

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
BIBLIOTECA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

**“DESARROLLO DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LECHONES
ALIMENTADOS
CON DIETAS A BASE DE SUBPRODUCTOS LÁCTEOS”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA
PMVZ YOBANA JUÁREZ GÓMEZ**



**ASESORES
M en C. ARACELI AGUILERA BARREYRO
Dra. TÉRCIA C. REIS DE SOUZA**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QRO; SEPTIEMBRE DE 2004

No. ADO. CWT00026

No. TTULO 15

CLASIFI 036.4

Jaid

ÍNDICE GENERAL

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERÉTARO
BIBLIOTECA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Página

Índice general -----	I
Dedicatoria -----	III
Agradecimientos -----	IV
Índice de cuadros -----	V
Índice de figura y gráficas-----	VI
Resumen -----	VII
1. Introducción -----	1
2. Antecedentes -----	2
2.1. Suero de Leche -----	2
2.2. Organos digestivos y secreciones enzimaticas -----	3
2.2.1. Desarrollo de enzimas pancreáticas e intestinales -----	5
2.2.2. Efecto del destete sobre el desarrollo enzimatico -----	8
3. Hipótesis -----	10
4. Objetivos -----	11
5. Material y Métodos -----	12
6. Resultados y Discusión -----	16
6.1 Peso de órganos -----	16

6.1.1 Efecto de la fuente de lactosa -----	16
6.1.2 Efecto del tiempo posdestete -----	17
6.2 pH de los contenidos digestivos -----	23
6.2.1 Efecto de la fuente de lactosa -----	23
6.2.2 Efecto del tiempo posdestete -----	23
6.3 Actividad enzimática pancreática e intestinal -----	24
6.3.1 Efecto de la fuente de lactosa -----	24
6.3.2 Efecto del tiempo posdestete -----	24
7. Conclusiones -----	30
8. Referencias Bibliográficas -----	31
9. Anexos -----	37

DEDICATORIA

A Dios:

Por darme vida, salud y amor, para poder cumplir una de mis principales metas. Gracias por ayudarme a salir adelante en los momentos más difíciles de mi vida.

A mis padres:

Agapita Gómez Aguirre y Fernando Juárez Pérez, quienes me han amado intensamente, apoyado en todas mis decisiones y guiado en el transcurso de mi vida. Gracias por darme todo lo que soy.

A mis hermanos:

Magda, Rafa y Yane, quienes han sido un gran ejemplo de superación y apoyo en mi lucha constante de ser un buen profesionalista. Gracias por ser los mejores hermanos que Dios me ha dado y por haberme llenado de consejos cuando más los he necesitado.

A mis asesoras:

MC. Araceli Aguilera Barreyro y Dra. Tercia Cesaria Reis de Souza, gracias por todo el gran apoyo que he recibido de ustedes y principalmente por su gran amistad, la cual valoro enormemente.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro, quién me ha forjado como un profesional crítico y responsable, útil para la sociedad.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través del sistema de Investigación Miguel Hidalgo (SIHGO) por el apoyo financiero para la realización del proyecto del cual derivó esta tesis.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) campus Ajuchitlán por brindarme los espacios necesarios para la realización de este trabajo de tesis.

A los honorables miembros del jurado: Dra. Ma. Guadalupe Bernal Santos, Dr. Gerardo Mariscal Landin y QFB. Juan Guillermo Cervantes Huerta, por fungir como sinodales en mi examen profesional.

A mis maestros; MVZ Angel Alemán, MC María de Jesús Guerrero, MVZ Irma Sánchez, MVZ Salvador Martínez, MVZ Octavio Lugo y MVZ Pilar Puga ya que de todos y cada uno de ellos he aprendido algo importante para mi vida profesional.

A mis amigos; Atalí Rangel, Tanía Jiménez, Erick Luna, José Luis Vera, Oscar Hugo Hernández, Edwin Esparza, Antonio Rosas, Emilio Díaz, Diego Montes y Edgar Becerra, los cuales siempre me han brindado su amistad y compañía.

ÍNDICE DE CUADROS

Página

<i>Cuadro 1.</i> Composición centesimal y química de las dietas experimentales -	14
<i>Cuadro 2.</i> Efecto de la fuente de lactosa sobre el peso de los órganos digestivos de lechones destetados -----	16
<i>Cuadro 3.</i> Efecto de la fuente de lactosa sobre la longitud intestinal y el pH gástrico e intestinal de lechones destetados -----	17
<i>Cuadro 4.</i> Efecto de los días posdestete sobre el peso de los órganos digestivos en lechones destetados -----	18
<i>Cuadro 5.</i> Efecto de los días posdestete sobre la longitud intestinal y el pH estomacal e intestinal en lechones destetados -----	18
<i>Cuadro 6.</i> Efecto de la fuente de lactosa sobre la actividad total de algunas enzimas digestivas en lechones destetados -----	24
<i>Cuadro 7.</i> Efecto de los días posdestete sobre la actividad total de amilasa y lipasa pancreática y lactasa intestinal de lechones destetados -----	25

ÍNDICE DE FIGURA Y GRAFICAS

	Página
<i>Figura 1.</i> Esquema experimental -----	15
<i>Gráfica 1.</i> Peso relativo (g/kg PV) del páncreas, hígado y estómago de lechones en función de la edad posdestete -----	20
<i>Gráfica 2.</i> Peso relativo (g/kg PV y m/kg PV) del intestino delgado de lechones en función de la edad posdestete -----	21
<i>Gráfica 3.</i> Peso relativo (g/kg PV y m/kg PV) del intestino grueso de lechones en función de la edad posdestete-----	22
<i>Gráfica 4.</i> Comportamiento de la actividad total de lactasa vs días posdestete en lechones -----	26
<i>Gráfica 5.</i> Comportamiento de la actividad total de amilasa vs días posdestete en lechones -----	27
<i>Gráfica 6.</i> Comportamiento de la actividad total de lipasa vs días posdestete en lechones -----	29

RESUMEN

Desarrollo de la actividad enzimática en lechones alimentados con dietas a base de subproductos lácteos. *PMVZ Yobana Juárez Gómez. Asesoras: M en C. Araceli Aguilera Barreyro y Dra. Tércia C. Reis de Souza.* Con el objetivo de evaluar el efecto de la fuente de lactosa (suero de leche (SL) y lactosa cristalina (LC)) en dietas de iniciación sobre el desarrollo de los órganos digestivos y la actividad enzimática del páncreas y de la mucosa intestinal, se utilizaron un total de 66 lechones, seis se sacrificaron al día del destete (día cero), los demás 60 lechones se distribuyeron entre los dos tratamientos experimentales (30 lechones/tratamiento) y se alojaron de acuerdo a su peso inicial en seis corrales de destete (5 lechones/corral). Las dietas se formularon para 2 fases productivas (fase 1 del destete hasta los 14 días y fase 2 de los 15 a los 28 días posdestete (dpd)). En los días 2, 7, 14, 21 y 28 posdestete se seleccionó al azar un lechón de cada corral para ser sacrificado lo que proporciono seis unidades experimentales/día de sacrificio/tratamiento). Se adormecieron con CO₂ y se degollaron. Posteriormente se procedió a la apertura de la cavidad abdominal para la colecta de los órganos, los cuales fueron desecados, pesados y en su caso medidos longitudinalmente (intestino delgado y grueso). El peso de los órganos se expresó en gramos (peso absoluto) y en relación con el peso vivo (peso relativo). En el contenido del estómago y del intestino delgado se midió el pH mediante potenciometría. El páncreas se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido con el objeto de parar cualquier actividad enzimática y se midió posteriormente la actividad de las enzimas pancreáticas: amilasa y lipasa. El intestino delgado fue separado y desdoblado de sus asas intestinales con el fin de realizar un raspado de la mucosa. Posteriormente el raspado se introdujo en nitrógeno líquido, para posteriormente cuantificar la actividad de la lactasa. Los resultados se analizaron estadísticamente empleando el paquete estadístico SAS de acuerdo a un diseño factorial 2 x 6, siendo el factor uno la fuente de lactosa de la dieta (suero de leche o lactosa cristalina) y el factor dos los días posdestete (0, 2, 7, 14, 21 y 28); con 6 réplicas por dieta experimental. Con respecto al peso absoluto el estómago tuvo diferencias ($P > 0.05$) con respecto a la fuente de lactosa, así como una mayor longitud del ID ($P < 0.05$) (de 8.4 a 8.6 m) con respecto a la lactosa del SL. A los dos días posdestete todos los órganos (peso y/o longitud), así como el peso vivo mostraron una depresión, sin embargo, en todos los casos se presentó un despunte hasta alcanzar un máximo desarrollo ($P < 0.05$) a los 28 días. La fuente de lactosa no afectó el pH del ID ($P > 0.05$), pero si el del estómago ($P < 0.01$) (3.12 y 3.37 para lactosa del SL y LC respectivamente). En relación al pH del contenido del estómago y del ID se mantuvo constante hasta alcanzar valores más ácidos ($P < 0.05$) a los 28 días, el descenso del pH se produjo durante la fase 2 de alimentación de los lechones, donde se reemplazó plasma porcino por proteína vegetal. La actividad enzimática total (unidades internacionales por gramo de tejido) de la lactasa intestinal, así como de la amilasa y lipasa pancreática no tuvieron diferencias significativas ($P > 0.005$) con respecto a las dietas experimentales en base a subproductos lácteos (suero de leche y lactosa cristalina). La lactasa intestinal presenta su máxima actividad el día del destete (116 UI/g) seguido de un decremento los días 2 y 7 posdestete (85 y 40 UI/g respectivamente) ($P < 0.050$). A los 14 días se incrementó la actividad (91 UI/g) ($P < 0.05$), por el cambio de dieta en la fase 2 la actividad mostró un decremento a los 21 y 28 días posdestete (22 y 27 UI/g) ($P < 0.05$) debido a una disminución del 50% en la incorporación de lactosa en la dieta. El

comportamiento en la actividad de la lactosa con respecto a la edad posdestete presentó una respuesta lineal ($R^2 = 55 \%$) ($P < 0.05$). La amilasa pancreática en el día del destete presentó una actividad enzimática total de 133×10^3 UI/g, observándose una disminución en los días 2 y 7 posdestete (65 y 75×10^3 UI/g, respectivamente) ($P < 0.05$). En los días 14 y 21 días posdestete (127 y 127×10^3 UI/g) empezó a incrementarse la actividad de la amilasa. A los 28 días posdestete (173×10^3 UI/g) los lechones alcanzaron su máxima actividad enzimática ($P < 0.05$). El comportamiento en la actividad de la amilasa pancreática con respecto a la edad posdestete presentó una respuesta cuadrática ($R^2 = 42 \%$) ($P < 0.05$). Para la lipasa pancreática en el día del destete se observó una actividad de 1527 UI/g. En el día posdestete se da el pico mas alto de actividad de la enzima registrando una cantidad de 2175 UI/g ($P < 0.05$). A los 7 días posdestete la actividad de la lipasa (1065 UI/g) disminuye significativamente ($P < 0.05$), manteniéndose estable durante los 14, 21 y 28 días (1023, 1069, y 1027 UI/g respectivamente). El comportamiento en la actividad de la lipasa pancreática con respecto a la edad posdestete presentó una respuesta cuadrática ($R^2 = 52 \%$) ($P < 0.05$). El tipo de lactosa no afectó la actividad de las enzimas digestivas. El desarrollo de la lactasa y lipasa disminuyeron lineal y cuadráticamente respectivamente, demostrándose que su actividad está estrechamente relacionada a la concentración del sustrato. La actividad de la amilasa se incrementó cuadráticamente con respecto a los dpd, siendo también proporcional a la concentración del sustrato.

1. INTRODUCCIÓN

El destete de los lechones realizado a una edad temprana es una práctica de gran importancia en el desarrollo de la porcicultura. La alimentación que se brinda en esta etapa es uno de los aspectos más importantes en las empresas; por lo tanto el programa de alimentación que se desarrolle, tendrá un efecto significativo sobre los rendimientos futuros de los cerdos.

Los lechones destetados a edad temprana usualmente pierden peso corporal debido al consumo de alimento reducido, como también al cambio de la leche altamente digestible de la cerda a un alimento sólido. Los nutriólogos continúan estudiando para identificar problemas biológicos tales como desarrollo morfológico intestinal y la actividad de las enzimas gastrointestinales. Otros han evaluado alimentos e ingredientes para obtener los nutrientes para el lechón destetado.

El análisis de diferentes alimentos, adquiere una gran importancia para la formulación de dietas, con el fin de cumplir con las necesidades nutritivas en las diferentes etapas de crecimiento del cerdo.

Los ingredientes que conforman las dietas de iniciación deben ser de excelente calidad nutricional; como por ejemplo los subproductos lácteos, los cuales son fuente de proteína de alto valor biológico y son simultáneamente fuente de carbohidratos altamente digestibles (lactosa) (Tokach et al., 1989; Nessmith et al., 1997b). El suero de leche contiene gran cantidad de nutrientes para el crecimiento, siendo así un ingrediente alimenticio atractivo para la utilización en dietas para lechones destetados (Roppa, 2002).

Por todo lo anterior este trabajo tuvo como objetivo estudiar en lechones destetados el desarrollo de la actividad de algunas de sus enzimas digestivas durante en las primeras cinco semanas posdestete, cuando son alimentados con raciones a base de subproductos lácteos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Suero de leche

El suero de leche es el líquido resultante de la coagulación de la leche durante la elaboración del queso. Se obtiene tras la separación de las proteínas, llamadas caseínas, y de la grasa. Ese líquido constituye aproximadamente el 90% del volumen de la leche y contiene la mayor parte de sus compuestos que son solubles en agua. La composición química del suero varía dependiendo de las características del lácteo. Su pH oscila entre 5-6. El agua es el componente más abundante en el suero, constituye el 93% o más de este. Le sigue en cantidad el azúcar, la cual recibe el nombre de lactosa. Este compuesto se encuentra en una proporción cercana al 5%. Un poco menos del 1% del suero lo constituye compuestos nitrogenados, de las cuales la mitad son proteínas, de muy alto valor nutritivo, que se clasifican en albúminas, globulinas y una fracción llamada proteasa-peptona (Pottí, 2002). Otros compuestos del suero son los minerales que se encuentran en concentraciones de alrededor de 0.7%. Se observa en mayor cantidad el sodio, el potasio, el magnesio, el cloruro y el fosfato (2). El suero contiene además las vitaminas hidrosolubles de la leche, de las cuales la más importante es la riboflavina o vitamina B. El suero de leche contiene 72% de lactosa, 8% cenizas y 3% sales y 12% de proteína cruda (NRC, 1998).

La lactosa es el componente principal del suero de leche y la que le confiere sus propiedades más importantes. Dado que el azúcar de leche como disacárido es fácilmente asimilable por el organismo, la lactosa constituye una buena fuente de energía. Esta no se disocia por completo en la parte superior del tracto gastrointestinal, sino que permanece en el intestino delgado y el colon en forma de azúcar de leche. Esta circunstancia supone una ventaja especial, dado que las bacterias de la flora intestinal transforman la lactosa en ácido láctico, muy beneficioso para el organismo en varios aspectos (Roppa, 2002).

2.2. Órganos digestivos y secreciones enzimáticas

Desde el nacimiento del lechón el aparato digestivo tiene un carácter prioritario en su desarrollo en relación con otros órganos. Sin embargo, después de 10 días de vida se observa un aumento muy marcado del volumen, de la longitud y del peso de los principales órganos digestivos. En menos de 2 semanas, cada uno de los órganos pasan por transformaciones importantes en el proceso digestivo; el páncreas aumenta 12 veces y la mucosa gástrica 15 veces su peso del nacimiento a las 6 semanas de vida, mientras que el lechón aumenta en alrededor de 7.5 veces su peso en el mismo intervalo (Lindemann et al., 1986)

El páncreas es un órgano glandular de secreción interna y externa situado en el abdomen, detrás del estómago. Comprende dos órganos muy interrelacionados: páncreas endocrino, que vierte las hormonas en el torrente sanguíneo y el páncreas exócrino, que vierte sus secreciones (jugo pancreático) en el duodeno durante la digestión, a través de conductos (Cunningham, 1999).

La secreción pancreática es un líquido acuoso no viscoso, que tiene un contenido de agua semejante al de la saliva y que lleva cierta cantidad de proteínas y otros compuestos orgánicos e inorgánicos. El pH es alcalino, de 7.5 a 8.0 o mayor. En ella se encuentran numerosas enzimas (tripsina, quimotripsina, elastasa, carboxipeptidasa A y B, amilasa y lipasa). La tripsina, quimotripsina y la elastasa son endopeptidasas, las cuales atacan a las proteínas y polipéptidos liberados del estómago para producir polipéptidos, péptidos o ambos. La tripsina es específica para enlaces peptídicos de aminoácidos básicos y la quimotripsina para los enlaces peptídicos contenidos en residuos aminoacídicos sin carga, como los aminoácidos aromáticos. La elastasa tiene una especificidad más bien amplia para atacar enlaces próximos a residuos aminoacídicos pequeños, como la glicina, alanina y serina (Murria, 1997).

Las carboxipeptidasas A y B son exopeptidasas que realizan el siguiente ataque a los polipéptidos producidos por la acción de las endopeptidasas, que atacan al enlace peptídico carboxilo terminal, con liberación de aminoácidos simples (Murria, 1997).

La amilasa actúa sobre el almidón y el glucógeno. Su acción es análoga a la de la amilasa salival, hidrolizando al almidón y el glucógeno hasta maltosa, maltotriosa y una mezcla de oligosacáridos ramificados, no ramificados y glucosa (Murria, 1997).

La lipasa ataca el enlace éster primario de los triacilglicerolos: La lipasa pancreática actúa en la interfase aceite-agua de las gotitas finamente emulsificadas de los lípidos, formadas por la agitación mecánica en el intestino en presencia de los productos de la actividad de la lipasa lingual (Murria, 1997).

En el intestino delgado, etapa posterior al destete se observa un incremento significativo en su crecimiento; debido a que la capacidad del cerdo para digerir y absorber depende a su vez de la capacidad fisiológica de este órgano (Irma, 1998); el cual absorbe los nutrimentos del alimento a través de numerosas vellosidades microscópicas que cubren su superficie apical. Este borde es rico en enzimas y está recubierto en su lado luminal por una capa abundante en azúcares neutros y aminoazúcares, llamados glucocáliz (Ganong, 1994). Al inicio de la vida del cerdo, estas vellosidades tienen forma de dedos alargados y conforme avanza la edad éstas se van engrosando, presentando al final del día 49 de edad una apariencia similar a un borde de cepillo. La morfología de estas vellosidades cambia por efecto de la edad y el destete (Campabadal y Navarro, 1996). El destete temprano además de provocar alteraciones en la fisiología del aparato digestivo, origina cambios dramáticos en la estructura de la mucosa intestinal reduciéndose la altura de las vellosidades intestinales, lo que provoca una disminución en la capacidad para digerir y absorber nutrientes. Distintos estudios han señalado que el aminoácido no esencial L-glutamina es la principal fuente de energía para los enterocitos y otras células de rápida división por lo que la adición de este aminoácido en dietas a base de suero de leche líquida mejoran la estructura de la mucosa intestinal aminorando las alteraciones que sufre este órgano pocos días después del destete (De la Cruz et al., 1998; Sánchez et al., 1998; De la Cruz, 1999).

2.2.1. Desarrollo de enzimas pancreáticas e intestinales

La mayoría de las enzimas digestivas ya están presentes en el páncreas del feto porcino, pero en un nivel muy bajo, ellas pasan un proceso de maduración con la edad, particularmente importante después del destete (Weston et al., 1987).

Durante la lactancia, el sistema enzimático del lechón está adaptado para digerir los nutrientes de la leche, y la absorción de proteínas lácteas, lactosa y lípidos de cadena corta (Roppa, 2002). Sin embargo, en el destete el lechón sufre una disminución en su actividad enzimática, debido a la caída de consumo de alimento. Por lo tanto los animales necesitan un periodo de tiempo para madurar el proceso de producción de sus propias enzimas, debido a que su sistema digestivo no produce cantidades apreciables de lipasa, amilasa y otras enzimas que degradan los nutrientes contenidos en materias primas (Roppa, 2002). En los tres primeros días posdestete, las enzimas secretadas por el tejido pancreático y epitelio intestinal no son suficientes para digerir la proteína, ni la concentración de nutrientes (Makkink et al., 1994a). En el lechón destetado, la principal actividad hidrolítica para digerir los carbohidratos, proteínas y lípidos es proporcionada por el páncreas.

Corring et al. (1978) estudiaron el desarrollo de las enzimas pancreáticas desde el nacimiento y hasta la 8ª semana de vida de los lechones. Estos investigadores evaluaron dos fases distintas en la evolución de la tripsina y quimotripsina. La primera cubre del nacimiento y hasta la 3ª ó 4ª semana, donde se observa que la actividad de la quimotripsina aumenta 3 y la tripsina 2 veces. La segunda fase comprende de la cuarta a la octava semana (56 días), cuando la actividad de ambas enzimas aumenta considerablemente. Estos resultados fueron confirmados por Makkink et al. (1994b), quienes también observaron una correlación positiva entre el consumo de la ración y la actividad de las proteasas en el yeyuno a los 6 días posdestete. Esto significa que la ingestión de alimentos puede ser el principal factor que modula la síntesis y secreción de las enzimas. Lindemann et al. (1986) y Jensen et al. (1997) observaron un efecto negativo del destete ya que ocasiona una disminución en la actividad total y específica de estas enzimas en la primera semana posdestete. Sin embargo, a pesar de esa disminución en la síntesis y actividad enzimática en el momento del destete, el desarrollo digestivo no se compromete ni a corto (6 días posparto) ni a largo plazo (Séve, 1986 y

Makkink et al., 1994 a).

Lindemann et al. (1986) observaron un aumento de la actividad de la amilasa desde el nacimiento y hasta la 4ª semana, pero una disminución al momento del destete. Posterior a éste, la actividad de la amilasa aumenta probablemente por la necesidad de digerir el almidón de la dieta. La lipasa también disminuye, quizá por el bajo contenido de grasa de la dieta posdestete en relación a la leche de la cerda (Lindemann et al., 1986), y la baja ingesta de alimento usualmente observada en el destete temprano. Sin embargo, en el estudio de Jensen et al. (1997), de acuerdo al análisis de ácidos grasos de la leche de la cerda y de la dieta posdestete, la concentración de enzimas no presentó mayores diferencias, por lo que se concluye que la composición de ácidos grasos no está relacionado con la disminución de la actividad de lipasa. El estudio de Pierizynowski et al. (1993) observó que la secreción de lipasa baja antes del destete y aumenta en la fase posprandial, lo que sugiere que el bajo nivel de lipasa encontrada en el tejido pancreático después del destete es debido a la depresión de reservas de la enzima causado por una alta tasa de secreción, más que una baja en la síntesis (Efird et al., 1982).

En los primeros días de vida del lechón la digestión de las proteínas de la leche es iniciada por la acción de la quimosina o renina capaz de coagular la caseína teniendo un pH óptimo de 2 a 4. La actividad de esta enzima disminuye rápidamente durante los 10 primeros días de vida del lechón.

En el momento del destete ocurre una profunda modificación en el proceso de digestión de la caseína, de los lípidos emulsificados y de la lactosa provenientes de la leche materna, es por eso que es importante y necesario que en ésta etapa las enzimas digestivas deban estar aptas para digerir proteínas de origen vegetal, gránulos de almidón, e estructuras celulares, etc. (Reis de Souza y Mariscal, 1997).

El incremento de la secreción de tripsina ocurre después de 2 semanas de haber destetado a los cerdos, coincidiendo con el 260% de incremento en el consumo de materia seca y un 150% de incremento en el consumo de proteína, esto en comparación con lo

observado en el destete a 28 días. La quimotripsina presenta un patrón de secreción distinto al de la tripsina, durante el periodo de lactación se observa un incremento de su actividad de 1.5 – 3.3 veces. En la semana posterior al destete se presenta un declive importante en su actividad, lo cual se recupera de la segunda a la cuarta semana posdestete. La lipasa pancreática también se incrementa durante las 4 primeras semanas de vida y posteriormente al destete existe una relación con el nivel de consumo de lípidos.

Probablemente es alrededor de la cuarta semana de vida del animal en lactación, que el perfil de las enzimas digestivas puede adaptarse de forma eficiente a la composición del alimento. Después del destete el desarrollo de las enzimas proteolíticas y amilolíticas del páncreas y de las enzimas maltolíticas del intestino delgado permiten una substitución progresiva de la alimentación (Reis de Souza y Mariscal, 1997).

En general, las enzimas digestivas producidas por el páncreas exócrino hidrolizan una mayor fracción del alimento ingerido en contraste al hidrolizado por las enzimas intestinales (Miller et al., 1991). Sin embargo, la mayor parte del proceso digestivo toma lugar en el intestino delgado, sobre todo en el lumen intestinal pero en particular a nivel del borde de cepillo de la mucosa intestinal (Aumaitre, 1997). Entonces, debe resaltarse que el conjunto enzimático del lechón en lactación está perfectamente adaptado a su principal alimento, la leche.

Las disacaridasas tienen un papel determinante en la digestión de la lactosa, sacarosa y maltosa (Reis y Mariscal, 1997). Mientras que la maltasa y la sacarasa son poco activas al inicio de la vida del lechón (Mc Donald et al., 1975), la lactasa presenta una actividad máxima alrededor de los 15 días de vida y después disminuye rápidamente (Mc Donald et al., 1975; Reis y Mariscal, 1997), aún cuando el lechón continúe ingiriendo leche. Al contrario, las actividades de la sacarasa y maltasa aumentan continuamente a partir de la 2ª y 3ª semana de vida.

2.2.2 Efecto del destete sobre el desarrollo enzimático

Debido a que uno de los principales problemas encontrados en el lechón que se separa de la madre a una edad temprana es la inmadurez digestiva (Sanchez et al., 1997); los efectos observados en estos animales es el fuerte estrés nutricional que se ocasiona al cambiar de una dieta líquida a una dieta sólida de diferente composición, textura y digestibilidad (Cruz et al., 1997, 1998).

En lo que se refiere al proceso enzimático, el destete promueve una disminución en la actividad total y específica de las enzimas pancreáticas en la semana posterior al destete (Jaeger et al., 1987; Reis y Mariscal, 1997), por lo que se considera que la actividad enzimática es limitante durante esta etapa (Miller et al., 1991).

Se observa que las actividades de las enzimas pancreáticas están involucradas directamente en la digestión de proteínas de la leche, por lo que la actividad de la tripsina permanece baja hasta el tiempo de destete hasta que los lechones consumen un alimento que contenga proteína vegetal.

En el momento del destete ocurre una profunda modificación en el proceso de digestión de la caseína, de los lípidos emulsificados y de la lactosa provenientes de la leche materna, siendo que en esta etapa las enzimas digestivas deben estar aptas para digerir proteínas de origen vegetal, por lo que los tres primeros días después del destete constituyen un periodo difícil para el lechón, ya que las enzimas pancreáticas e intestinales no responden al nuevo sustrato proporcionado.

El efecto del destete también provoca un decremento en la actividad de la lactasa (Jaeger et al., 1987) y el cambio en la composición en cuanto a carbohidratos sugiere que hay un efecto significativo de la edad en el desarrollo de la carbohidrasa pancreática y una acción benéfica adicional del destete y de la distribución de almidón en el iniciador. En este sentido, la actividad de la amilasa pancreática es menor en animales alimentados con lactosa como única fuente de carbohidratos en la dieta.

Es así como la actividad de enzimas endógenas sintetizadas en los órganos del lechón y las enzimas exógenas de la flora microbiana del quimo, están ambas activamente involucradas en el proceso digestivo del lechón destetado. La actividad de las enzimas microbianas es afectada por la composición de la dieta indicando el papel útil de la flora microbiana en el desdoblamiento del carbohidrato específico en la dieta (Aumaitre, 1997).

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERÉTARO
BIBLIOTECA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

HIPÓTESIS

El desarrollo de los órganos digestivos y de la actividad de las enzimas pancreáticas y de la mucosa intestinal de lechones alimentados con dietas a base de suero de leche será mayor que en aquellos alimentados con lactosa cristalina.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la fuente de lactosa (Suero de leche o lactosa cristalina) en dietas de iniciación sobre el desarrollo de los órganos digestivos y la actividad enzimática del páncreas y de la mucosa intestinal.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Evaluar en lechones alimentados con dietas a base de suero de leche o de lactosa al día del destete y a los 2, 7, 14, 21 y 28 días posdestete:

- El peso absoluto (g) y relativo (g/Kg) de los órganos digestivos (páncreas, hígado, estómago, intestino delgado e intestino grueso).
- El pH del contenido estomacal e intestinal.
- La actividad total (UI/g páncreas) de las enzimas amilasa y lipasa pancreática y de la lactasa intestinal.

5. MATERIAL Y METODOS

La parte experimental se realizó en la granja experimental porcina del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), ubicado en Ajuchitlán, Querétaro. Los análisis enzimáticos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Nutrición Animal de la Licenciatura de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Se utilizaron un total de 66 lechones destetados a los 17.7 días \pm 1.5 con un peso promedio de 5.387 Kg. \pm .8, seis lechones se sacrificaron al día del destete (día cero), los demás 60 lechones se distribuyeron entre los dos tratamientos experimentales (30 lechones/tratamiento) y se alojaron de acuerdo a su peso inicial en seis corrales de destete (5 lechones /corral. Las dietas se formularon para 2 fases productivas (fase 1 del destete hasta los 14 días y fase 2 de los 15 días a los 28 días posdestete). En los días 2, 7, 14, 21, 28 posdestete se selecciono al azar un lechón de cada corral para ser sacrificado que proporciono seis unidades experimentales/día de sacrificio/ tratamiento) (Figura 1).

Para evaluar el desarrollo de los órganos digestivos y enzimáticos para cada una de las dietas se procedió a sacrificar a los lechones. Se adormecieron con CO₂ y se degollaron. Posteriormente se procedió a la apertura de la cavidad abdominal para la colecta del páncreas, hígado, así como el estómago, intestino delgado e intestino grueso, los cuales fueron desecados, pesados y en su caso medidos longitudinalmente (intestino delgado y grueso). El peso de los órganos se expreso en gramos y en relación al peso vivo de los animales.

En el contenido del estómago y del intestino delgado se midió el pH mediante potenciometría.

El páncreas se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido con el objeto de parar cualquier actividad enzimática y se midió posteriormente la actividad de las enzimas pancreáticas: amilasa (Métais y Bieth, 1968) (Anexo 1) y lipasa (Rathelot et al., 1975) (Anexo 2).

El intestino delgado fue separado y desdoblado de sus asas intestinales con el fin de realizar un raspado de la mucosa. Posteriormente el raspado se guardó inmediatamente en nitrógeno líquido, posteriormente se conservó a -70° C hasta que se cuantificó la actividad de la lactasa (Dahlquist, 1964) (Anexo 3).

Las variables de respuesta evaluadas fueron:

- a) El peso absoluto(g) y relativo (g/Kg) de órganos digestivos,
- b) El pH del contenido estomacal y
- c) La actividad total (UI/g páncreas) de las enzimas amilasa y lipasa pancreática y de la lactasa intestinal.

Los resultados se analizaron empleando el paquete estadístico SAS (1982) de acuerdo a un diseño factorial 2 x 6, siendo el factor uno la fuente de lactosa de la dieta (suero de leche o lactosa cristalina) y el factor dos los días posdestete (0, 2, 7, 14, 21 y 28); con 6 réplicas por dieta experimental, según el siguiente modelo (Steel y Torrie, 1980):

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + T_{Bij} + E_{ijk}$$

Donde

Y_{ijk} = variable de respuesta

μ = media general

T_i = i -ésimo efecto del tratamiento, $i = 1,2$

B_j = j -ésimo efecto de los días posdestete, $j = 1-6$

T_{Bij} = interacción tratamiento edad posdestete

E_{ijk} = error experimental

Para analizar las variables de respuesta con respecto a los días posdestete se realizaron análisis de regresión para evaluar respuestas lineales y cuadráticas (Steel y Torrie, 1980).

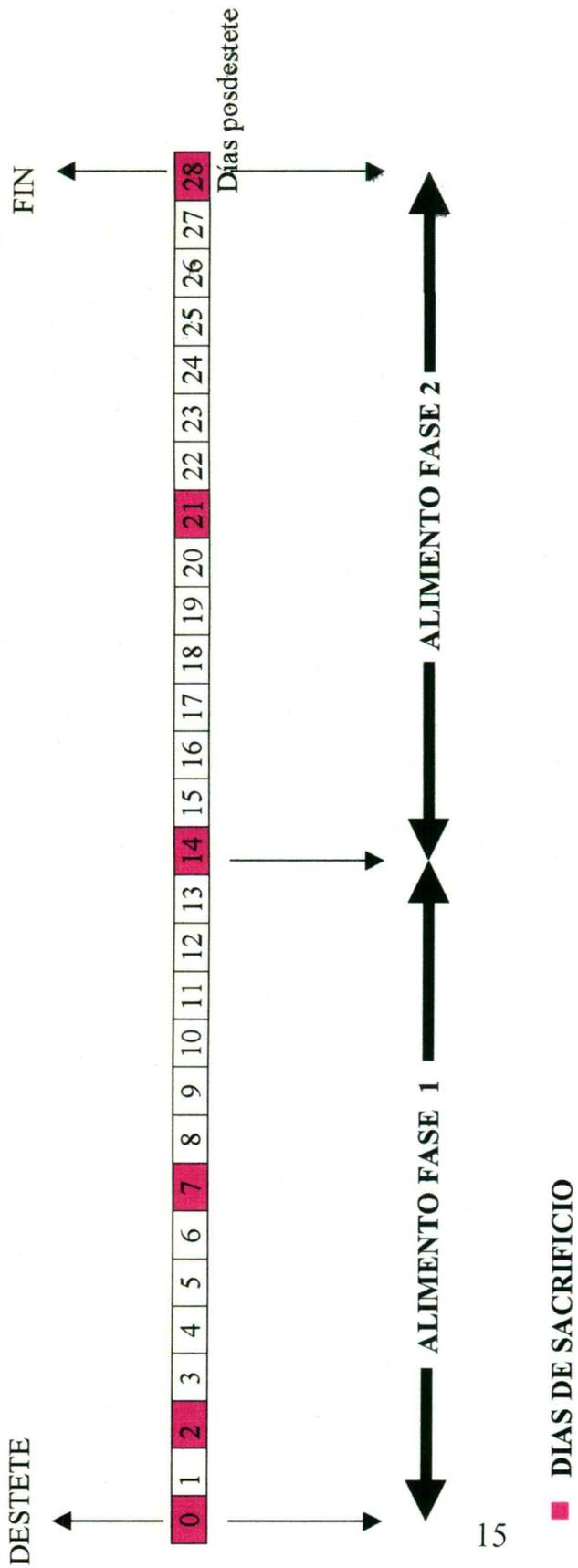
Cuadro 1. Composición centesimal y química de las dietas experimentales.

INGREDIENTES	SUERO DE LECHE		LACTOSA CRISTALINA	
	Fase 1	Fase 2	Fase 1	Fase 2
Sorgo	41.79	54.29	46.69	56.68
Lactosa cristalina	-----	-----	17.50	8.75
Pasta de soya	12.00	20.00	12.00	20.00
Suero de leche ácido	25.00	12.50	-----	-----
CPS ¹	12.86	-----	11.18	-----
AIS ²	-----	4.80	-----	5.58
Aceite de maíz	4.53	4.00	4.00	4.00
Plasma porcino seco	-----	-----	4.00	-----
Ortofosfato	1.08	1.27	2.02	1.70
Carbonato de calcio	0.67	0.84	0.59	0.83
Oxido de zinc	0.40	-----	0.40	-----
Lisina - HCl	0.33	0.47	0.36	0.51
Triptosine	0.07	0.36	-----	0.42
Cloruro de sodio	0.35	0.35	0.35	0.35
Treonina	0.14	0.31	0.12	0.36
DL Metionina	0.13	0.16	0.14	0.17
Vitaminas ³	0.36	0.36	0.36	0.36
Minerales ⁴	0.12	0.12	0.12	0.12
Tylan	0.10	0.10	0.10	0.10
Carbadox	0.05	0.05	0.05	0.05
Antioxidante	0.02	0.02	0.02	0.02
Composición Química				
Materia Seca	95.68	99.29	99.02	98.86
Proteína Cruda (%) ⁵	20.62	19.63	20.62	19.42
Extracto Etéreo (%) ⁵	9.6	8.5	10.1	7.99
Lisina Digestible(%) ⁶	1.21	1.21	1.21	1.21
Lactosa (%) ⁶	16.62	8.31	16.62	8.31
Energía Metabolizable (Kcal/Kg) ⁶	3350	3368	3387	3396

¹Concentrado de proteína de soya. ²Aislado de proteína de soya. ³Complemento vitamínico que proporciona por kilogramo de dieta: Vitamina A 6.8 UI/g, Vitamina D 1.35 UI/g, Vitamina E 0.10 UI/g, Colina 361 mg/kg, Niacina 55.7 mg/kg, Acido Pantoténico 13.6 mg, Riboflavina 2.27 mg/kg, Vitamina B₁₂ 37 µg/kg.

⁴Complemento mineral que proporciona por kilogramo de dieta: Cobre 9 mg/kg, Iodo 4.5 mg/kg, Hierro 105 mg/kg, Manganeso 23.5 mg/kg, Selenio 0.103 mg/kg, Zinc 117.5 mg/kg. ⁵Valor analizado y expresado en base seca. ⁶Valor calculado.

Figura 1. Esquema experimental.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Peso de órganos

6.1.1 Efecto de la fuente de lactosa.

El peso vivo, el peso absoluto y relativo de los órganos digestivos a excepción del estómago no tuvieron diferencias ($P>0.05$) con respecto a la fuente de lactosa (Cuadro 2). Lo que nos indica que cualquiera que sea la fuente de lactosa suministrada a los lechones, va a estimular en la misma magnitud el desarrollo de los órganos digestivos (Reis de Souza et al., 2002). Para el caso del estómago ($P<0.05$), la lactosa cristalina promovió el desarrollo de este órgano (de 52 a 55 g), así como una mayor longitud del intestino delgado ($P<0.05$) (de 8.4 a 8.6 m) con respecto a la lactosa del suero de leche (Cuadro 3). Esta respuesta, aunque pequeña, se debe probablemente a que la presencia de la lactosa cristalina estimula la actividad fermentativa de los microorganismos de los lechones con una mayor producción de ácido láctico, lo que provocó una hipertrofia de estos órganos (Xu y Cranwell, 1992).

Cuadro 2. Efecto de la fuente de lactosa sobre el peso de los órganos digestivos de lechones destetados.

PESOS	FUENTE DE LACTOSA		EEM
	Suero de leche	Lactosa cristalina	
Peso vivo, PV (Kg).	6.83	7.01	0.12
Peso absoluto (g)			
Páncreas	10.78	11.28	0.32
Hígado	180.00	194.27	3.02
Estómago	52.00	55.00	1.21
Intestino delgado	298.40	323.70	5.34
Intestino grueso	121.00	127.00	3.12
Peso relativo (g/kg PV)			
Páncreas	1.54	1.56	0.04
Hígado	25.78	27.17	0.30
Estómago	7.35	7.51	0.14
Intestino delgado	41.05	43.30	0.61
Intestino grueso	16.62	16.96	0.35

EEM = Error estándar de la media.

Cuadro 3. Efecto de la fuente de lactosa sobre la longitud intestinal y el pH gástrico e intestinal de lechones destetados.

	FUENTE DE LACTOSA		EEM
	Suero de leche	Lactosa cristalina	
pH			
Estómago	3.12 ^a	3.37 ^b	0.09
Intestino delgado	6.24	6.28	0.06
Longitud, m			
Intestino delgado	8.40 ^a	8.60 ^b	0.09
Intestino grueso	1.68	1.73	0.03

* Literales diferentes en cada hilera difieren estadísticamente ($P < 0.001$)

EEM = Error estándar de la media.

6.1.2 Efecto del tiempo posdestete.

A los dos días posdestete el peso y/o longitud de los órganos, así como el peso vivo mostraron una depresión causada por el destete (Makkink et al., 1994, Cordero, 2003), sin embargo, en todos los casos se presentó un despunte hasta alcanzar un máximo desarrollo ($P < 0.05$) a los 28 días (Cuadro 4 y 5, Gráficas 1, 2 y 3). La disminución del ritmo de crecimiento en el peso y/o longitud de los órganos al día 2 posdestete en relación al día del destete, aunque no fueron significantes ($P > 0.05$), se debe al cambio de una dieta líquida a una sólida, donde el consumo es muy bajo y por ende el lechón sufre un estrés nutricional, sumado al estrés psicológico (Funderbarke y Seerley, 1990).

Peso vivo: El peso vivo de los lechones (Cuadro 4) se incrementó ($P < 0.05$) hasta los 14 dpd (Kelly et al., 1991) mostrando aumentos significativos hasta los 28 dpd, siendo del 77% con respecto al día del destete. El desarrollo del peso vivo se vio grandemente afectado por el destete, principalmente durante la primera semana posdestete. Kelly et al. (1991) no observaron cambios del destete al 3er dpd en cuanto a peso vivo.

Páncreas: El peso absoluto y relativo del páncreas (Cuadro 4) se elevó ($P < 0.05$) a los 7 dpd, de 14 a 21 dpd se mantuvo constante probablemente debido al cambio de dieta, sin embargo, a los 28 dpd ascendió significativamente ($P < 0.05$), alcanzando incrementos de 27 y 74% respectivamente, en relación al día del destete. Datos muy similares de peso relativo

Cuadro 4. Efecto de los días posdestete sobre el peso de los órganos digestivos en lechones destetados.

PESOS	DÍAS POSDESTETE*						EEM
	0	2	7	14	21	28	
Peso vivo (Kg)	5.7 ^d	5.1 ^d	5.6 ^d	6.7 ^c	8.3 ^b	10.1 ^a	0.12
Peso absoluto (g)							
Páncreas	6.4 ^d	5.8 ^d	8.8 ^c	13.2 ^b	14.6 ^b	17.3 ^a	0.32
Hígado	149 ^{cd}	125 ^e	134 ^{de}	161 ^c	231 ^b	322 ^a	3.02
Estómago	28 ^d	27 ^d	38 ^c	64 ^b	67 ^b	97 ^a	1.21
Intestino delgado	171 ^d	130 ^e	182 ^d	345 ^c	450 ^b	589 ^a	5.34
Intestino grueso	56 ^e	50 ^e	90 ^d	124 ^c	192 ^b	232 ^a	3.12
Peso relativo (g/kg PV)							
Páncreas	1.13 ^e	1.17 ^e	1.57 ^b	1.77 ^{ab}	1.72 ^{ab}	1.96 ^a	0.04
Hígado	26.38	24.85 ^{cd}	23.96 ^d	23.84 ^d	27.90 ^b	31.90 ^a	0.29
Estómago	5.08 ^d	5.32 ^d	6.82 ^e	9.598 ^a	8.14 ^b	9.63 ^a	0.14
Intestino delgado	30.05 ^{cd}	26.09 ^d	32.68 ^e	51.42 ^b	54.19 ^b	58.62 ^a	0.61
Intestino grueso	10.11 ^d	10.17 ^d	16.03 ^e	18.47 ^b	23.06 ^a	22.90 ^a	0.35

* Literales diferentes en cada hilera difieren estadísticamente (P<0.001).

EEM = Error estándar de la media.

Cuadro 5. Efecto de los días posdestete sobre la longitud intestinal y el pH estomacal e intestinal en lechones destetados

	DÍAS POSDESTETE						EEM
	0	2	7	14	21	28	
pH							
Estómago*	3.6 ^a	3.1 ^{ab}	3.6 ^a	3.1 ^{ab}	3.6 ^a	2.5 ^b	0.09
Intestino delgado**	6.2 ^{bc}	6.6 ^{ab}	6.8 ^a	6.2 ^b	6.1 ^{bc}	5.7 ^c	0.06
Longitud, (m)							
Intestino delgado**	7.2 ^c	6.7 ^c	7.2 ^c	9.3 ^b	9.6 ^b	11.0 ^a	0.09
Intestino grueso**	1.4 ^d	1.2 ^d	1.6 ^c	1.9 ^b	2.0 ^{ab}	2.1 ^a	0.03

* Literales diferentes en cada hilera difieren estadísticamente (P<0.01).

** Literales diferentes en cada hilera difieren estadísticamente (P<0.001).

EEM = Error estándar de la media.

del páncreas obtuvieron Lindermann *et al.* (1986), de 1.54 – 2.19 g/Kg a las 2 y 4 semanas posdestete. Kelly *et al.* (1991) no observaron cambios en el peso del páncreas del destete al 3er dpd.

El desarrollo del peso relativo del páncreas tiene un comportamiento cuadrático, presentando una $R^2 = 0.61$ (Gráfica 1) ($P < 0.05$), comportamiento similar al reportado por Cordero (2003) ($R^2 = 0.57$). Indicando que a los 21 dpd se alcanza el máximo crecimiento del páncreas. En el periodo posdestete hay un gran incremento en la tasa de crecimiento del tejido pancreático (Cranwell, 1995), como también lo observó Corring *et al.* (1978).

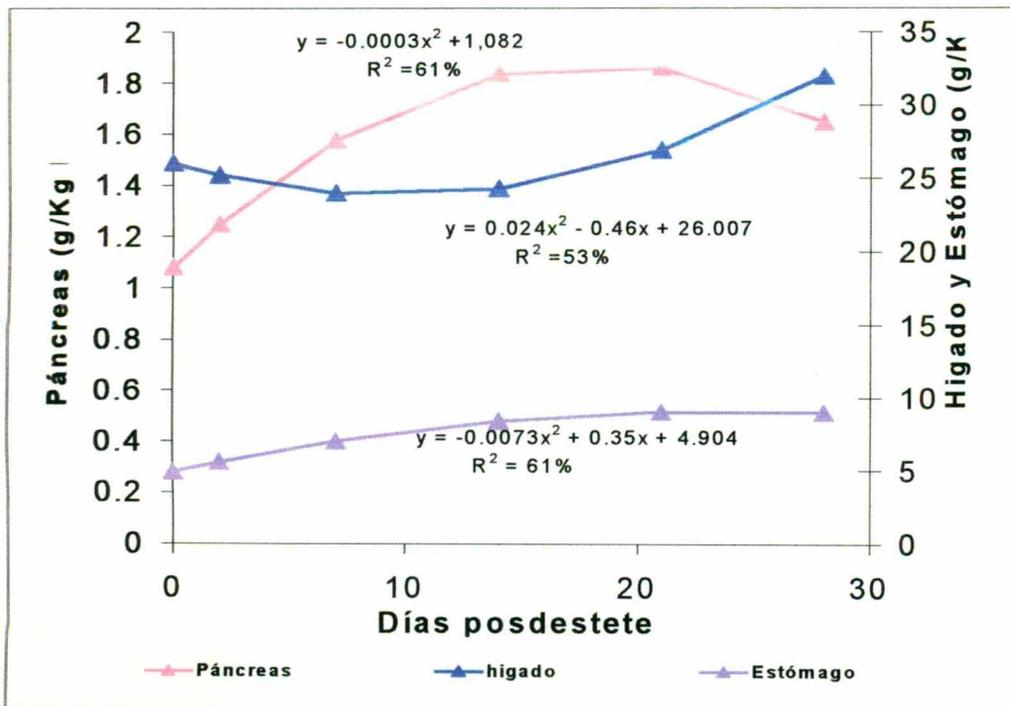
Hígado: El crecimiento del peso absoluto del hígado (Cuadro 4) empieza el día 7 dpd y continúa hasta los 28 dpd ($P < 0.05$); teniéndose ascensos del 116% en su peso absoluto y de 21% en el peso relativo con respecto al día del destete. Su crecimiento fue muy sensible en la primera semana de destete.

El desarrollo del peso relativo del hígado se comporta cuadráticamente, con una $R^2 = 0.53$ ($P < 0.05$) (Gráfica 1), siendo muy bajo en las 2 primeras semanas posdestete e incrementándose hasta los 28 dpd.

Estómago: El peso absoluto del estómago (Cuadro 4) se elevó paulatinamente ($P < 0.05$) del día 7 hasta el 28 dpd, desarrollándose un 240% con respecto al día del destete. El peso relativo aumentó el día 7 y 14 posdestete, manteniéndose hasta los 28 dpd, acelerándose el crecimiento un 90% con respecto al día del destete. Kelly *et al.* (1991) no observaron cambios en el peso del estómago del destete al 3er dpd. El peso absoluto y el relativo del estómago es sensible al cambio de dieta a los 14 dpd. A los 28 dpd se presenta el mayor ascenso en el peso absoluto, correspondiendo al pH más bajo (2.5) (Cuadro 5), lo que indica una posible hipertrofia del órgano (Xu y Cranwell, 1992)

El crecimiento del peso relativo del estómago se comporta cuadráticamente, con una $R^2 = 0.61$ ($P < 0.05$) (Gráfica 1), teniendo un máximo desarrollo a los 14 dpd.

Gráfica 1. Peso relativo (g/kg/PV) del páncreas, hígado y estómago de lechones en función de la edad posdestete.



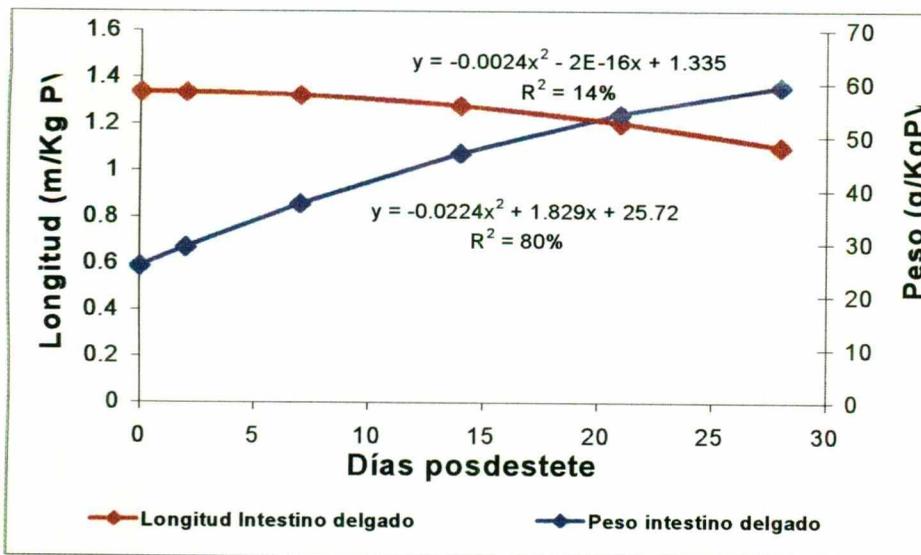
Intestino delgado: El desarrollo del intestino delgado en relación al peso absoluto (Cuadro 4) inicia de los 7 y termina hasta los 28 dpd, presentando diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los dpd y el día del destete, mostrando un incremento total de 214%. Kelly *et al.* (1991) observaron un descenso en el peso del intestino delgado del destete al 3er dpd. El peso relativo se recuperó a los 7 y creció a los 14 dpd, sin embargo, a los 21 dpd mostró una desaceleración en su crecimiento, esto debido al cambio de dieta (fase 2); a los 28 dpd se alcanzó un crecimiento del 95%. Los incrementos en peso del intestino delgado con respecto a los dpd fueron mayores a los reportados por Jensen *et al.* (1997), sin embargo, el crecimiento del peso relativo fue similar a lo observado por Cera *et al.* (1995) y Cordero (2003). El crecimiento del intestino delgado fue similar al desarrollado por el estómago.

La longitud del intestino delgado (Cuadro 5) es muy sensible al destete, ya que no presenta cambio alguno ($P > 0.05$) sino hasta la segunda semana posdestete, permaneciendo constante hasta las 3 semanas por efecto del cambio de dieta (fase 2), posteriormente incrementa ligeramente a los 28 dpd ($P < 0.05$), teniendo un crecimiento del 53% con respecto al día del

destete. Jensen et al. (1997) no encontraron cambio alguno en la longitud del intestino delgado del destete a los 7 dpd.

La longitud del intestino delgado relativo al peso vivo (Gráfica 2) decrece cuadráticamente ($R^2 = 0.14$) ($P < 0.05$) con respecto a la edad posdestete, sin embargo, el peso relativo asciende aceleradamente de los 14 a los 28 dpd, siguiendo un comportamiento cuadrático ($R^2 = 0.80$) ($P < 0.05$) (Gráfica 2). Este comportamiento fue observado por Cranwell (1995) donde la longitud del intestino delgado relativo al peso vivo desciende con la edad y el diámetro del intestino y su capacidad se incrementa hasta las 8 – 10 semanas de edad. De igual forma Tarvid *et al.* (1994) observaron un aumento en la relación g/m de intestino delgado.

Gráfica 2. Peso relativo (g/kg PV y m/kg PV) del intestino delgado de lechones en función de la edad posdestete

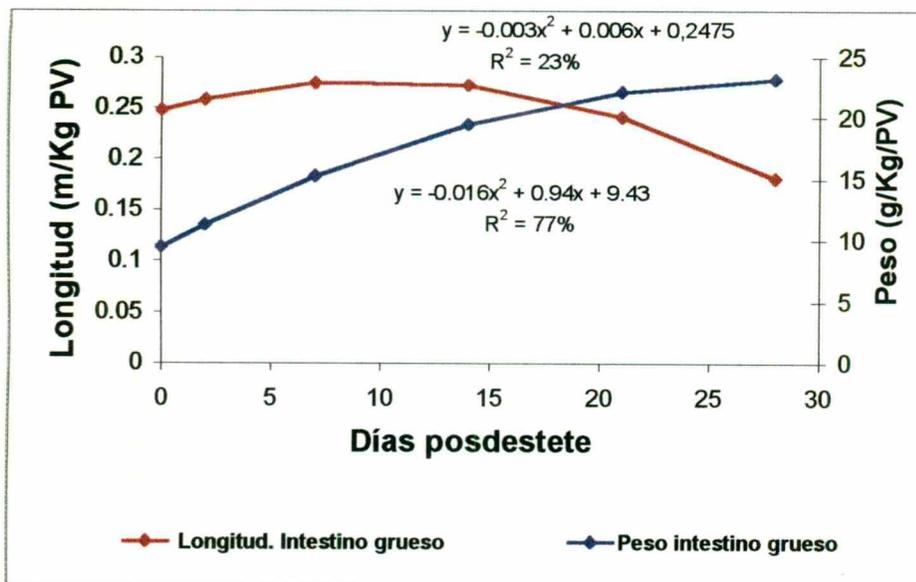


Intestino grueso: El crecimiento del peso absoluto del intestino grueso (Cuadro 4) empieza a los 7 y termina a los 28 dpd ($P < 0.05$), con un incremento total desde el destete de 314%. Con respecto al aumento en peso relativo, se da de los 7 a los 21 dpd ($P < 0.05$), manteniéndose constante a los 28 dpd, con un desarrollo del 116%. Este órgano es el que se desarrolla en mayor proporción a los demás, esto está íntimamente relacionado al suministro paulatino de alimento sólido, ya que Brees-Schreurs *et al.* (1998) lo comprobaron al observar un menor crecimiento en lechones no destetados o alimentados con altos niveles de leche, comparados

con lechones alimentados con alimento sólido. La longitud del intestino grueso (Cuadro 5) fue muy sensible al destete, no presentando crecimiento sino hasta los 7 dpd, mostrando efecto por el cambio de dieta a los 14 dpd, manteniéndose sin cambio a los 28 dpd, con un desarrollo del 53% con respecto al día del destete.

El comportamiento en el desarrollo del intestino grueso es muy similar al observado en el intestino delgado, ya que el peso y la longitud relativos del intestino grueso creció cuadráticamente ($R^2 = 0.23$ y 0.77 respectivamente) ($P < 0.05$) (Gráfica 3). Lo que se traduce en un mayor crecimiento en peso y/o diámetro intestinal y una menor evolución de la longitud con respecto a la edad posdestete. Esto es relevante que ocurra, ya que lo que esto denota es una mayor capacidad de digestión y absorción.

Gráfica 3. Peso relativo (g/kg PV y m/kg PV) del intestino grueso de lechones en función de la edad posdestete



El crecimiento de los órganos digestivos fue isométrico o negativamente alométrico en la etapa de destete, contrariamente a lo reportado en la gestación y la primera semana de vida, donde el crecimiento es alométrico (Cranwell, 1995).

El desarrollo observado en todos los órganos digestivos se debe a que en el destete se requieren relativamente grandes capacidades digestivas para digerir los nuevos alimentos de las dietas sólidas del destete, conjuntamente al crecimiento normal por edad.

6.2 pH de los contenidos digestivos

6.2.1 Efecto de la fuente de lactosa.

La fuente de lactosa no afectó el pH del ID ($P>0.05$), pero el del estómago si mostró efecto ($P<0.01$) (3.12 y 3.37 para lactosa del suero de leche y lactosa cristalina respectivamente) (Cuadro 3).

La capacidad de producción HCl en el estómago es limitada en los lechones (Easter, 1988).

Durante la lactancia la falta de acidez se suple con la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de la lactosa por acción de los *Lactobacillus*, al destete el suministro de lactosa disminuye y la capacidad amortiguadora del contenido digestivo aumenta (Williams, 2001).

6.2.2 Efecto del tiempo posdestete.

En relación al pH del contenido del estómago y del ID se mantuvo constante hasta alcanzar valores más ácidos ($P<0.05$) a los 28 días (Cuadro 5). Durante los primeros días posdestete el estómago tiene una limitada capacidad acidificante (Easter, 1988; Radcliffe et al., 1998) y un menor número de *Lactobacillus*, por la disminución de lactosa en la dieta, lo que provoca un incremento del pH y un aumento en su capacidad amortiguadora del contenido digestivo (Williams, 2001). Durante este periodo los lechones sufren una limitación temporal de su capacidad digestiva por el aumento en el pH, lo que provoca una ineficiente digestión de las proteínas y una probable masiva llegada de patógenos (Easter, 1998). Además del estrés nutricional, Funderbarke Seerley (1990) observó que el estrés psicológico provoca un incremento en el pH del estómago.

El descenso del pH a los 28 días se produjo durante la fase 2 de alimentación de los lechones, donde se reemplazó plasma porcino por proteína vegetal, la cual tiene menor capacidad amortiguadora y estimula la producción de ácido clorhídrico, esto aunado a un mayor consumo de alimento por parte de los lechones y a una mayor fermentación de la lactosa para producir ácido láctico.

En ambos contenidos digestivos (estomacal e intestinal) se presentan bajos valores de pH a los 28 dpd, lo que se relaciona con una madurez digestiva, ya que la presencia de acidez en el intestino delgado estimula la secreción pancreática (Cranwell, 1995).

6.3 Actividad enzimática pancreática e intestinal

6.3.1 Efecto de la fuente de lactosa.

Los resultados de la actividad enzimática total (unidades internacionales por gramo de páncreas) de la lactasa intestinal, así como de la amilasa, lipasa, tripsina y carboxipeptidasas A y B pancreáticas no tuvieron diferencias significativas ($P > 0.05$) con respecto a las dietas experimentales a base de subproductos lácteos (suero de leche y lactosa cristalina) (Cuadro 6). Reis de Souza et al. (2002) probaron que lechones alimentados con dietas conteniendo lactosa, ya sea proveniente de suero de leche o lactosa cristalina, presentaban mayores actividades de la lactasa (68%) en relación a lechones que no la contenían, y que la lactosa cristalina tiene mayor capacidad de estimulación que la lactosa proveniente del suero de leche; sin embargo la actividad de la amilasa no se vio afectada por la fuente de lactosa.

Cuadro 6. Efecto de la fuente de lactosa sobre la actividad total de algunas enzimas digestivas en lechones destetados.

UI/g	FUENTE DE LACTOSA		EEM
	Suero de leche	Lactosa cristalina	
Lactasa	62.6	64.7	1.30
Amilasa	122134	111003	3772.79
Lipasa	1316	1313	21.51

EEM = Error estándar de la media.

6.3.2 Efecto del tiempo posdestete.

Lactasa: La lactasa intestinal (Cuadro 7) presenta su máxima actividad el día del destete (116 UI/g) seguido de un decremento los días 2 y 7 posdestete (85 y 40 UI/g. respectivamente) ($P < 0.05$). En lechones destetados a las 3 o 5 semanas de edad, la actividad específica de lactasa a los 5 dpd fue significativamente más baja que en lechones lactantes de la misma edad (Cranwell, 1995).. La actividad de la lactasa disminuye a los 2 días de vida cuando los lechones fueron alimentados con reemplazantes de leche contra alimento con calostro porcino (Jensen et al., 2001).

Cuadro 7. Efecto de los días posdestete sobre la actividad total de amilasa y lipasa pancreática y lactasa intestinal de lechones destetados.

UI/g	DÍAS POSDESTETE*						EEM
	0	2	7	14	21	28	
Lactasa	116.0 ^a	84.9 ^b	40.3 ^c	91.6 ^b	21.8 ^d	27.1 ^d	1.3
Amilasa	132974 ^b	65209 ^c	74703 ^c	127330 ^b	126694 ^b	172500 ^a	3772.8
Lipasa	1527 ^b	2175 ^a	1065 ^c	1023 ^c	1070 ^c	1027 ^c	21.5

* Literales diferentes en cada hilera difieren estadísticamente ($P < 0.001$)

EEM = Error estándar de la media.

En los lechones lactantes es alta la actividad de la lactasa debido a la gran concentración de lactosa en la leche. Sin embargo, en la primera semana posdestete esta actividad decrece debido a la baja concentración y consumo de lactosa. La lactasa es una enzima muy sensible a la presencia y concentración del sustrato (Reis de Souza et al., 2002). En un estudio realizado por Núñez *et al.*; (1996) se observó que la actividad de la lactasa decrece considerablemente cuando se restringe a los lechones en un 60% de la dieta, lo cual es sinónimo de bajo consumo de nutrimentos. Por otra parte, la inclusión de fuentes de proteína vegetal provoca una disminución en la actividad específica de la lactasa contra una dieta a base de caseína como fuente de proteína (Salgado et al, 2002).

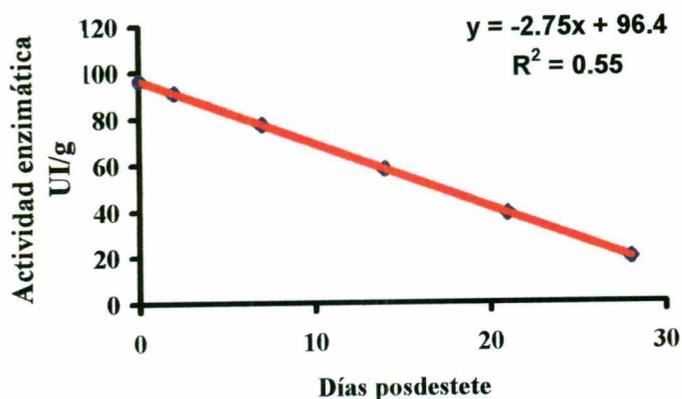
El destete ésta acompañado por cambios adversos en su morfología intestinal, incluyendo reducción de la altura y aumento de la anchura de las vellosidades, incremento de la profundidad de las criptas y disminución en la capacidad de absorción y de la actividad enzimática en el epitelio intestinal (Nabuurs y Hoogendoorn, 1993).

Por otro lado, Chapple *et al.* (1990) concluyeron que los niveles de glucocorticoides pueden estimular el desarrollo digestivo de la enzima lactasa en lechones, por lo tanto, el estrés del destete puede ser un factor en el descenso de la enzima debido a que esto repercute negativamente en la producción de glucocorticoides.

A los 14 días se incrementó la actividad (91 UI/g.) ($P < 0.05$) porque los animales mejoraron su consumo de alimento generando una recuperación de las vellosidades mejorando la absorción y la actividad enzimática del intestino. A este tiempo, al realizar el cambio de dieta en la

debido a una disminución del 50% en la incorporación de lactosa en la dieta, provocando la declinación de la actividad enzimática de la lactasa por falta de sustrato. Estas actividades fueron muy similares a las observadas a los 28 dpd en lechones que no consumieron lactosa (Reis de Souza *et al.*, 2002).

El comportamiento en la actividad de la lactasa con respecto a la edad posdestete presentó una respuesta lineal ($R^2 = 0.55$) ($P < 0.05$) (Gráfica 4), afirmando lo observado por Kelly *et al.* (1991), donde la actividad de la lactasa en cerdos lactantes tuvo un decremento durante la 2ª a la 45ª semanas de edad. Kelly y King (2001) reportaron que la actividad de la lactasa aumenta a los 21 días de edad y disminuye al destete.

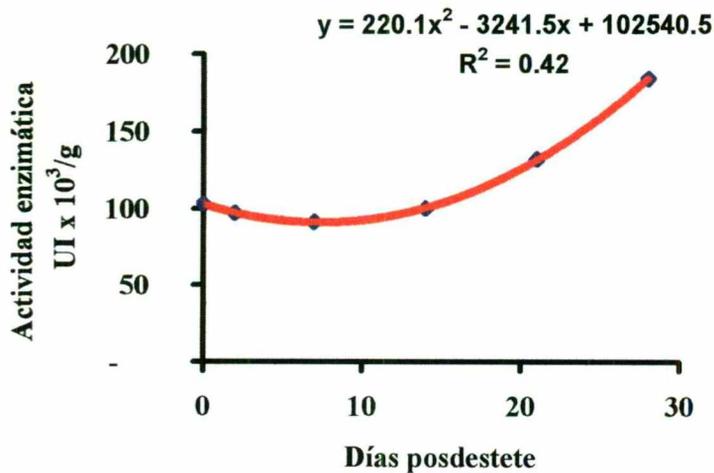


Gráfica 4. Comportamiento de la actividad total de lactasa vs días posdestete en lechones.

La presencia de lactasa está identificada desde las 7 semanas de gestación, incrementándose alrededor de las 12 semanas, encontrándose cantidades apreciables antes del nacimiento (Cranwell, 1995).

Amilasa: La amilasa pancreática (Cuadro 7) en el día del destete presentó una actividad enzimática total de 133×10^3 UI/g, observándose una disminución en los días 2 y 7 posdestete (65 y 75×10^3 UI/g, respectivamente) ($P < 0.05$). Linderman *et al.* (1986), Owley *et al.* (1986) y Jensen *et al.* (1997) observaron un desarrollo de la actividad de la amilasa desde el nacimiento hasta la cuarta semana de vida, así como una disminución al momento del destete debido a

una falta de consumo de alimento. Por esto, si se estimula el consumo inmediatamente después del destete, se contribuirá para una mayor producción de la enzima (Roppa, 2002, Jensen et al., 1997, Wiseman *et al.*, 2001) Lindermann *et al.* (1982) y Jensen et al, (1997), afirman que sucede un descenso en la cantidad de amilasa en la 1ª o 2ª semana siguiente al destete y se presenta una sensible recuperación en la 2-4 semanas posdestete.



Gráfica 5. Comportamiento de la actividad total de amilasa vs días posdestete en lechones

En los días 14 y 21 días posdestete (127 y 127×10^3 UI/g) empezó a incrementarse la actividad de la amilasa no teniendo diferencias entre días ($P > 0.05$), probablemente debido al cambio de dieta (Fase 2). De acuerdo con lo reportado por Owsley et al. (1986), Cranwell (1992), Lindemann *et al.* (1986) y Jensen *et al.* (1997) hay un ascenso en la actividad de la amilasa en la fase posdestete, lo que se debe a la necesidad de digerir los almidones contenidos en la dieta. A los 28 días posdestete (173×10^3 UI/g) los lechones alcanzaron su máxima actividad enzimática ($P < 0.05$), lo que se relaciona a que el consumo de alimento (Aumaitre, 1992; Wiseman et al., 2001) y el peso corporal ($r = 0.83$) (Jensen *et al.*, 1997) tienden a ser positivamente correlacionados con la actividad enzimática.

El desarrollo en la actividad de la amilasa pancreática con respecto a la edad posdestete presentó una respuesta cuadrática ($R^2 = 42\%$) ($P < 0.05$) (Gráfica 5), inducida por un progreso en el consumo de alimento, y por ende, de almidón por parte del lechón (Aumaitre, 1992).

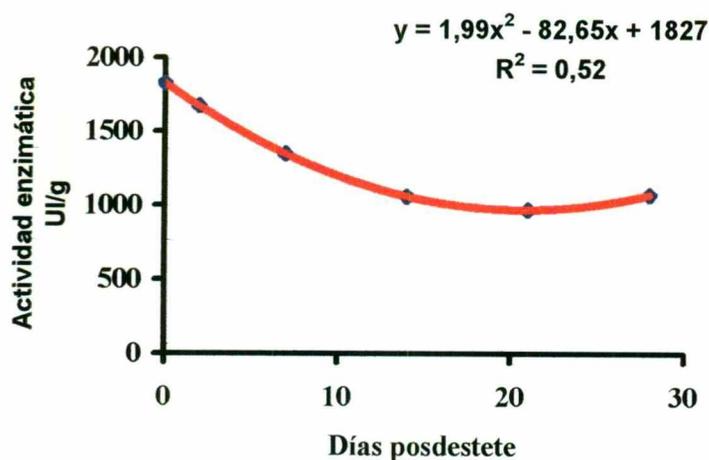
Lipasa: Para la lipasa pancreática (Cuadro 7) en el día del destete se observó una actividad de 1527 UI/g. Se han reportado grandes cantidades de esta enzima 3 días antes del nacimiento, indicando probablemente el desarrollo de la lipasa pancreática en el lechón en el curso de la vida fetal (Aumaitre, 1972). Los lechones lactantes digieren los nutrientes de la leche de la cerda muy eficientemente, y se ha reportado una digestión aparente de grasa del 96%, la cual declina en el destete de 65 a 80% (Jensen *et al.*, 1997). La actividad de la lipasa alcanza bajos niveles durante las 2 primeras semanas de vida, para luego desarrollarse rápidamente dentro de los 21 a 28 días de vida (Liu *et al.*, 2001). El sistema gastrointestinal tiene adaptaciones a considerables cambios en no solamente a las propiedades fisicoquímicas de los alimentos, sino también como cambio en el patrón de consumo en función de una digestión y absorción de nutrimentos satisfactoriamente y mantener una aceptable tasa de crecimiento (Jensen *et al.*, 1997). Jensen *et al.* (1997) encontraron que la composición de la leche de cerda cambia ligeramente de la semana 1 a la 3. Durante el periodo de lactancia la actividad de la lipasa pancreática de los lechones se incrementó considerablemente a partir de los 14 días de vida, ya que el contenido de grasa de la leche es mayor que el calostro consumido en la primera semana de vida (Lindeman *et al.*, 2001).

En el día 2 posdestete se da el pico más alto de actividad de la enzima registrando una cantidad de 2175 UI/g ($P < 0.05$). Este incremento se debe a una mayor síntesis de la enzima y a una menor liberación de jugo pancreático al intestino delgado, producido por un bajo consumo de alimento (Marion *et al.*, 2003). Sin embargo, en el estudio de Jensen *et al.* (1997), de acuerdo al análisis de ácidos grasos de la leche de la cerda y de la dieta posdestete, la concentración de enzimas no presentó mayores diferencias, por lo que se concluye que la composición de ácidos grasos no está relacionada con la disminución de la actividad de lipasa. El estudio de Pierizynowski *et al.* (1993) muestra que la secreción de lipasa es la que aumenta o disminuye y no la síntesis de la enzima en el páncreas, por lo que en este caso en el día 2 posdestete pudo haber mucha síntesis y poca secreción pancreática de lipasa, lo que elevó sus valores de actividad.

A los 7 dpd la actividad de la lipasa (1065 UI/g) disminuye significativamente ($P < 0.05$), manteniéndose estable durante los 14, 21 y 28 dpd (1023, 1069, y 1027 UI/g respectivamente). La reducción en la actividad enzimática al momento del destete puede ser por estrés nutricional o por un brusco decremento en el contenido de lípidos en la dieta de destete

comparado a la leche materna (Makkink et al 1994ab, Medel et al, 2001; Lindemann et al 1986, Jensen et al, 1997). El páncreas exócrino responde diferente en su secreción de lipasa con respecto a diferentes aceites vegetales, debido a la diferencia en perfil de ácidos grasos (Jacob *et al.*, 2001). La fuente de grasa tiene un efecto sobre la secreción de lipasa con cerdos adultos (Simoes Nimes, 1986). Jensen et al (1997), explican este decremento en la actividad por la depleción de la enzima almacenada causada por una alta tasa de secreción con respecto a la síntesis de la enzima.

El comportamiento en la actividad de la lipasa pancreática con respecto a la edad posdestete presentó una respuesta cuadrática ($R^2 = 52\%$) ($P < 0.05$) (Gráfica 6). Este desarrollo también lo reportaron Lindemann et al. (1986) y Cera et al. (1990), con declinación de la actividad a las 2 semanas posdestete.



Gráfica 6. Comportamiento de la actividad total de lipasa vs días posdestete en lechones.

7. CONCLUSIONES

Con base en los resultados del experimento desarrollado en esta tesis podemos concluir que:

- ❶ La adición de Lactosa Cristalina como fuente de lactosa en la dieta posdestete promovió el desarrollo del estomago, así como una mayor longitud del intestino delgado con respecto a la lactosa del suero de leche.
- ❶ A los 2 días posdestete todos los órganos, así como el peso vivo mostraron una depresión causada por el destete.
- ❶ A los 28 días hay un descenso del pH durante la fase 2 de alimentación porque se reemplaza plasma porcino por proteína vegetal.
- ❶ La fuente de lactosa no tuvo efecto sobre la actividad enzimática total de la lactasa intestinal, así como de la amilasa y lipasa pancreática.
- ❶ La actividad de la lactasa disminuyó linealmente con respecto a la edad posdestete por efecto en la disminución de lactosa.
- ❶ La actividad de la amilasa se incremento cuadráticamente con respecto a la edad posdestete por efecto de un mayor consumo de alimento (almidón).
- ❶ La actividad de la lipasa disminuyó cuadráticamente con respecto a la edad posdestete por efecto de la cantidad y calidad de grasa en la dieta.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

1. Aumaitre, A. 1972. Development of enzyme activity in the digestive tract of the suckling pig: Nutrition significance and implications for weaning. *World Review Anim. Prod.*, 8:54-67.
2. Aumaitre, A. 1997. Avances recientes en la fisiología del lechón recién destetado: proceso de adaptación de la capacidad digestiva. Memorias del curso sobre avances recientes en fisiología nutritiva del lechón y taller sobre nutrición de reproductoras. AMENA. México. P.1
3. Campabadal, C. Y G.H. Navarro. 1996. Alimentación del lechón al destete. *Asociación de Soya A.N.* No. 146:26
4. Cranwell P.D. 1995. Development of the Neonatal Gut and Enzyme Systems , In *The Neonatal Pig Development and Survival*, Edited Varley by M.A., CAB INTERNATIONAL.
5. Cera K R, Mahan D C, Cross R F, Reinhart G A, Whitmoyer R E. 1988a. Effect of age, weaning and postweaning diet on small intestinal growth and jejunal morphology in young swine. *J. Anim. Sci.*, 66:574
6. Chapple R P, Cuaron J A, Easter R A, 1990: *J. Anim. Sci.* 67(11), 2956
7. Corring T, Aumaitre A, Durand G. 1978. Development of digestive enzymes in the piglet from birth to 8 weeks. I. Pancreas and pancreatic enzymes. *Nutr. Metab.*, 22: 231
8. Cruz, J., Borbolla, F. Avila y G. Villar. 1997. Efecto de la inclusión de suero de leche líquido y L- glutamina sobre los parámetros productivos destetados a los 14 días de edad. Memorias del XXXII Congreso Nacional AMVEC. México. p. 60.
9. Cruz, J., Borbolla, F. Avila y G. Villar. 1998. Efecto del suero de leche líquido sobre el comportamiento productivo de cerdos destetados precozmente. Memorias del XXXIII Congreso Nacional AMVEC. México. p. 15.

10. Cunningham G. J. 1999, Fisiología Veterinaria, segunda edición, editorial Mc Graw- Hill Interamericana, México, D.F. p.332
11. Dalquist A. 1964. Methods for assay of intestinal disaccharidases. *Anal. Biochem.*, 7:18-25
12. De la Cruz, A., R. Mendoza, G. Villar, E. Avila y G. Borbolla. 1998. Efecto de la L-glutamina sobre la integridad intestinal de los cerdos destetados precozmente. *Memorias del XXXIII Congreso Nacional AMVEC. México. P. 29.*
13. De la Cruz, A., R. Mendoza, G. Villar y G. Borbolla. 1999. Utilización de la L-glutamina como preservador de la integridad intestinal de cerdos destetados precozmente. *Memorias del IX Congreso Nacional AMENA. México. P. 2.*
14. Eford R C, Armstrong W D, Herman D L. 1982. The development of digestive capacity in young pigs: Effects of weaning regimen and dietary treatment. *J Anim Sci.*, 64:1664
15. Funderburke D. W., The effects of postweaning stressors on pig weight change, blood, liver and digestive tract characteristics, *J. Anim. Sci* 68: 155-162
16. Ganong, W. F. 1994. Fisiología Médica. 14a Ed. Edit. Manual Moderno. México.
17. Hiram, H. W. 1998. Nutrición y alimentación del lechón. *Los Porcicultores y su entorno. Año I. No. 6. p. 26*
18. Jaeger, L. A., C. H. Lamar, G. D. Bottoms and T. R. Cline. 1987. Growth-stimulation substances in porcine milk. *Am. J. Vet. Res.* 48: 1531.
19. Jakob S. et al, 2001, Influence of intraduodenally infused olive and coconut oil on postprandial exocrine pancreatic secretions of growing pigs., *J. Anim Sci* 79:477-485.
20. Kelly and T.P. King, 2001, Digestive Physiology and Development in Pigs, In *The Weaner pig*

Nutrition and management, Edited by M.A. Varley and J. Wiseman, CABI Publishing.

21. Jensen M S, Jensen S K, Jakobsen K. 1997. development of digestive enzymes in pigs with emphasis on lipolytic activity in the stomach and pancreas. *J. Anim. Sci.*, 75: 437.
22. Lindemann M D, Cornelius S G, El kandelgy S M, Moset R l, Pettigrew J E. 1986. Effect of age, weaning and diet on digestive enzyme levels in the piglet. *J. Anim. Sci.*, 62: 1298.
23. Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:263.
24. Makkink C A, Puia G N, Guixin Q, Vertegen M W A. 1994b. Effect of dietary protein source on feed intake, growth, pancreatic enzyme activities and jejunal morphology in newly-weaned piglets. *Br. J. Nut.*, 72, 353.
25. Makkink C A, Berntsen P JM, Brigitte M L, op den Kamp, Bas Kemp, Versegen M W A. 1994a Gastric protein breakdown and pancreatic enzyme activies in response to two different dietary protein sources in newly waned pigs. *J. Anim. Sci.*, 72:2843.
26. Mc Donald, P., R. A. Edwards and J.F.D. Greenhalgh. 1975. *Nutrición animal*. 2a. Ed. Edit. Acribia. España.
27. Métails, P. Et Bieth, J. 1968. Determination de l'amylase par une microtechnique. *Ann. Biol. Cli.*, 26:133-142.
28. Miller, E. R., D. E. Ullrey and A. J. Lewis. 1991. *Swinw Nutrition*. Butterworth – Heinemann Press. USA.
29. Murray K R. Mayes A. P, Granner K. D., Rodwell W. V. 1997. *Bioquímica de Harper*, 14^a edición, Editorial Manuel Moderno, México D. F. , pág. 750 y 751.

30. Nabuurs MJA, Hoogendoorn A. 1993. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in the Netherlands. *Research Vet. Sci.*, 55:78.
31. NRC, National Research Council. 1998. *Nutrient Requirements of Swine*. National Academy Press. Tenth ed. USA.1998.
32. Nuñez Maria C. *et al*, 1996, Dietary Restriction Induces Biochemical and Morphometric Changes in the Small Intestine of Nursing Piglets, American Institute of Nutrition.
33. Owley W F, Orr D E, Tribble L F. 1986. Effects of age and diet on the development of the pancreas and synthesis and secretion of pancreatic enzymes in the young pig. *J. Anim. Sci.*, 63: 497.
34. Pierizynowski S G, Westrom B R, Erlanson – Albertsson C, Ahren B, Svendsen J, Karlsson B W.1993. Induction of exocrine pancreas maturation at Weaning in young developing pigs *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 16:287.
35. Pluske J. R. *et al*, 1995. Nutrition of the Neonatal Pig, In *The Neonatal Pig Development and Survival*, Edited Varley by M.A., CAB INTERNATIONAL.
36. Pottí D. 2002. Proteínas del Suero de Leche
<http://www.mundohelado.com/materiasprimas/proteinas-suero-leche.htm>
37. Radcliffe *et al*. 1998. *J. Anim. Sci.* 76: 1880-1886.
38. Rathelot J, J. R, Canioni P, Coeroll C, Sarsa L. 1975. Studies of the effect of the bile SALT and colipase onbenzymatic lipolysis. Improved method for the determination of pancreatic lipase and colipase. *Biochimie.*, 57,1117.
39. Reís de Souza T C y Mariscal L.G. 1997. El destete, la función digestiva y la digestibilidad de los alimentos en cerdos jóvenes. *Tec. Pec. Méx.*, 35:145.

40. Roppa L. 2002. Nutrición de los lechones en la fase del destete
<http://www.acontece.com.ar/0129.htm>
41. Salgado P. Et al, 2002, Comparative effects of different legume protein sources in weaned piglets: nutrient digestibility, intestinal morphology and digestive enzymes, *Anim. Feed sci. Tech* 91, 197-212.
42. Sánchez, B., G. Borbolla, E. Avila, G. Villar, G. Mariscal. 1997. Efecto del suero de leche liquido sobre los parametros productivos del lechon y el cerdo recientemente destetado. *Memorias del XXXII Congreso Nacional AMVEC. México.* p. 70.
43. Sánchez, B., A. De la Cruz., G. Villar, R. Mendoza, G. Mariscal and G. Bordolla. 1998. Effect of liquid whey and L-glutamine on the productive parameters and intestinal integrity of the piglet and early weaned pig. *J. Anim. Sci.* 81 (Suppl.):164 (Abstr.).
44. Séve B. 1986. Elévation et sevrage des porcelets. In: *le Porc et son élevage, bases scientifiques et techniques.* Editores: JM Pérez, Mornet P, y Rérat A. Editorial Maloine, France. p. 403.
45. Steel G.D. R. Torrie H. J. 1976. *Principles and Procedures of Statistics a Biometrical Approach,* International Student Edition.
46. Tarvid F., Cranwell, P. D., Ma L. And Vavala, R, 1994b ,The early postnatal development of protein digestion in pigs II. Small intestinal enzymes. In, Souffront, W. B. And Hagemester, H. (eds.) *Proceedings of the Vith Internation Symposium on Digestive Physiology in Pigs,* EEAP Publication, No. 80 Rostock, Germany pp. 181 – 184.
47. Tokach, M.D., J.L. Nelseen, G.L. Alleen. 1989. Effect of protein and (or) carbohydrate fractions of dried whey on performance and nutrients digestibility of early weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 67: 1307.

48. Weston B. R., Ohlmon B., Karlson B. W. 1987. Development of porcine pancreatic hydrolases and then isoenzymes from the foetal period to adult hood pancreas. 587-596.
49. Williams et al. 2001. Nutr. Res. Rev. 14: 207-227.
50. Wiseman, J. Pickard J. and Zarkabas L., 2001, Starch Digestion in Piglets, In The Weaner pig Nutrition and management, Edited by M.A. Varley and J. Wiseman, CABI Publishing.
51. Xu Cranwell. 1992. Comparative Biochemistry and Physiology, 101a: 177-182.

9. ANEXOS

ANEXO 1

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA ENZIMA AMILASA (EC 3.2.1.1)

La enzima fabricada por el páncreas para la digestión de los carbohidratos es la amilasa pancreática, que hidroliza los almidones, el glucógeno y la mayor parte de los carbohidratos restantes (salvo la celulosa) hasta formar disacáridos y algunos trisacáridos y glucosa.

Método basado en la hidrólisis del almidón por un líquido biológico, constituido por páncreas, mucosa intestinal o contenido intestinal, el almidón restante después de la hidrólisis se mide por colorimetría, con lo cual, a mayor contenido de almidón, nos indica una menor actividad de la amilasa y vis.

MATERIAL Y EQUIPO

- Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg
- Pipetas automáticas de 100 microlitros a 5 ml
- Matraces volumétricos de 10, 25, 50, 100 ml
- Matraz Erlenmeyer de 25 ml
- Potenciómetro
- Espectrofotómetro y cubetas
- Baño maría a 37° C
- Tubos de 10 ml con tapón
- Homogenizador (politrón)

REACTIVOS

- Agua destilada
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Fosfato monopotásico (KH_2PO_4)
- Fosfato disódico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$)
- Hidróxido de potasio (KOH)
- Ácido fosfórico (H_3PO_4)
- Ácido clorhídrico (HCl)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Almidón soluble.
- Ioduro de potasio (KI)
- Yodo en hojuelas (I_2)
- Solución buffer patrón pH = 7 y pH = 4

PROCEDIMIENTO

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución muestra

1. Pesar 1- 2 g de páncreas (dependiendo de la actividad) congelado a -20° C dentro de un matraz Erlenmeyer, diluir en aproximadamente 10 ml de suero fisiológico (9 g NaCl/l de agua destilada) y homogeneizar con el politrón durante 30 seg.
2. Colocar en un matraz volumétrico de 25 ml, esperar a que la espuma baje para aforar y completar con la solución de suero fisiológico.

Nota: Todas las muestras deberán ser preparadas en un baño de hielo hasta la determinación de la actividad enzimática.

Solución de Almidón al 0.5%

1. Preparación de buffer de fosfatos:
 - Pesar 40.8 g de KH_2PO_4 + 99.4 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, adicionar aprox 900 ml de agua destilada
 - Ajustar el pH a 7.15 con el ácido fosfórico y NaOH, completar a un litro. Checar nuevamente el pH.
2. Pesar 5 g de almidón soluble y disolver en un litro de buffer de fosfatos
3. Poner a ebullición exactamente por 3 min para su mejor conservación y checar el pH =7.15

NO REFRIGERAR

Solución de iodo

1. Solución madre: disolver 30 g de ioduro de potasio + 3 g de iodo en un litro de agua destilada.
2. Solución experimental: diluir la solución madre de 100 ml : 1000 ml con agua destilada

Solución 1 Normal de HCl

1. Diluir 82.9 ml de HCl en 1 lt de agua destilada. (HCl = 1.18 g/ml, 37.3 % de pureza)

DOSIFICACIÓN DE LA AMILASA

1. Agregar 2.4 ml de la solución de almidón (chechar el pH antes de usarlo) en tres tubos: R, T y To

R = Muestra problema

T = Blanco de muestra

To = Blanco de reactivos

2. Colocar el tubo R en baño maría

3. En el tubo M agregar 0.2 ml de solución muestra y dejar que proceda la hidrólisis del almidón exactamente durante 30 min. (Las muestras de páncreas deben estar diluidas 1 ml en 100 ml de agua, o en 50 ml según sea el caso) dos veces menos que la dilución de proteínas cuando se trata de mucosa no se diluye

4. 5 - 10 minutos antes de sacar los tubos R del proceso de hidrólisis, adicionar 2.4 ml de HCl 1 N a

los tubos T y To. Agregar 0.2 ml de NaCl 0.9% al BR (en lugar de la solución muestra por ser el blanco de reactivo) y 0.2 ml de solución muestra en el tubo T. Agitar y sacar rápidamente 0.1 ml de los tubos T y To, ajustar a 10 ml con solución de iodo, empleando un matraz volumétrico de 10 ml

5. Después de la hidrólisis agregar 2.4 ml de HCl 1 N al tubo M con la finalidad de tener la

actividad de la amilasa. Agitar y sacar rápidamente 0.1 ml y ajustar a 10 ml con la solución de yodo en un matraz volumétrico

6. Leer la densidad óptica de los tubos en un espectrofotómetro a 580 nm y utilizar la solución de yodo como blanco.

Nota: Si la lectura en el espectrofotómetro fuera muy baja, cercana a ceros (0.002, 0.001, 0.000), aumentar la concentración de la solución de almidón si fuera muy alta (coloración azul muy intenso) disminuir la concentración de almidón.

CALCULOS

$$UI = \frac{(T - R) \times 120 \times \text{dilución}}{T_o \times \text{peso}}$$

Donde:

T = D.O. del Blanco de muestra

R = D.O. de la Muestra problema

T_o = D.O. del Blanco de reactivos

DO = Densidad óptica

La unidad amilasa es la cantidad de amilasa contenida en 1 ml de líquido biológico y que hidroliza 1 mg de almidón soluble durante 30 min a 37 ° C. El valor promedio es de 607000 UI para un lechón de 6 días de edad.

Nota: Hacer la evaluación por triplicado

ANEXO 2

DETERMINACIÓN DE LA ENZIMA LIPASA (EC 3.1.1.3)

La lipasa pancreática es la principal enzima para la digestión de las grasas, capaz de hidrolizarlas grasas neutras (triglicéridos) hasta ácidos grasos y monoglicéridos. Esta enzima es de vital importancia, ya que las grasas más abundantes de las dietas son los triglicéridos.

La cuantificación de la actividad enzimática es realizada por potenciometría a $\text{pH} = 9$ por la hidrólisis de un sustrato sintético, el aceite de olivo, en emulsión dentro de la goma arábica en presencia de sales biliares. A $\text{pH} = 9$ los ácidos grasos hidrolizados o libres son neutralizados con el NaOH 0.1 N a medida que va sucediendo la reacción para mantener constante el $\text{pH} = 9$. La pendiente de la curva corresponde a la velocidad de reacción de la hidrólisis enzimática sobre el sustrato.

MATERIAL Y EQUIPO

- Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg
- Balanza de precisión de 0.001 g a 0.0001 g
- Vasos de precipitado de 30 ml
- Pipetas automáticas de 100 microlitros a 5 ml
- Matraces volumétricos de 25 ml; 1 y 2 l
- Titulador automático (pH-stat) Metrohm
- Homogeneizador (Politrón)

REACTIVOS

- Agua destilada pura
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Cloruro de calcio (CaCl_2)
- Ácido fosfórico (H_3PO_4)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Aceite de olivo
- Goma arábica
- Ácido taurocólico, Sigma T.0750 ($\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{NO}_7\text{SNa}$)
- Soluciones buffer $\text{pH} = 7$ y $\text{pH} = 4$

PROCEDIMIENTO

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución muestra

1. Pesar 1- 2 g de páncreas (dependiendo de la actividad) congelado a -20°C dentro de un matraz Erlénmeyer, diluir en aproximadamente 10 ml de suero fisiológico (9 g NaCl /l de agua destilada) y homogeneizar con el politrón durante 30 seg.
2. Colocar en un matraz volumétrico de 25 ml, esperar a que la espuma baje para aforar y

completar con la solución de suero fisiológico.

Nota: Todas las muestras deberán ser preparadas en un baño de hielo hasta la determinación de la actividad enzimática.

Solución Activadora

1. Pesar 2.8 g de CaCl_2 + 8.7 g de NaCl y completar en un matraz volumétrico hasta un litro con agua destilada (Este volumen alcanza para 200 determinaciones).

Emulsión 1

1. Pesar 36 g de goma arábica

2. Disolverla en 360 ml de agua destilada muy caliente, dejar enfriar (puede disolverse empleando una licuadora).

3. Añadir lentamente 45 ml de aceite de olivo y mezclar en la licuadora durante 5 min. dejar enfriar (Este volumen alcanza para 80 determinaciones).

Emulsión 2

1. Pesar 36 g de goma arábica

2. Disolverla en 360 ml de agua destilada muy caliente, dejar enfriar (puede disolverse empleando una licuadora).

Solución de Sales Biliares

1. Pesar 5 g de ácido taurocólico

2. Disolverlo en 100 ml de agua destilada (este volumen alcanza para 100 determinaciones).

DOSIFICACIÓN DE LA LIPASA

1. La cuantificación se hace por titulación automática con un aparato pH-stat Metrohm

2. Ajustar el aparato antes de comenzar la dosificación con las soluciones buffer de $\text{pH} = 7$ y 4.

3. En vasos de precipitado de 30 ml adicionar sucesivamente:

- 5 ml de emulsión 1 (para muestra problema) y 5 ml emulsión 2 (para el blanco de la muestra)

- 5 ml de activador

- 5 ml de agua

- 1 ml de sales biliares (+ colipasa entre 0.1 y 0.3 ml.), la adición de colipasa no es necesaria.

- Ajustar los reactivos a $\text{pH} = 9$ empleando NaOH/N/10 (0.1 N) ó HCl diluido

- Añadir de 0.2 ml a 2 ml de la solución muestra (en relación a la actividad de la lipasa en la

muestra, a mayor actividad menor tamaño de la muestra y vis).

Al momento de adicionar la solución muestra debe de activarse el pH - stat y el cronómetro.

4. Registrar los min (si se registró el tiempo en min y seg, reportar todo a min: $\text{seg}/60 = \text{min}$) y los ml de NaOH 0.1 N gastado al terminar la hidrólisis de los ácidos grasos.

Para cada muestra, realizar un blanco de muestra, siguiendo el mismo procedimiento que para las muestras problema, solo que en vez de adicionar la emulsión 1, se emplea la emulsión 2 (sin el sustrato = aceite de oliva)

CÁLCULOS

$$\text{Actividad de la lipasa (UI)} = \frac{N \times 1000 (A - B) \times 25}{C (E - F) \times M}$$

Donde:

UI = Micromoles de ácidos grasos libres por minuto por gramo de muestra de páncreas

N = Normalidad del NaOH empleado en la titulación

1000 = factor de conversión a micromoles

A = ml gastados de NaOH de la muestra = ml gastados en la titulación de ácidos grasos hidrolizados o libres

B = ml gastados de NaOH del blanco de muestra = ml gastados en la titulación de ácidos grasos presentes en la muestra antes de la hidrólisis

25 = dilución de 1 g de páncreas en 25 ml de suero fisiológico

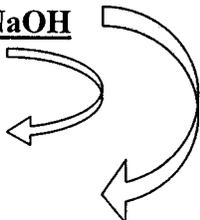
C = ml de solución muestra = ml adicionados para llevar a cabo la hidrólisis de los ácidos grasos del aceite de olivo, los ml varía de 0.2 a 2 ml (o mas si así se requiere)

E = Min de la muestra = min empleados para llevarse a cabo la hidrólisis y la neutralización de los ácidos grasos

F = Min del blanco de muestra = min empleados para neutralizar los ácidos grasos presentes en la muestra antes de la hidrólisis

M = g muestra = g de muestra de páncreas iniciales

DESPEJE GENERAL

$$\frac{M \text{ NaOH} \times 1 \times 10^6 \text{ ml}}{\text{ml de muestra}} \times \frac{\text{ml de NaOH}}{\text{min}} = \frac{M \text{ NaOH} \times 1 \times 10^6 \text{ ml} \times \text{ml NaOH}}{\text{ml muestra por minuto}} \times \frac{1000 \text{ ml} \times \text{g de muestra}}{25 \text{ ml}}$$

$$= \frac{\text{mol NaOH} \times 1 \times 10^6 \text{ ml} \times \text{ml NaOH} \times 25}{\text{ml muestra} \times \text{min} \times 1000 \text{ ml} \times \text{g de muestra}}$$

El valor promedio de la actividad de la lipasa para el páncreas de lechones de 56 días es de 500 UI

Nota: Hacer la evaluación por triplicado

ANEXO 3

DETERMINACIÓN DE LA ENZIMA LACTASA (EC 3.2.1.23.62)

La lactasa es una enzima que degrada disacáridos (lactosa) a monosacáridos (sacarosa, maltasa y la isomaltasa). Se encuentra en las membranas de los bordes en cepillo de las microvellosidades de los enterocitos del intestino delgado, junto con tres enzimas: sacarosa, maltasa, y alfadextrinasa.

Para la evaluación de la actividad de la lactasa se hace reaccionar sobre un sustrato de lactosa a 37° C por 1 h, se mide cuantitativamente por colorimetría, mediante la determinación del producto de la hidrólisis: la glucosa.



MATERIAL Y EQUIPO

- Balanza analítica con sensibilidad de 0.1 mg
- Matraces Erlenmeyer de 25 ml
- Pipetas automáticas de 100 microlitros a 5 ml
- Potenciómetro
- Centrífuga
- Baño maría a 37° C
- Tubos de 10 ml con tapón.
- Homogeneizador (Politrón)
- Vasos de precipitado de 30 ml
- Matraces volumétricos de 25 ml

REACTIVOS

- Agua destilada pura
- Cloruro de sodio (NaCl)
- Ácido fosfórico (H₃PO₄)
- Ácido tricloroacético (TCA) (Cl₃CO₂H)
- Hidróxido de sodio (NaOH)
- Ácido maléico ó anhídrido maléico (C₄H₄O₄) Fluka 63180
- Solución buffer pH =7, pH =4
- Kit de glucosa
- Lactosa pura (C₁₂H₂₂O₁₁)

PROCEDIMIENTO

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Solución muestra

1. Pesar 1- 2 g de páncreas (dependiendo de la actividad) congelado a -20° C dentro de un

matraz Erlenmeyer, diluir en aproximadamente 10 ml de suero fisiológico (9 g NaCl/l de agua destilada) y homogeneizar con el politrón durante 30 seg.

2. Colocar en un matraz volumétrico de 25 ml, esperar a que la espuma baje para aforar y completar con una solución de suero fisiológico.

Nota: Todas las muestras deberán ser preparadas en un baño de hielo hasta la determinación de la actividad enzimática.

Solución A de Buffer de Maleato

1. Pesar 19.6 g de anhídrido maléico o 23 g de ácido maléico + 8g de hidróxido de sodio.

2. Aforar a 1 l con agua destilada

Solución B de NaOH 0.2 M

1. Pesar 8g de NaOH y completar a un l con agua pura en un matraz .

Solución Buffer de Lactosa pH =6

1. Mezclar 50 ml de solución A + 26.9 de solución B + 4 g de lactosa

2. Adicionar aprox 100 ml de agua destilada

3. Ajustar a pH = 6 con KOH o H₃PO₄

4. Completar a 200 ml en un matraz con agua pura

Ácido tricloroacético (TCA) al 5 %. Pesar 5 g de TCA y completar a 100 ml con agua destilada, checar el pH = 6

DOSIFICACIÓN DE LA LACTASA

(En 3 matraces; Blanco reactivo, Blanco muestra, muestra problema)

• Matraces 1 y 2: Muestra problema (1) y blanco reactivo (2)

1. En tubos con tapa adicionar 5 ml de solución buffer de lactosa pH = 6 (checar el pH antes de usarlo) + 1 ml de solución muestra (1) o 1 ml de suero fisiológico (2)

2. Colocar en baño maría a 38° C por 1 h, luego de este tiempo detener la reacción agregando 1 ml de TCA al 5 %

3. Vaciar el contenido en vasos de precipitado de 30 ml para neutralizar el pH con la solución de NaOH 0.2 N (blancos con 13 ml y muestra con 10 ml) y completar a 25 ml en matraces volumétricos con agua destilada.

4. Centrifugar o filtrar y tomar una alícuota para la medición de glucosa con el Kit.

• Matraz 3: Blanco de muestra

1. Agregar 5 ml de solución buffer de lactosa pH = 6 + 1ml de TCA + 1 ml de solución muestra

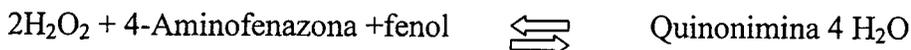
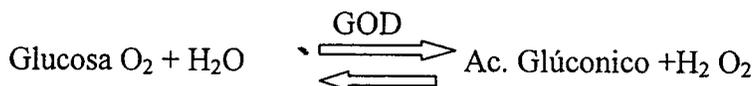
2. Colocar en baño maría a 38° C por 1 h

3. Neutralizar a pH =7 con aprox 13 ml de la solución de NaOH 0.2 N, completar a 25 ml con agua destilada.

4. Centrifugar ó filtrar y tomar una alícuota para la medición de glucosa con el kit.

Determinación de Glucosa (GOP-PAD)

La glucosa es oxidada por glucosa oxidasa (GOD) liberando peróxido de hidrógeno, éste reacciona con fenol y 4-aminofenaza en presencia de peroxidasa (POD), dando un color rojo violeta de antipiriliquinona en cantidad proporcional a la glucosa presente en la muestra.



Material de la muestra

El filtrado o centrifugado (suero o plasma obtenidos dentro de los 30 min después de haber extraído la sangre). En estas condiciones, la glucosa es estable durante 24 h. Conservando las muestras en refrigeración, entre +2° C y 8° C. En cada serie se requiere 1 blanco y 1 ó 2 patrones

Pipetear en tubos de ensayo	Macrotécnicas			Semimicrotécnica		
	Problema blanco	patrón		Problema blanco	patrón	
Filtrado o centrifugado (suero o plasma)	20 µl	----	---	10 µl	-----	--
Sol. Patrón	-----	20 µl	---	-----	10 µl	--
Reacción de color	-			-		
	2.0 ml		2.0 ml	1.0 ml		1.0 ml
	2.0 ml			1.0ml		

Mezclar bien, incubar a 25° C durante 30 min o bien a 37° C durante 10 min. Leer la extinción (D.O.) de los problemas (pr) y los patrones (p) contra el blanco de reactivos a 546 nm. El color es estable durante 60 min.

Cálculo

$$\text{Concentración de glucosa} = \frac{E_{pr}}{E_p} \times 100 \text{ mg/dl}$$

Descripción de lectura: Medición de glucosa en parámetro normal 75 -115 mg/dl

CALCULOS PARA LA ACTIVIDAD DE LA LACTASA

UI =micromol de sustrato hidrolizado /minuto

$$UI = \frac{(\text{g de glucosa en } 60') \times \text{la dilución}}{60' \times 180 \times \text{peso muestra}}$$

$$*\text{g glucosa en } 60' = \frac{DO \text{ muestra problema} \times 25}{DO \text{ patrón} \times 1000}$$

$$UI = \frac{DO \text{ muestra problema} \times \text{dilución}^* \times 25}{DO \text{ patrón} \times 60 \times 1.8 \times \text{peso muestra}}$$

Valores de 500 - 7500 UI en lechones de 0 - 9 semanas de edad.