su posterior migración hacia la punta de las vellosidades (Wang et al. 2016). Al parecer las poliaminas juegan un papel importante en este proceso, ya que estimulan la proliferación y diferenciación de las células epiteliales en enterocitos (Wu et al. 2000; Gao et al. 2013). Las poliaminas putrescina, espermina, y espermidina derivan del metabolismo de algunos aminoácidos como arginina, ornitina y glutamina (Wu et al. 2009; Gao et al. 2013).

Entre las enzimas involucradas en la biosíntesis de poliaminas se encuentran arginina succinato sintasa (ASS) y arginina succinato liasa para la síntesis de arginina a partir de citrulina (Wu et al. 2009). Arginina es precursor de ornitina, a partir de la cual se sintetiza putrescina que sirve a su vez como precursor para formar espermidina y espermina. La interconversión entre estas poliaminas se lleva a cabo por la enzima espermidina/espermina N1 acetil transferasa (SSAT; Pegg 2008; Wu et al. 2009). La actividad y sincronía de estas enzimas es importante para regular el metabolismo, síntesis y tasa de degradación de las poliaminas (Casero & Pegg 2009), así como la reparación del epitelio intestinal (Ray et al. 2000; Gao et al. 2013).

Con base en lo anterior, es probable que el estrés del destete afecte la expresión de las enzimas encargadas de la síntesis de poliaminas en intestino delgado, lo que podría asociarse con un efecto negativo en la proliferación, migración de enterocitos, y reparación del epitelio. El objetivo de este trabajo consistió en analizar la expresión de las enzimas ASS y SSAT en mucosa intestinal de lechones, durante los primeros 14 días postdestete.

MATERIAL Y MÉTODOS

Este trabajo se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California, ubicado al noroeste de México. El manejo experimental de los cerdos empleados en este experimento siguió los lineamientos de la NOM para el manejo y cuidado de los animales de laboratorio (NOM-062-Z00-1999, 2001).

Se utilizaron 24 cerdos destetados a los 28 días de edad, hembras y machos, con peso vivo de 7.4 ± 0.1 kg, de cruce York-Landrace-Duroc, seleccionados de diferentes camadas. A partir de los 10 días de edad los lechones recibieron alimento pre-iniciador con 3.2 Mcal de EM y 24 % de PC, (1.23, 0.35 y 0.77 % de lisina, metionina y treonina, respectivamente) a base de trigo molido y pasta de soya (Tabla I). A partir del destete los cerdos se alojaron en grupos de cinco cerditos dentro de jaulas (1.1 x 1.5 m) con piso elevado y plastificado, equipados con comedero de acero inoxidable de cuatro bocas y bebedero automático tipo chupón. La sala en que se alojó a los cerdos estaba equipada con calefactores eléctricos para mantener temperatura de

confort de los cerdos de esta edad ($30 \pm 2^\circ\text{C}$). Aleatoriamente los cerdos fueron sacrificados en grupos de seis animales, en el día 0 (d0, un día antes del destete), y d3, d7 y d14 postdestete. El sacrificio de los cerdos se realizó por aturdimiento eléctrico y desangrado en el taller de carnes de este instituto. Inmediatamente después del sacrificio, se colectaron aprox. 500 mg de mucosa intestinal de duodeno, yeyuno e íleon, mediante raspado con un portaobjetos estéril. Las muestras se colocaron en microtubos de 2 ml, y se congelaron en nitrógeno líquido para almacenarse a -80°C , hasta su análisis en laboratorio. El peso promedio de cada grupo de cerditos en el d0, d3, d7 y d14 postdestete fue 7.44, 7.94, 6.32 y 9.46 kg, respectivamente.

EXTRACCIÓN DE ARN Y RETROTRANSCRIPCIÓN

Se realizó extracción de ARN total de todas las muestras de mucosa intestinal de acuerdo al protocolo descrito por Méndez et al. (2011), empleando el reactivo Trizol (Invitrogen). El ARN purificado fue resuspendido en 30 μl de agua libre de nucleasas y almacenado a -80°C . La concentración de ARN se analizó en un espectrofotómetro (Helios β , Thermo Electron Co.) mediante lectura de Abs260 nm; y su pureza se determinó de acuerdo con su relación Abs260/280 nm, para todas las muestras esta relación fue entre 1.8 y 2.0 (Sambrook & Russell 2001). La integridad del ARN total se confir-

Tabla I. ¹Suministra por kilogramo de dieta: vitamina A, 4800 IU; vitamina D3, 800 IU; vitamina E, 4.8 IU; vitamina K3, 1.6 mg; riboflavina, 4 mg; D-ácido pantoténico, 7.2 mg; niacina, 16 mg; vitamina B12, 12.8 μg ; Zn, 64 mg; Fe, 64 mg; Cu, 4 mg; Mn, 4 mg; I, 0.36 mg; y Se, 0.13 mg. ²DIE= Digestibilidad ileal estandarizada (¹Supplies per kilogram of diet: vitamin A, 4800 IU; vitamin D3, 800 IU; vitamin E, 4.8 IU; vitamin K3, 1.6 mg; riboflavin, 4 mg; Pantothenic D-acid, 7.2 mg; niacin, 16 mg; vitamin B12, 12.8 g; Zn, 64 mg; Faith, 64 mg; Cu, 4 mg; Mn, 4 mg; I, 0.36 mg; and Se, 0.13 mg. 2DIE-Standardized ileal digestibility).

Ingrediente	%
Trigo	69.0
Pasta de soya, 47%	27.7
L-Lisina.HCl	0.35
L-Treonina	0.1
DL-Metionina	0.05
Carbonato de calcio	1.3
Fosfato dicálcico	0.9
Sal yodatada	0.25
Premezcla de vitaminas y minerales ¹	0.3
Contenido calculado	
EM, Mcal/kg	3.2
PC, %	23.6
DIE ² Lys %	1.23
DIE Thr, %	0.77
DIE Met, %	0.35
Fosforo digestible, %	0.41
Calcio digestible, %	0.90

mó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2% (Sambrook & Russell 2001).

Aproximadamente 2 µg de ARN total fue tratado con 0.1 U de DNAsa (1 U/µl; Invitrogen), y se empleó para realizar una reacción de retrotranscripción con hexaprimers de acuerdo a lo descrito por García-Villalobos et al. (2012). Se cuantificó la concentración del ADN complementario (ADNc) en un espectrofotómetro y éste se diluyó a 50 ng/µl.

ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVO

De acuerdo con las secuencias publicadas en el GenBank se diseñaron cebadores específicos para de los ARN mensajeros (ARNm) de las enzimas ASS y SSAT, así como para ARN ribosomal 18S, éste último se empleó como control interno. Los cebadores para ASS fueron sentido 5'CTGGTGTACCGGGTTTCT3' y antisentido 5'TCTGGAGGCGATGATATTC3' (GenBank: AY550053.1, producto de 262 pb); para SSAT el cebador sentido fue 5'AGTGCCAAGGAGCATCTAA3' y el antisentido 5'CCTCTGCTGCCATTTTTC3' (GenBank: NM_214358.1, producto de 338 pb); y para ARN ribosomal 18S el cebador sentido fue 5'GGCCTCACTAAACCATCCAA3' y el antisentido 5'TAGAGGGACAAGTGGCGTTC3' (GenBank: AY265350, producto de 295 pb). Las condiciones de amplificación para cada ARNm se estandarizaron previamente con ensayos de PCR de punto final. La especificidad de los productos amplificados por PCR se analizó mediante su secuenciación realizada por la empresa Genewiz (NJ, Estados Unidos). Los productos secuenciados tuvieron 100% de homología con el ARNm de AAS, SSAT y ARN ribosomal 18S, de acuerdo con sus secuencias reportadas en el GenBank.

La expresión de AAS y SSAT se analizó mediante PCR cuantitativo (qPCR) con el kit comercial Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific). Las reacciones de 25 µl se componían de 12.5 µl de SYBR Green Supermix, 75 ng de cDNA, 0.5 µM de cada cebador específico y c.b.p. 25 µl de agua libre de nucleasas. Las reacciones de qPCR se realizaron en el equipo Cromo 4 (Bio Rad) adaptado a un termociclador ADN Engine, con el software MJ Opticom Monitor, versión 3.1 (Bio-Rad). El equipo fue calibrado con una curva estándar realizada de ARN ribosomal 18S clonado en vector TOPO 4.0 (Invitrogen) a una concentración conocida con cuatro diluciones seriadas 1:100. Se analizó la curva de desnaturalización de cada muestra y producto amplificado para asegurar que la especificidad de los mismos. El programa de amplificación fue: etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante 1 minuto; 40 ciclos de amplificación (desnaturalización: 30 seg/95 °C; alineación: 15 seg/56 °C; extensión 30 seg/72 °C); y una curva de desnaturalización (60 – 90 °C). Se midió la fluorescencia al final de cada ciclo y cada 0.5 °C durante la curva de desnaturalización. Cada muestra fue analizada por duplicado y se emplearon testigos negativos sin ADN, sin cebadores y sin SYBR

Mix. La eficiencia de todas las reacciones analizadas fue de 90 % (±5 %). La abundancia relativa de cada ARNm fue ajustada con la abundancia del ARN ribosomal 18S de la misma muestra (relación ARNm específico:ARN ribosomal 18S).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó análisis de varianza (ANOVA) de los resultados con auxilio del paquete estadístico SAS 9.1 (SAS Institute). Se construyeron los siguientes contrastes ortogonales para evaluar el efecto del destete en la expresión de cada enzima en cada segmento intestinal: C1, día 0 vs día 3; C2, día 0 vs día 7; C3, día 0 vs día 14. Además, se comparó la expresión promedio de cada enzima entre los tres segmentos del intestino delgado mediante prueba de Tukey. Las probabilidades de $P \leq 0.05$ y $0.05 < P \leq 0.10$ se consideraron como diferencia significativa y tendencia, respectivamente.

RESULTADOS

La expresión relativa del ARNm para ASS y SSAT de los cerdos en el d0, d3, d7 y d14 postdestete se presentan en la **Figura 1**. La expresión relativa de ASS en duodeno se incrementó en el d3 ($P < 0.05$) pero fue menor en los d7 y d14 postdestete ($P < 0.01$) en comparación con el d0. En yeyuno, la expresión de ASS no fue diferente entre la etapa predestete y los d3 y d7 postdestete ($P > 0.10$), pero fue menor en el d14 que la observada en el d0 ($P < 0.05$). En íleon, la expresión relativa de ASS no fue diferente entre la etapa predestete y los días 3, 7 y 14 postdestete ($P > 0.10$). La expresión relativa de SSAT en duodeno y yeyuno no fue diferente entre la etapa predestete y los días 3, 7 y 14 postdestete ($P > 0.10$). En íleon, la expresión de SSAT tendió a incrementarse ($P < 0.10$) en el d3 postdestete, pero no fue diferente en los días 3, 7 y 14 ($P > 0.10$) en comparación con la etapa predestete.

La comparación de la expresión relativa promedio de ambas enzimas entre los tres segmentos del intestino delgado se muestra en la **Figura 2**. La expresión de ASS fue sustancialmente mayor en íleon que en duodeno y yeyuno ($P < 0.001$) pero no fue diferente entre estos dos últimos. Sin embargo, la expresión de SSAT no fue diferente ($P > 0.10$) entre los tres segmentos intestinales.

DISCUSIÓN

Las vellosidades intestinales son muy sensibles al estrés del destete, el cual provoca su acortamiento y la predisposición a entrada de toxinas o microorganismos a través de la barrera intestinal (Boudry et al. 2004; Campbell et al. 2013), afectando la integridad epitelial. La recuperación del epitelio ocurre por la proliferación de células de criptas intestinales, su diferenciación en enterocitos y migración hacia la punta de las vellosi-

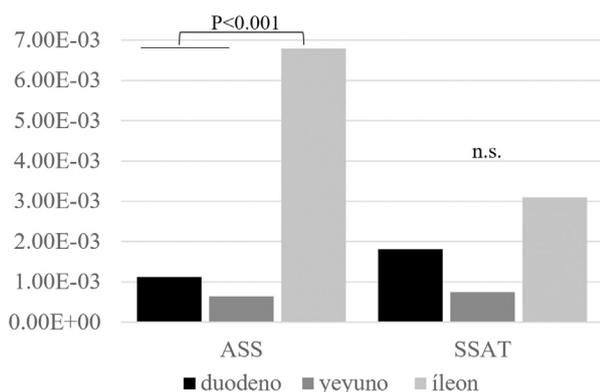


Figura 1. Expresión relativa del ARNm para ASS y SSAT de los cerdos en el d0, d3, d7 y d14 postdestete (Relative expression of mRNA for ASS and SSAT of pigs in post-eastern d0, d3, d7 and d14.).

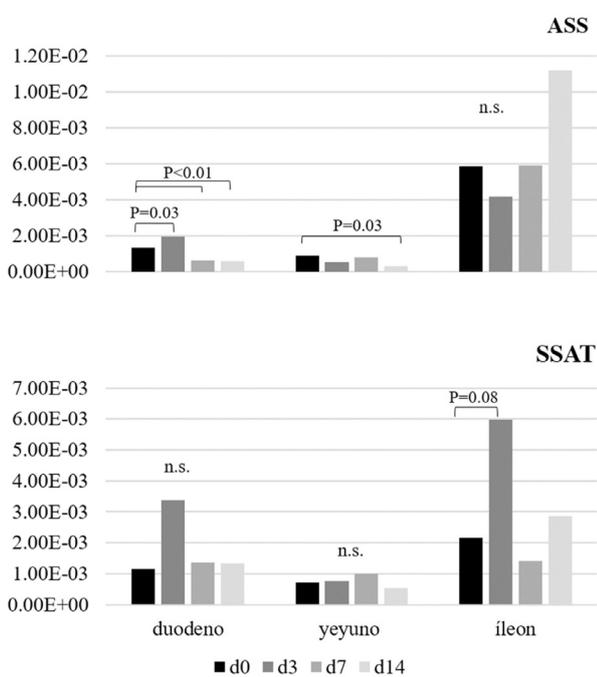


Figura 2. Comparación de la expresión relativa promedio de ambas enzimas entre los tres segmentos del intestino delgado (Comparison of the average relative expression of both enzymes between the three segments of the small intestine).

dades (Yang & Liao 2019). Esta recuperación depende, entre otros factores, de la abundancia y actividad de diversas enzimas relacionadas con la síntesis de poliaminas. La presencia de poliaminas es un factor importante para que ocurra la proliferación de células epiteliales (Igarashi & Kashiwagi 2000; Casero & Pegg 2009; Gao et al. 2013). En este trabajo se evaluó la expresión relativa (abundancia) de ARNm de las enzimas ASS y SSAT en intestino delgado de cerdos en diferentes momentos de la etapa postdestete.

Las poliaminas se sintetizan a partir de ornitina, arginina y metionina (Pegg 2008; Gao et al. 2013). Sin embargo, arginina es un aminoácido limitante durante la

lactancia debido a su baja disponibilidad en leche (Wu et al. 2004; Mou et al. 2019). La enzima ASS cataliza la síntesis de arginina a partir de citrulina; por tanto, esta enzima desempeña un papel importante en la síntesis de poliaminas tanto en lactancia como durante los primeros días postdestete puesto que ayuda a corregir la deficiencia de arginina en leche (Wu et al. 2018). En el presente experimento se observó un incremento sustancial en la abundancia de ASS en duodeno a los 3 d postdestete, seguido de una reducción importante a partir de los 7 d, en comparación con el predestete. Estos resultados coinciden con los publicados anteriormente en intestino de cerdos destetados (Flynn & Wu 1997; Flynn et al. 1999). Incrementos similares en la expresión de ASS en intestino de lechones, seguida de una reducción al día 35 después del destete, fueron publicados por Marini et al. (2017). En conjunto, los resultados de estos estudios podrían indicar un aumento en la síntesis de arginina durante los primeros días postdestete. Además, se ha mencionado que la expresión de ASS es inducible por corticosteroides como dexametasona (Bourgeois et al. 1997). Wu et al. (2000) observaron que durante el destete, el incremento de cortisol en plasma estimula la síntesis de poliaminas a nivel intestinal, lo que explica el incremento en la expresión de ASS que se observó en el presente trabajo al d3 postdestete.

La enzima SSAT es clave para la regulación y metabolismo de poliaminas en intestino delgado, de tal manera que cuando hay acumulación de poliaminas SSAT se encarga de intercambiar espermina por espermidina o de promover su excreción como putrescina hacia el exterior de la célula (Casero & Pegg 2009). Recientemente se han estudiado estas poliaminas por su capacidad para incrementar la proliferación de células de mucosa intestinal, así como para el mantenimiento de la integridad de ésta (Gao et al. 2013; Wang et al. 2015). Por lo anterior, el mantenimiento de la integridad del epitelio intestinal durante el destete demanda una mayor disponibilidad de poliaminas y de las enzimas que participan en su síntesis y metabolismo. En el presente trabajo el destete no modificó la expresión de SSAT en duodeno ni en yeyuno, aunque en íleon se observó una tendencia a incrementar su expresión el d3 postdestete. Al parecer SSAT juega un papel crítico en respuesta a factores como el estrés o la reducción en el consumo de alimento (Spreeuwenberg et al. 2001), y se ha reportado que la elevada concentración de poliaminas incrementa su expresión al promover su transcripción y traducción (Butcher et al. 2007; Pegg 2008; Cassero & Pegg, 2009). Sin embargo, es probable que la concentración de poliaminas no haya sido suficiente para provocar una sobreexpresión de SSAT, como lo reportaron Butcher et al. (2007), quienes en un cultivo de células transfectadas con el gen de SSAT observaron que el incremento en la concentración de poliaminas regula la expresión de su ARNm al inhibir la unión de

una proteína represora a la región codificante del gen de SSAT durante la transcripción.

Al comparar entre secciones de intestino delgado se observó que la mayor expresión de ASS ocurrió en íleon. Este resultado coincide con Farriol et al. (2000), quienes mencionaron que el íleon y colon son los sitios del tracto gastrointestinal en donde se observa una mayor concentración de poliaminas. Con este antecedente, se sugiere que en estas regiones existe mayor demanda de ambas enzimas, para la síntesis de arginina y poliaminas, lo que contribuiría a mantener la viabilidad y proliferación de las células epiteliales de intestino (Igarashi & Kashiwagi, 2000).

CONCLUSIÓN

Los resultados de este trabajo indican que el estrés agudo del destete puede modificar la expresión relativa de las enzimas ASS y SSAT al incrementarse éstas en los primeros tres días postdestete.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad Autónoma de Baja California por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo de investigación; y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT-México) por la beca otorgada a Néstor Arce para sus estudios de posgrado.

BIBLIOGRAFÍA

- Boudry, G, Péron, V, Huërou-Luron, IL, Lallés, JP, & Seve, B 2004, 'Weaning induces both transient and long-lasting modifications of absorptive, secretory, and barrier properties of piglet intestine', *Journal of Nutrition*, vol. 134, pp. 2256-2262. DOI: 10.1093/jn/134.9.2256
- Bourgeois, P, Harlin, JC, Renouf, S, Goutal, I, Fairand, A, Husson, A 1997, 'Regulation of argininosuccinate synthetase mRNA level in rat foetal hepatocytes' *European Journal of Biochemistry*, Vol. 249, no. 3, pp. 669-674. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00669.x
- Butcher, NJ, Broadhurst, GM, & Minchin, RF 2007, 'Polyamine-dependent regulation of Spermidine-Spermine N1-Acetyl transferase mRNA translation', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 39, pp. 28530-28539. DOI: 10.1074/jbc.M701265200
- Campbell, JM, Crenshaw, JD, & Polo, J 2013, 'The biological stress of early weaned piglets', *Journal of Animal Science and Biotechnology*, vol. 4, no. 19, pp. 1-4. DOI: 10.1186/2049-1891-4-19
- Casero, RA, & Pegg, AE 2009, 'Polyamine catabolism and disease (Review)', *Biochemical Journal*, vol. 421, pp. 323-338. DOI: 10.1042/BJ20090598
- Chen, Y, Li, D, Dai, Z, Piao, X, Wu, Z, Wang, B, Zhu, Y, & Zeng, Z 2014, 'L-Methionine supplementation maintains the integrity and barrier function of the small-intestinal mucosa in post-weaning piglets', *Amino Acids*, vol. 46, pp. 1131-1142. DOI: 10.1007/s00726-014-1675-5
- Farriol, M, Segovia-Silvestre, T, Venereo, Y, & Orta, X 2000, 'Polyamines in the gastrointestinal tract', *Nutrición Hospitalaria*, vol. 15, no. 3, pp. 85-91. PMID: 10920678
- Flynn, NE, & Wu, G 1997, 'Glucocorticoids play an important role in mediating the enhanced metabolism of arginine and glutamine in enterocytes of postweaning pigs', *The Journal of nutrition*, vol. 127, no. 5, pp. 732-737. DOI: 10.1093/jn/127.5.732
- Flynn, NE, Meininger, CJ, Kelly, K, Ing, NH, Morris Jr, SM, & Wu, G 1999, 'Glucocorticoids mediate the enhanced expression of intestinal type II arginase and argininosuccinate lyase in postweaning pigs', *The Journal of nutrition*, vol. 129, no. 4, pp. 799-803. DOI: 10.1093/jn/129.4.799
- Gao, JH, Guo, LJ, Huang, ZY, Rao, JN, & Tang, CW 2013, 'Roles of cellular polyamines in mucosal healing in the gastrointestinal tract', *Journal of Physiology and Pharmacology*, vol. 64, no. 6, pp. 681-93. PMID: 24388882
- García-Villalobos, H, Morales-Trejo, A, Araiza-Piña, BA, Htoo, JK, & Cervantes-Ramírez, M 2012, 'Effects of dietary protein and amino acid levels on the expression of selected cationic amino acid transporters and serum amino acid concentration in growing pigs', *Archives of Animal Nutrition*, vol. 66, no. 4, pp. 257-270. DOI: 10.1080/1745039x.2012.697351
- Igarashi, K, & Kashiwagi, K 2000, 'Polyamines: mysterious modulators of cellular functions', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 271, no. 3, pp. 559-64. DOI: 10.1006/bbrc.2000.2601
- Marini, JC, Agarwal, U, Robinson, JL, Yuan, Y, Didelija, IC, Stoll, B & Burrin, DG 2017, 'The intestinal-renal axis for arginine synthesis is present and functional in the neonatal pig', *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, vol. 313, no. 2, pp. E233-E242. DOI: 10.1152/ajpendo.00055.2017
- Méndez, V, Avelar, E, Morales, A, Cervantes, M, Araiza, A, & González, D 2011, 'A rapid protocol for purification of total RNA for tissues collected from pigs at a slaughterhouse', *Genetics and Molecular Research*, vol. 10, no. 4, pp. 3251-3255. DOI: 10.4238/2011.December.22.3
- Moesser, AJ, Pohl, CS, & Rajput, M 2017, 'Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs', *Animal Nutrition*, vol. 3, no. 4, pp. 313-321. DOI: 10.1016/j.aninu.2017.06.003
- Mou, Q, Yang, HS, Yin, YL, & Huang, PF 2019, 'Amino Acids Influencing Intestinal Development and Health of the Piglets', *Animals (Basel)*, vol. 9, no. 6, pp. 302. DOI: 10.3390/ani9060302
- NOM-062-ZOO-1999 2001, 'Norma Oficial Mexicana. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio', Ochoa MLI ed. *Diario Oficial de la Federación*, México (DF), México.
- Pegg, AE 2008, 'Spermidine/spermine-N1-acetyltransferase: a key metabolic regulator', *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, vol. 294, pp. E995-E1010. DOI: 10.1152/ajpendo.90217.2008
- Ray, RM, Viar, MJ, Yuan, Q, & Johnson, LR 2000, 'Polyamine depletion delays apoptosis of rat intestinal epithelial cells', *American Journal of Physiology Cell Physiology*, vol. 278, no. 3, pp. C480-C489. DOI: 10.1152/ajpcell.2000.278.3.C480
- Sambrook, J, & Russell, DW 2001, 'Molecular cloning: A laboratory manual', 3era. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 2344 p.
- Spreuwwenberg, MAM, Verdonk, JMAJ, Gaskins, HR, & Verstegen, MWA 2001, 'Small intestine epithelial barrier function is compromised in pigs with low feed intake at weaning', *The Journal of Nutrition*, vol. 131, no. 5, pp. 1520-1527. DOI: 10.1093/jn/131.5.1520
- Wang, J, Li, GR, Tan, BE, Xiong, X, Kong, XF, Xiao, DF, Xu, LW, Wu, MM, Huang, B, Kim, SW, & Yin, YL 2015, 'Oral administration of putrescine and proline during the suckling period improves epithelial restitution after early weaning in piglets', *Journal of Animal Science*, vol. 93, no. 4, pp.1679-88. DOI: 10.2527/jas.2014-8230
- Wang, J, Zeng, L, Tan, B, Li, G, Huang, B, Xiong, X, Li, F, Kong, X, Liu, G, & Li, Y 2016, 'Developmental changes in intercellular junctions and Kv channels in the intestine of piglets during the suckling and post-weaning

- periods', *Journal of Animal Science and Biotechnology* vol. 7, no. 4, pp. 1-10. DOI: 10.1186/s40104-016-0063-2
- Wu, G, Bazer, FW, Davis TA, Kim, SW, Li P, Rhoads, JM, Carey, SM, Smith, SB, Spencer, TE, & Yin, Y 2009, 'Arginine metabolism and nutrition in growth, health and disease', *Amino Acids*, vol. 37, no. 1, pp.153-168. DOI: 10.1007/s00726-008-0210-y
- Wu, G, Bazer, FW, Johnson, GA, & Hou, Y 2018, 'Board-Invited Review: Arginine nutrition and metabolism in growing, gestating, and lactating swine', *Journal of Animal Science*, vol. 96, no. 12, pp. 5035-5051. DOI: 10.1093/jas/sky377
- Wu, G, Flynn, NE, Knabe, DA, & Jaeger, LA 2000, 'A cortisol surge mediates the enhanced polyamine synthesis in porcine enterocytes during weaning', *American Journal of Physiology Regulatory Integrative Comparative Physiology*, vol. 279, pp. R554-R559. DOI: 10.1152/ajpregu.2000.279.2.R554
- Wu, G, Knabe, DA, & Kim, SW 2004, 'Arginine nutrition in neonatal pigs', *The Journal of Nutrition*. Vol. 134, no. 10, pp. 2783S-2790S. DOI: 10.1093/jn/134.10.2783S
- Yang, Z, & Liao SF 2019, 'Physiological Effects of Dietary Amino Acids on Gut Health and Functions of Swine Front', , vol. 6, pp. 169. DOI: 10.3389/fvets.2019.00169