

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Estación Experimental del Zaidín (EEZ) Departamento de

Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal (INAN) y

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Farmacia

Departamento de Fisiología

Estudio del perfil metabólico de las razas Ibérica y Landrace a nivel hepático y vísceras que drenan al sistema porta

Study of the metabolic profile of Iberian and Landrace pig breeds in liver and portal-drained viscera

PROGRAMA DE DOCTORADO INTERUNIVERSITARIO “NUTRICIÓN HUMANA”



LUCRECIA GONZÁLEZ VALERO

GRANADA, 2015

Editorial: Universidad de Granada. Tesis Doctorales

Autora: Lucrecia González Valero

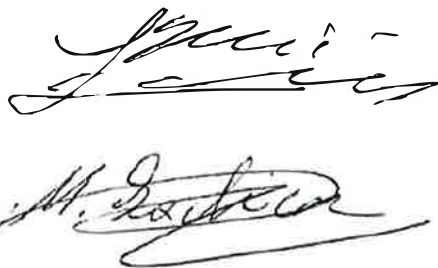
ISBN: 978-84-9125-093-7

URI: <http://hdl.handle.net/10481/40119>

El doctorando Lucrecia González Valero y los directores de la tesis Ignacio Fernández-Fígares Ibáñez y Manuel Lachica López. Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, a 7 de enero de 2015

Director/es de la Tesis



Doctorando



Fdo.: Ignacio Fernández-Fígares Ibáñez

Fdo.: Lucrecia González Valero

Manuel Lachica López

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de contenidos.....	1
Índice de tablas	3
Índice de figuras	5
Lista de abreviaciones.....	7
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN, PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	9
CAPÍTULO 2: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. El cerdo Ibérico: definición, origen y evolución	15
2.2. Caracterización metabólica del cerdo Ibérico	18
2.3. Tejidos esplácnicos	23
2.3.1. Vísceras que drenan al sistema porta (VDP)	24
2.3.1.1. Flujo neto portal de aminoácidos	26
2.3.1.2. Factores que afectan al flujo neto de aminoácidos en las VDP	33
2.3.1.3. Contribución de las VDP al gasto energético total	37
2.3.1.4. Medida del metabolismo de las VDP: método de la diferencia arterio-venosa	39
2.3.1.5. Gasto energético total	44
2.3.2. Cultivo <i>in vitro</i> de hepatocitos.....	50
2.3.2.1. Tipos celulares del hígado	50
2.3.2.2. Organización estructural del tejido hepático	51
2.3.2.3. Evolución de la técnica de aislamiento de hepatocitos	54
2.3.2.4. Aislamiento de células hepáticas y obtención de suspensiones celulares.....	56
2.3.2.5. Cultivo primario de hepatocitos.....	57
2.3.2.6. Procesos metabólicos hepáticos estudiados	59
2.3.2.6.1. Gluconeogénesis y degradación de glucógeno	60
2.3.2.6.2. Síntesis de triglicéridos.....	60
2.3.2.6.3. Síntesis de β -hidroxibutirato	60
2.3.2.6.4. Síntesis de albúmina	65
2.3.2.6.5. Síntesis de urea.....	66
2.3.2.6.6. Síntesis de factor de crecimiento insulínico tipo I (IGF-I).....	67
2.4. Referencias bibliográficas	68
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA	89
3.1. Experimentos <i>in vivo</i>	91
3.1.1. Animales y dietas	91
3.1.2. Toma de muestra y procedimientos experimentales	93
3.1.2.1. Concentración de para-aminohipúrico.....	94
3.1.2.2. Concentración de aminoácidos	95
3.1.2.3. Flujo sanguíneo de un órgano o tejido	96

3.1.2.4. Flujo neto portal de aminoácidos.....	96
3.1.2.5. Concentración de O ₂	97
3.1.2.6. Consumo de O ₂ y producción de calor de las VDP.....	97
3.1.2.7. Producción de calor total.....	98
3.2. Experimentos <i>in vitro</i>	100
3.2.1. Aislamiento de hepatocitos.....	100
3.2.2. Cultivo primario de hepatocitos.....	102
3.2.3. Cálculo de parámetros.....	103
3.2.3.1. Proteína.....	103
3.2.3.2. Gluconeogénesis.....	104
3.2.3.3. Degradación de glucógeno.....	106
3.2.3.4. Triglicéridos y esterificación de ácidos grasos.....	106
3.2.3.5. Urea.....	108
3.2.3.6. Albúmina.....	108
3.2.3.7. β-hidroxibutirato.....	109
3.2.3.8. IGF-I.....	110
3.3. Referencias bibliográficas.....	111
CAPÍTULO 4: PRUEBAS EXPERIMENTALES.....	115
4.1. Prueba 1. Differences in portal appearance of lysine and methionine in Iberian and Landrace pigs.....	117
4.2. Prueba 2. Contribution of portal-drained viscera to heat production in Iberian gilts fed a high protein diet: comparison to Landrace.....	125
4.3. Prueba 3. Metabolic differences in hepatocytes of obese and lean pigs.....	141
CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN GENERAL.....	151
5.1. Diferencias en la aparición neta portal de lisina y metionina en Ibérico y Landrace.....	153
5.2. Contribución de las VDP a la producción de calor total en la raza ibérica y Landrace.....	158
5.3. Diferencias en el metabolismo hepático de cerdos obesos y magros.....	166
5.4. Referencias bibliográficas.....	178
CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS.....	193
6.1. Conclusiones.....	195
6.2. Conclusions.....	197
CAPÍTULO 7: RESUMEN/SUMMARY.....	199
7.1. Resumen.....	201
7.2. Summary.....	205

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 3:

Tabla 3.1: Composición (g/kg) y análisis químico (materia seca) de las dietas.....	92
---	----

CAPÍTULO 4:

Prueba 4.1:

Table 1: Arterial and portal concentrations ($\mu\text{mol/L}$) and net portal appearance (NPA; $\mu\text{mol/min}$) of Lys and Met and portal blood flow (PBF; mL/min) in Iberian and Landrace pigs receiving either low CP (LCP; 13% CP) or high CP (HCP; 16% CP) diets	122
---	-----

Prueba 4.2:

Table 1: Composition (g kg^{-1}) and chemical analysis (dry matter basis) of diet	138
Table 2: Portal-drained viscera heat production, total heat production and respiratory quotient of Iberian ($n=6$) and Landrace gilts ($n=6$) fed 0.25 of their daily ration (values are mean \pm SEM for ten postprandial measurements)	139

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 2:

Figura 2.1: Troncos porcinos primitivos	16
Figura 2.2: Área tradicional del cerdo Ibérico.....	17
Figura 2.3: Proporciones relativas en que proteína y grasa se depositan durante la fase de crecimiento-cebo (50-100 kg de peso vivo) en cerdo Ibérico y Large White	18
Figura 2.4: Vísceras que drenan al sistema porta	26
Figura 2.5: Fotografía del muestreo sanguíneo en un cerdo Landrace según el método de la diferencia arterio-venosa.....	40
Figura 2.6: Fotografía de la infusión de para-aminohipúrico.....	41
Figura 2.7: Sección de lobulillo hepático.....	52
Figura 2.8: Acino hepático.....	53
Figura 2.9: Fotografía de lóbulo hepático canulado (EEZ, CSIC).....	57
Figura 2.10: Síntesis de cetonas.....	62
Figura 2.11: Catabolismo de las cetonas.....	63
Figura 2.12: Activación y entrada en la mitocondria de los ácidos grasos	65

CAPÍTULO 3:

Figura 3.1: Fotografía de placa de cultivo de hepatocitos porcinos tomada con el objetivo 10X	103
Figura 3.2: Método Lowry	104
Figura 3.3: Método GOD-POD	105
Figura 3.4: Método GPO-POD	107
Figura 3.5: Método α -ftalaldehído 37°C	108
Figura 3.6: Oxidación del β -hidroxibutirato a acetoacetato.....	110

CAPÍTULO 4:

Prueba 4.3:

Figure 1: Effect of breed (Landrace or Iberian) on gluconeogenesis (a) and glycogen degradation (b) in porcine hepatocytes. For gluconeogenesis cells depleted of glycogen were cultured in the presence of amino acids, lactate and pyruvate and a low insulin (0.173 nM)/glucagon (28.7 nM) ratio for 2 h and glucose measured in the media. For glycogen degradation, hepatocytes loaded with glycogen were cultured for 3 h in glucose free media supplemented with glucagon (2.87 nM) and cells harvested for glycogen determination. Data are least square means and S.E.M. for duplicate cultures from 8 (Landrace) or 10 (Iberian) pigs. Means with different letters differ, (P<0.05)	146
Figure 2: Influence of breed (Landrace or Iberian) and substrate (basal, CLA or linoleic acid (LA)) on triglyceride (TG) content (a) and fatty acid estimated esterification (b) in porcine hepatocytes. Hepatocytes were cultured for 96 h in a medium with high insulin (17.3 nM)/glucagon (0.287 nM) ratio supplemented or not (basal) with CLA (0.2 mM) or LA	

(0.2 mM). Data are least square means and S.E.M. for duplicate cultures from 8 (Landrace) or 10 (Iberian) pigs. Means with different letters differ, ($0.1 < P < 0.05$).147

Figure 3: Influence of breed (Landrace or Iberian) and insulin/glucagon (I/G) ratio on β -hydroxybutyrate (BHB; nmol/mg protein per 24 h; a) and albumin ($\mu\text{g}/100\mu\text{g}$ protein per 24 h; b) synthesis. For BHB synthesis, cells were cultured for 48 h in a medium with high insulin (17.3 nM)/glucagon (0.287 nM) or low insulin (0.173 nM)/glucagon (28.7 nM) ratio and media collected at the end. For albumin synthesis, hepatocytes were cultured for 24 h in a medium with high I/G ratio, shifted to a bovine serum albumin (BSA) free medium with high or low I/G ratio and media collected. No significant interactions were found between factors. Data are least square means and S.E.M. for duplicate cultures from 8 (Landrace) or 10 (Iberian) pigs. Means with different letters differ, ($P < 0.05$).147

Figure 4: Influence of breed (Landrace or Iberian) and media ammonia concentration (0, 2.5, 5 and 10 mM) on media urea concentration (a) and estimated urea synthesis (b) after 3 h of cultivation. Hepatocytes were cultured for 24 h in medium with high insulin (17.3 nM)/glucagon (0.287 nM) ratio and shifted the same medium with different concentrations of ammonia for 3 h. No significant interactions were found between factors. Data are least square means and S.E.M. for duplicate cultures from 8 (Landrace) or 10 (Iberian) pigs. Means with different letters differ, ($P < 0.05$).148

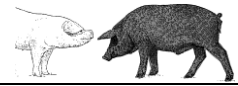
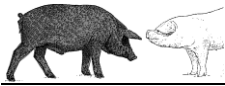
LISTA DE ABREVIACIONES

¹²⁵ I	Yodo-125
4-AF	4-aminofenazona
5-HT ₄	5-hidroxitriptamina
AA	Aminoácido
AAE	Aminoácido esencial
AC	Arteria carótida
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina-5-difosfato
AG	Ácido graso
ANP	Aparición neta portal
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
ATP	Adenosin-trifosfato
B ₁₂	Vitamina B ₁₂
BHB	<i>β-Hydroxybutyrate</i>
BSA	Albúmina de suero bovino
C _a	Concentración arterial
CH ₄	Metano
C _{inf}	Concentración del PAH en la solución infundida
CLA	Ácido linoleico conjugado
CO ₂	Dióxido de carbono
CP	<i>Crude protein</i>
CPT-I	Carnitina palmitoiltransferasa I
C _v	Concentración venosa
DAP	Dihidroxiacetona fosfato
DM	<i>Dry matter</i>
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(β- aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetracético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EM	Energía metabolizable
FH ₄	Ácido tetrahidrofólico
FN<	Flujo neto portal
FS	Flujo sanguíneo
FSP	Flujo sanguíneo portal
g	Fuerza de la gravedad
G3P	Glicerol-3-fosfato
GH	Hormona del crecimiento
GK	Glicerol quinasa
GLDH	Glutamato deshidrogenasa
GNG	Gluconeogénesis
GPO	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
h	<i>Hour</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
Hb	Hemoglobina
HCP	<i>High content protein</i>
HMG-CoA	3-Hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
HP	<i>High protein</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IGFBP	Proteínas transportadoras de IGF-I
IGF-I	Factor de crecimiento insulínico tipo I
IRMA	<i>Immunoradiometric assay</i>
kg	Kilogramo
kJ	Kilojulio
LA	Ácido linoleico
LCP	<i>Low content protein</i>
Ld	Landrace
LP	<i>Low protein</i>
LPL	Lipoproteinlipasa

Lw	<i>Large White</i>
min	Minuto
MJ	Megajulio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
MF	Materia fresca
MS	Materia seca
N	Nitrógeno
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
O₂	Oxígeno
°C	Grados centígrados
PAH	Para-aminohipúrico
PAH_a	Concentración de PAH en la sangre arterial
PAH_v	Concentración de PAH en sangre venosa
PB	Proteína bruta
PC	Producción de calor
PDV	<i>Portal-drained viscera</i>
PDVHP	<i>Portal-drained viscera heat production</i>
PITC	Fenilisotiocianato
PLP	Piridoxal-fosfato
P_{max}	Máxima retención diaria de proteína
POD	Peroxidasa
PV	Peso vivo
r.p.m	Revoluciones por minuto
R_{inf}	Tasa de infusión
SAH	S-adenosil-homocisteína
SAM	S-adenosil-metionina
s	Segundo
TEA	Trietilamina
TG	Triglicéridos
UV/VIS	Ultravioleta/visible
V	Voltio
VDP	Vísceras que drenan al sistema porta
vs.	<i>Versus</i>
β-HBD	β-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa
μl	Microlitro

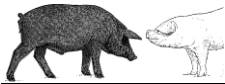
CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN, PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS



El genotipo Ibérico destaca por su singularidad dentro de las razas autóctonas españolas. Sin duda, tanto su morfología como su fisiología deben atribuirse a cambios inducidos a lo largo de los siglos por su continua adaptación a las condiciones de clima y manejo que se dan en las zonas adeshadas de la península Ibérica (Alves y col., 2003).

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es contribuir a la caracterización metabólica del cerdo Ibérico estudiando el metabolismo de nutrientes a nivel orgánico y celular. Para ello, comparamos esta raza con un genotipo magro de crecimiento rápido como es el cerdo Landrace. En nuestro grupo de investigación se ha trabajado mucho en dicha caracterización, ya que pocos trabajos científicos en relación a su fisiología y nutrición se habían realizado. Se han estudiado las necesidades nutritivas en las distintas etapas de crecimiento (especialmente de proteína y energía), retención de proteína y energía en las distintas fases de crecimiento, las interacciones entre la proteína de la dieta y la retención de calcio (Ca^{2+}) y fósforo, la capacidad de ingesta, la digestibilidad de cereales y de recursos de la dehesa, el coste energético de la locomoción, el efecto de la lactancia intermitente en el lechón, la composición de la leche y su uso por el lechón, la capacidad de síntesis de proteína a nivel corporal total y muscular, la incorporación de lisina microbiana a la proteína corporal, el perfil bioquímico y hormonal y los efectos de modificadores metabólicos en el crecimiento y los cortes de la canal. La presente Tesis Doctoral ha querido ayudar a completar este cuadro estudiando cómo afectan las vísceras que drenan a la vena porta (VDP) y el hígado a las diferencias entre cerdos Ibéricos y Landrace.



Por el mayor peso relativo de las vísceras de los cerdos Ibéricos respecto a los Landrace y la elevada tasa metabólica de estos tejidos, se pensó que parte de la ineficiencia, energéticamente hablando, de los primeros podría ser debida al mayor peso relativo de sus vísceras. Igualmente, existía la posibilidad de que hubiera un uso preferencial de aminoácidos limitantes por parte de las VDP que comprometiera el suministro de los mismos a los tejidos de interés económico. Para abordar estas facetas fue necesario poner a punto técnicas quirúrgicas que permitieran el implante de catéteres de forma permanente en las venas porta e ileal y en la arteria carótida. Por último, cabe la posibilidad de que, animales metabólicamente muy distintos, mantengan esas diferencias a nivel hepático e incluso que diferencias a nivel hepático puedan explicar las existentes en el animal completo. Como es difícil aislar el hígado del resto del animal para su estudio, hemos recurrido a la técnica del cultivo primario de hepatocitos, que permite estudiar rutas metabólicas concretas sin la interferencia de otros órganos o el perfil bioquímico y hormonal cambiante.

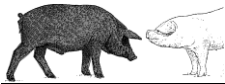
Para lograr este objetivo general se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1- Evaluar el impacto de las VDP en el consumo de energía del animal en ambas razas. Nuestra hipótesis inicial era que las vísceras en el Ibérico, por su mayor peso relativo, tendrían una mayor contribución al gasto energético total que en las razas mejoradas, explicando así en parte su menor eficiencia energética para el crecimiento.

2- Estimar la capacidad de absorción de aminoácidos y de la utilización de los mismos por las VDP de cerdos Ibéricos y Landrace, para determinar si existe un uso preferencial que ayude a explicar las diferencias previamente observadas en ritmo de crecimiento o en deposición de proteína.

3- Determinar la existencia de diferencias bioquímicas en el metabolismo hepático de ambas razas con el fin de explicar los diferentes perfiles metabólicos observados *in vivo*.

CAPÍTULO 2
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

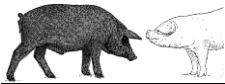


2.1. EL CERDO IBÉRICO: DEFINICIÓN, ORIGEN Y EVOLUCIÓN

Siempre ha existido gran controversia a la hora de definir o clasificar zootécnicamente al conjunto de poblaciones que podríamos denominar como cerdo Ibérico. En algunas ocasiones dichas poblaciones han sido definidas como una sola *raza porcina Ibérica* y en otras como *tronco Ibérico*. Nosotros preferimos la definición de la Asociación Española de Criadores de Ganado Porcino Selecto Ibérico Puro y Tronco Ibérico (AECERIBER), que considera al cerdo Ibérico puro como una agrupación racial que debe desligarse del término “tronco” para evitar inducir a error, ya que podría interpretarse como sinónimo de cruzamiento con otras razas. Por otro lado, el uso del término “raza” para denominar a esta agrupación racial puede resultar inadecuado al no definir correctamente a este grupo de individuos.

La denominación de cerdo Ibérico engloba una serie de variedades, estirpes y líneas, con diferencias tanto genotípicas como fenotípicas. A pesar de esta heterogeneidad interna, todas guardan semejanza en sus principales caracteres morfo-funcionales (Clemente y col., 2006). En general, se caracterizan por presentar un perfil subcóncavo, una configuración del hueso lagrimal intermedio y unas proporciones cefálicas también intermedias entre los cerdos asiáticos y célticos actuales (Laguna Sanz, 1998).

Generalmente, los zootecnistas clásicos han mantenido que las razas porcinas actuales tienen su origen principalmente en tres de los cuatro troncos porcinos primitivos que se admiten (figura 2.1). Sin embargo, estudios filogenéticos realizados con ADN mitocondrial (Larson, 2005) invitan a pensar que el origen de las razas actuales de cerdo estaría en un jabalí primitivo asiático que se habría extendido desde su zona de origen a Eurasia, dividiéndose en dos poblaciones primitivas



fundamentales, la de suidos asiáticos y la de suidos europeos, y de ésta última habrían derivado a su vez los cerdos célticos y los cerdos mediterráneos (de los que se originaría el cerdo Ibérico). Según Alves y col. (2003) la divergencia entre razas asiáticas y europeas habría ocurrido hace 600.000 años.

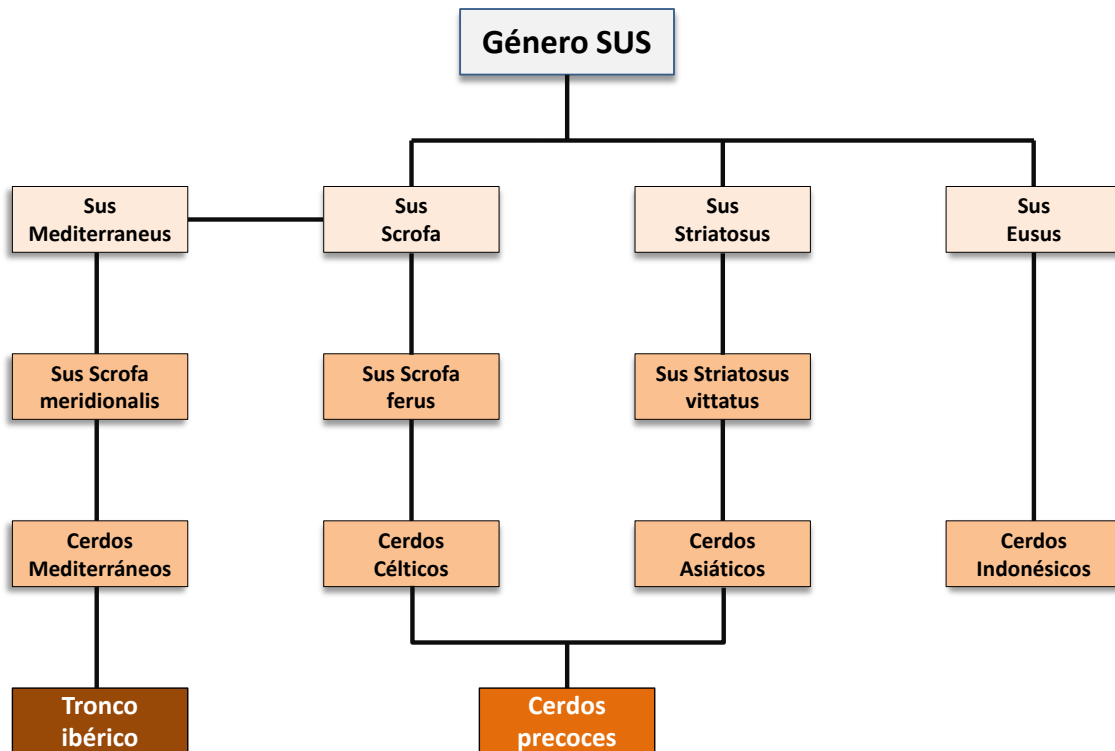
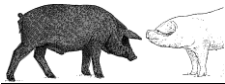


Figura 2.1: Troncos porcinos primitivos (Clemente y col., 2006)

El inicio de la domesticación del cerdo es un tema discutido. Recientemente, el empleo de herramientas genéticas (Larson y col., 2007a; Megens y col., 2008) ha favorecido en gran medida el desarrollo de este campo que hasta hace relativamente poco tiempo se basaba únicamente en la información proporcionada por las tradicionales herramientas arqueológicas (Jing y Flad, 2002; Dobney y Larson, 2006; Zeder y col., 2006). Estos estudios confirman las hipótesis ya establecidas relativas a la domesticación independiente de cerdos salvajes primitivos de origen europeo y asiático. Si bien distintas pruebas arqueológicas datan las primeras evidencias de cerdos domesticados en el Viejo Mundo en Turquía hace

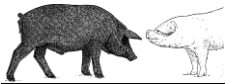


10.500 años (Larson y col., 2007b) y al norte y sur de China hace 10.000 años (Jing y Flad, 2002; Juzhong, 2008), aún continua siendo desconocido el grado de independencia o conexión de los cerdos domesticados de cada región (Larson y col., 2010).

Prehistóricamente el *Sus mediterraneus* existía en los 3 continentes que rodean este mar, pero adquirió una mayor relevancia en Grecia, Italia, costa noroccidental africana (donde aún es posible encontrarlo en estado salvaje) y en las islas del Mediterráneo. El *Sus mediterraneus*, será también precursor de algunas razas italianas, francesas y húngaras (Clemente y col., 2006; AECERIBER, 2007). El porcino Ibérico derivaría pues del cerdo de tipo mediterráneo que, con origen en el *Sus mediterraneus* (figura 2.1), alcanzó la península asentándose en las zonas de bosque mediterráneo (caracterizado por las especies arbóreas del género *Quercus*) con el que establece una estrecha relación casi simbiótica (figura 2.2) que en gran medida determina su diferenciación a cerdo Ibérico.



Figura 2.2: Área tradicional del cerdo Ibérico (Clemente y col., 2006)



2.2. CARACTERIZACIÓN METABÓLICA DEL CERDO IBÉRICO

Al comparar el cerdo Ibérico con razas mejoradas, altamente seleccionadas para alcanzar elevados ritmos de crecimiento, encontramos que en el Ibérico la deposición de proteína es menor y la deposición de grasa mucho más elevada (figura 2.3), caracterizándose metabólicamente por tener un marcado perfil lipogénico y un ritmo de crecimiento lento, definidos por su genotipo.

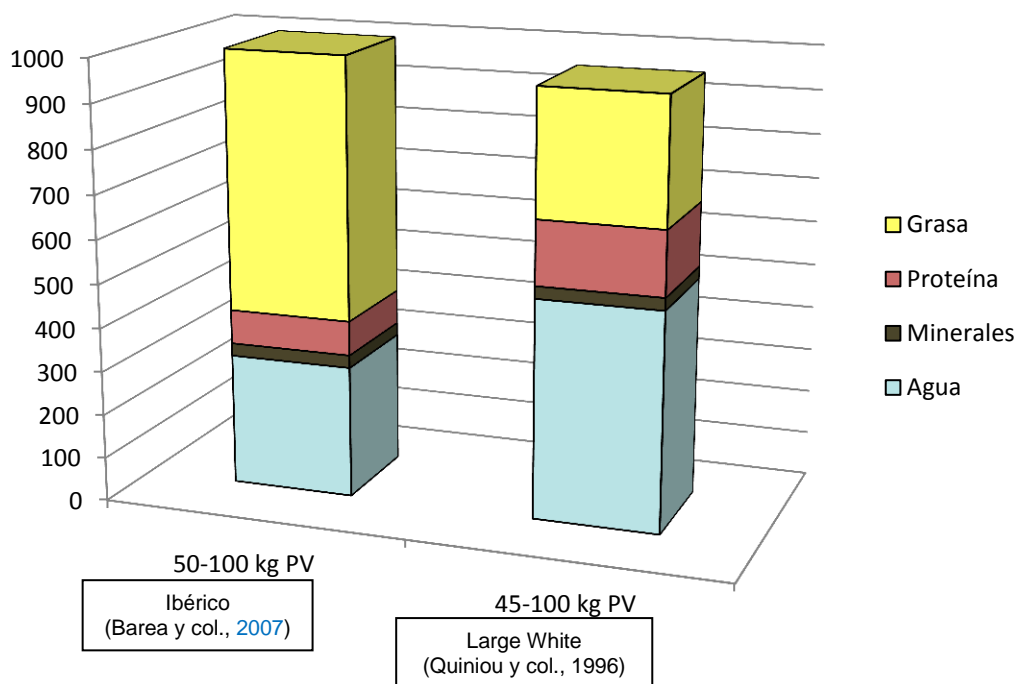
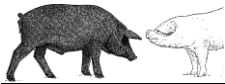


Figura 2.3: Proporciones relativas en que proteína y grasa se depositan durante la fase de crecimiento-cebo (50-100 kg de peso vivo) en cerdo Ibérico y Large White (Aguilera y Nieto, 2012).

En cerdas de las razas Ibérica y Landrace de aproximadamente 25 kg peso vivo (PV) se ensayaron dos dietas cuyo contenido en proteína (formulada según el concepto de proteína ideal) fue, respectivamente, 120 y 160 g/kg. En las cerdas Ibéricas la retención de nitrógeno fue significativamente inferior, particularmente con la ración de mayor contenido en proteína, cuyo consumo condujo en esta raza a una



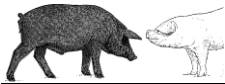
pérdida importante de eficiencia metabólica, no observada en las cerdas de raza Landrace (Rivera-Ferre y col., 2006).

Los índices productivos más favorables en cerdos en crecimiento entre (15 y 50 kg PV) se obtuvieron con el tratamiento que contenía 129 g de proteína bruta (PB)/kg en materia seca (MS). En estas condiciones el animal alcanzó un valor máximo de retención diaria de proteína (P_{max}) de 74 g, cifra considerablemente inferior a las observadas en las razas convencionales o magras, que pueden alcanzar en esta fase de crecimiento valores medios de deposición diaria superiores a 170 g/d (Nieto y col., 2002).

En Ibéricos en fase de crecimiento-cebo (50-100 kg PV), la deposición de proteína mostró tendencia a elevarse al descender su contenido en la dieta hasta 95 g/kg MS, valor con el que se alcanzó la máxima deposición proteica, 71 g/día (Barea y col., 2007). En cambio, en razas mejoradas la máxima deposición proteica alcanzada se situó en 148 g/d para cerdas entre 60 y 100 kg PV (Campbell y col., 1991).

Para un genotipo magro de potencial de crecimiento intermedio y de peso comprendido entre 10-60 y 60-90 kg, las necesidades de proteína recomendadas por la *British Society of Animal Science* (BSAS, 2003) son, respectivamente, un 33 y un 43% superiores a las que nuestro grupo de investigación ha determinado en el cerdo Ibérico. La asunción de las necesidades de proteína de cerdos mejorados recomendadas por esta entidad británica y otras organizaciones tales como el *Agricultural Research Council* (ARC, 1981) o el *National Research Council* (NRC, 1998) para el genotipo Ibérico supone un exceso en el suministro de proteína que repercute negativamente en el crecimiento del animal, en la formación de tejido magro, en la eficiencia de utilización de la proteína dietética y, por supuesto, en el coste de las raciones. Se produce, además, una mayor y evitable contaminación ambiental (Aguilera y Nieto, 2012).

La menor capacidad para la deposición proteica total descrita en la raza Ibérica en comparación con genotipos mejorados se ha puesto igualmente de manifiesto en otras etapas del crecimiento. Así, para animales de 9 a 25 (Conde-Aguilera y col., 2011) y de 100 a 150 kg PV (García-Valverde y col., 2008) se alcanzó un valor

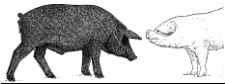


máximo para la deposición proteica de 60 y 84 g/d, respectivamente. En cambio, en razas mejoradas la máxima deposición proteica alcanzada se situó en 110 g/d para cerdos Large White con 20 kg PV inicial (Noblet y col., 1987) y 148 g/d para cerdos castrados Large WhitexLandrace de 100 a 160 kg PV (Galassi y col., 2004).

Se ha observado que esta menor capacidad de deposición proteica del cerdo Ibérico en comparación al Landrace se debió tanto a la menor síntesis (5,84 vs. 8,00 g N/kg^{0,75} y día, respectivamente) como degradación proteica (4,71 vs. 6,47 g N/kg^{0,75} y día, respectivamente) a nivel del organismo completo, al suministrarles a cada uno una dieta con cantidad óptima de aminoácidos esenciales (AAE) para que expresasen su máximo potencial genético para la deposición de tejido magro (Rivera-Ferre y col., 2006).

Mediante técnicas isotópicas se compararon las tasas de síntesis proteica en varios músculos (*Longissimus dorsi*, *bíceps femoris* y *semimembranosus*) y curiosamente se observó que este parámetro fue entre un 25-30% superior en las cerdas de raza Ibérica frente a la raza Landrace (Rivera-Ferre y col., 2005). Esto podría deberse a diferencias en el tipo de fibra muscular. Serra y col. (1998) encontraron una mayor cantidad y diámetro de fibras tipo I (consideradas de contracción lenta y metabolismo oxidativo) y menor cantidad y diámetro de fibras tipo IIB (de contracción rápida y metabolismo glucolítico no oxidativo) en cerdos Ibéricos que en Landrace de más de 100 kg PV empleando técnicas de tinción metabólica en el músculo *Longissimus lumborum*. El tipo de fibra muscular depende del tipo de miosina que la constituye, y la expresión génica de un tipo u otro depende en gran medida de la función y localización anatómica del músculo esquelético del cerdo (Gunawan y col., 2007). La mayor cantidad de fibras tipo I u oxidativas detectada en la raza Ibérica ha sido igualmente descrita en otras razas salvajes o no mejoradas, en comparación a razas domésticas (Karlsson y col., 1999).

Sin embargo, a pesar de la anteriormente citada mayor tasa de síntesis proteica muscular, el cerdo Ibérico desarrolla músculos de menor tamaño que el Landrace respecto al PV total (entre un 20-32%) debido a una también elevada tasa de degradación proteica muscular (6,04 y 3,94% para Ibérico y Landrace, respectivamente; Rivera-Ferre y col., 2005).



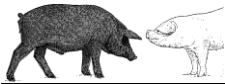
El que tanto la síntesis como la degradación proteica sean muy activas en los músculos de la raza porcina Ibérica conduce a una baja deposición de proteína (g/día) y, como consecuencia, a menor masa de proteína corporal.

Se ha descrito un mayor depósito de grasa intramuscular en el músculo *Longissimus dorsi* de varias estirpes de cerdo Ibérico en comparación con cerdos cruzados (Large White x Landrace) x Large White (Cava y col., 2004) para el caso del ácido palmítico, ácido oleico, total de ácidos grasos (AG) saturados y total de AG monoinsaturados (en la fracción de lípidos neutros); y menor de ácidos poliinsaturados y ácido linoleico (tanto en la fracción de lípidos neutros como en los polares).

La selección genética realizada para lograr mayor potencial de formación de tejido magro ha comportado una pérdida de capacidad de ingestión (ARC, 1981; van Lunen y Cole, 1996). Es característica de la raza Ibérica la mayor tasa de ingesta voluntaria de alimento en comparación a la Landrace. En cerdos comprendidos entre 88 y 108 kg PV se obtuvieron unas tasas de ingestión de 3,5 y 2,7 kg/d para Ibérico y Landrace, respectivamente, sin que se llegasen a encontrar diferencias significativas en cuanto a la ganancia de peso diaria (Morales y col., 2002). Sí se ha descrito una menor ganancia diaria de peso en cerdos Ibéricos en comparación con cerdos de razas mejoradas desde los 15 a los 115 (80% *ad libitum*; Barea y col., 2011) y desde los 19 a los 27 kg PV (90% *ad libitum*; Rivera-Ferre y col., 2005)

También se ha encontrado en el cerdo Ibérico un mayor contenido energético corporal y una menor digestibilidad de nutrientes en comparación con razas mejoradas (Morales y col., 2002). Rivera-Ferre y col. (2006) observaron que la digestibilidad de la MS, PB y de la energía fue significativamente inferior en la raza autóctona respecto a la Landrace (2,4, 4,1 y 2,5%, respectivamente).

Rivera-Ferre y col. (2005) encontraron igualmente un mayor tamaño relativo en la mayoría de los tejidos viscerales en la raza Ibérica respecto a la Landrace. La diferencia entre razas alcanzó el 21% al comparar el tracto gastrointestinal completo, destacando el mayor tamaño relativo del estómago, intestino grueso e hígado en la raza Ibérica. La gran actividad metabólica de estos tejidos conduce a pensar que el



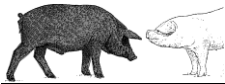
animal ha de invertir una mayor cantidad de la energía ingerida a los procesos de mantenimiento, con la consiguiente pérdida de eficiencia energética.

En el estudio de Barea y col. (2010) en el que también se compararon los tamaños relativos de los órganos viscerales en cerdos Ibéricos y Landrace-Large White en distintas fases productivas, se observó que dichas diferencias desaparecen en animales de aproximadamente 115 kg PV. Estos resultados sugieren que estas diferencias desaparecen conforme el animal aumenta su PV y se limitan a los animales más jóvenes.

Aguinaga y col. (2011) estimaron el coste medio energético por gramo de ganancia de peso en 24 kJ, un valor un 30% superior a las cifras recogidas para lechones de otras razas (18,4 MJ; Noblet y col., 1998).

La menor tasa de conversión de alimento en Ibérico ha sido relacionada por Morales y col. (2002) con el mayor depósito de grasa dorsal, el contenido de lípidos intramusculares y la actividad de enzimas lipogénicas (enzima málica y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, principalmente). Se ha descrito también una mayor actividad de enzimas pancreáticas (lipasa, tripsina, quimotripsina y amilasa) e intestinales (maltasa y sacarasa) en lechones Ibéricos Alentejanos en comparación con lechones Large White de 49 días de edad (Freire y col., 1998). Según estos autores, la mayor actividad de estas enzimas pancreáticas e intestinales supondría un mayor potencial digestivo de grasas saturadas y componentes fibrosos de la dieta, lo que podría indicar una adaptación enzimática más temprana del tracto digestivo y mejor aptitud para un destete más temprano que en razas mejoradas.

La diferencia entre Ibérico y Landrace con respecto a la ingesta voluntaria de alimento y la deposición de grasa podría revelar diferencias intrínsecas en el metabolismo regulatorio intermedio como, por ejemplo, en la secreción de leptina (hormona producida principalmente por los adipocitos y que disminuye la ingesta actuando a nivel del sistema nervioso central) o la resistencia tisular a la misma (Morales y col., 2002). Fernández-Fígares y col. (2007) en un estudio comparativo entre cerdos Ibéricos y Landrace de aproximadamente 20 kg PV, estudiaron el perfil de distintos metabolitos y hormonas en suero, obteniendo una mayor cantidad de glucosa y creatinina para la raza Landrace, y de leptina, insulina y factor de



crecimiento insulínico tipo I (IGF-I) para la raza Ibérica. Una posible resistencia a la leptina podría existir en el genotipo Ibérico, con mayor capacidad de ingesta a pesar de presentar una mayor concentración de la misma. De hecho, está demostrado que en el cerdo Ibérico existen polimorfismos genéticos del receptor de leptina (Óvilo y col., 2005; Muñoz y col., 2009) que explicarían los niveles de ingesta mucho más elevados del cerdo Ibérico respecto a razas mejoradas y su enorme potencial para la deposición de grasa, ya que las alteraciones en la transducción de señal del receptor impiden generar las señales de saciedad en el hipotálamo (Vela, 2006).

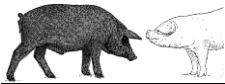
Además, este mayor contenido en grasa podría explicar la entrada más temprana en la pubertad observada para las hembras de Ibérico con respecto a las del cruce Large White x Landrace, aunque el peso medio alcanzado en el momento del comienzo de la pubertad fue mayor en el caso de las segundas (González-Añover, 2010).

La leptina no sólo se ha relacionado con el comienzo de la pubertad en las cerdas Ibéricas (Barb y col., 2001; Barb y Kraeling, 2004) sino también con su menor prolificidad (González-Añover y col., 2011). La obesidad y la resistencia a la leptina están directamente relacionadas con alteraciones en la función ovárica (Pasquali y Gambineri, 2006; Pasquali y col., 2007) y también con problemas en la implantación del cigoto e inicio de la gestación, aumentando la propensión a la infertilidad (Metwally y col., 2008).

2.3. TEJIDOS ESPLÁCNICOS

Las diferencias en actividad metabólica, utilización energética y capacidad de deposición de proteína y grasa del cerdo Ibérico frente a las razas porcinas mejoradas son extraordinariamente importantes y necesariamente han de explicar diferencias observadas en necesidades nutritivas y energéticas (Fernández-Fígares y col., 2003).

A estas claras diferencias metabólicas han de contribuir peculiaridades ligadas al genotipo, responsables de la actividad metabólica de los distintos tejidos y



órganos, y en particular de los tejidos espláncnicos (tracto gastrointestinal, grasa mesentérica, páncreas, bazo e hígado).

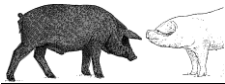
Si consideramos la ruta vascular que siguen los nutrientes ingeridos por el animal antes de llegar a los tejidos periféricos, el tracto gastrointestinal y el hígado, por su posición anatómica y funcionamiento metabólico, controlan la distribución de nutrientes al resto del organismo, lo cual es de una importancia extraordinaria a nivel de rentabilidad pues la utilización de energía por los tejidos periféricos de interés económico/productivo (músculo, glándula mamaria y útero) depende, en parte, de la partición de la energía metabolizable (EM) suministrada a los distintos compartimentos del organismo. Varios estudios han puesto de manifiesto el mayor peso de los tejidos viscerales exceptuando el intestino delgado (estómago, intestino grueso e hígado) con respecto al PV en cerdos Ibéricos en comparación con razas mejoradas (Rivera-Ferre y col., 2005; Aguinaga y col., 2010), lo que unido a su elevada tasa metabólica magnifica su importancia dado su escaso o nulo interés productivo.

2.3.1. VÍSCERAS QUE DRENAN AL SISTEMA PORTA

El conjunto de las VDP (estómago, tracto intestinal, páncreas y bazo) representan el 4-6% del PV pero su contribución a la renovación proteica del organismo completo y gasto energético es superior al 35%. Este desproporcionado impacto de las VDP en el metabolismo en relación a su masa puede atribuirse a sus altas tasas fraccionales de síntesis proteica y consumo de oxígeno (Stoll y Burrin, 2006).

Las tres cuartas partes de la energía que las VDP necesitan son satisfechas por la oxidación de glucosa, glutamato y glutamina, siendo el glutamato de la dieta el principal contribuyente en la generación de energía oxidativa de la mucosa (Stoll y col., 1999).

Las VDP no sólo asimilan los nutrientes, también funcionan como una barrera física e inmunológica y como órgano endocrino segregando hormonas que



proporcionan las señales necesarias para el metabolismo y el crecimiento. Además, el sistema nervioso entérico les permite funcionar de forma autónoma o interactuar con el sistema nervioso central.

Toda la sangre procedente de las VDP confluye en la vena porta. El sistema porta es la principal ruta de transporte de los nutrientes absorbidos en el tracto gastrointestinal hacia los tejidos periféricos de interés económico/productivo, a excepción de los AG de cadena larga que se transportan por vía linfática y llegan a la circulación general por el conducto torácico (Yen y Killefer, 1987).

La vena porta se forma por la afluencia de las venas mesentérica superior, mesentérica inferior y esplénica (figura 2.4). La vena mesentérica superior drena la sangre del intestino delgado, parte del intestino grueso y estómago. La vena mesentérica inferior recibe la sangre de parte del colon y la vena esplénica drena la sangre del bazo y recibe tributarias procedentes del estómago, pancreas y parte del colon. Antes de que la vena porta entre en el hígado se une a ella la vena cística procedente de la vesícula biliar. La porta es una vena que se inicia y termina como los capilares, es decir, no va a terminar en otra vena o el corazón, sino que, a manera de una arteria, se ramifica y se capilariza en el hígado. La sangre abandona el hígado a través de las venas suprahepáticas que drenan en la vena cava inferior. (Cortez-Hernández y col., 2009).

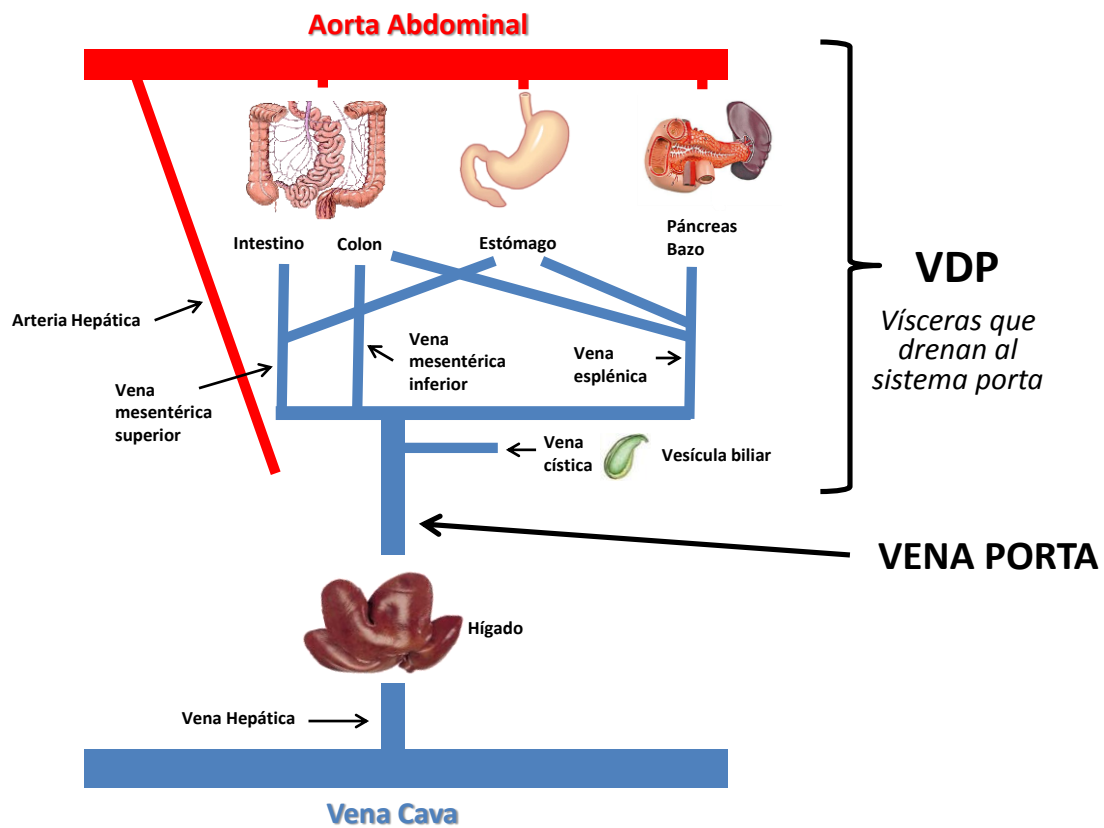
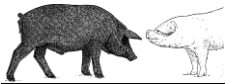
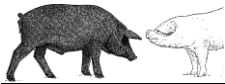


Figura 2.4: Vísceras que drenan al sistema porta.

2.3.1.1. FLUJO NETO PORTAL DE AMINOÁCIDOS

Como se mencionó anteriormente, el tracto gastrointestinal y el hígado, por su posición anatómica y funcionamiento metabólico, controlan la distribución de nutrientes al resto del organismo. Consecuentemente la extracción y uso de los aminoácidos de la dieta por estos tejidos tiene una influencia crítica en su disponibilidad neta en la periferia (Stoll y Burrin, 2006).

Durante el proceso de digestión, la proteína de la dieta debe degradarse hasta péptidos y aminoácidos, para ser absorbida posteriormente por las células de la mucosa intestinal. Esta degradación se produce en el estómago y duodeno e intervienen varias enzimas: pepsina (producida por la mucosa del estómago), aminopeptidasa (procedente de la mucosa intestinal), tripsina, quimiotripsina, elastasa y carboxipeptidasa A y B (procedentes del páncreas). Los péptidos

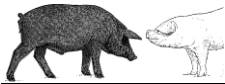


sencillos y aminoácidos liberados son absorbidos por un mecanismo de transporte activo para pasar, vía porta, desde las células de la mucosa intestinal, los enterocitos, hasta el hígado.

Las teorías sobre la digestión de la proteína y su absorción han evolucionado en los últimos 50 años. Inicialmente se pensó que la gran mayoría de las proteínas lumenales se hidrolizaban completamente a aminoácidos libres antes de ser absorbidas (Cohnheim, 1901; van Slyke y Meyer, 1912; Wiggans y Johnston, 1959). Sin embargo, esta hipótesis clásica fue desafiada por el hallazgo de que se podían absorber cantidades apreciables de glicilglicina a través de la pared intestinal (Newey y Smyth, 1959). Posteriormente, se midieron tasas más altas de absorción de aminoácidos cuando se encontraban en forma de péptidos que como aminoácidos libres (Adibi y Morse, 1971; Matthews, 1983). De estos y otros estudios (Matthews, 1991), se desprendió que la absorción de la proteína en forma de pequeños péptidos es de gran importancia nutricional. Actualmente, la mayoría de los investigadores aceptan el concepto de que aproximadamente el 70-85% de todos los aminoácidos lumenales son absorbidos de la digesta en los enterocitos en forma de pequeños péptidos, y el resto (15-30%) se absorbe como aminoácidos libres.

Después de la absorción en los enterocitos, sin embargo, se cree que alrededor del 85% de todos los aminoácidos absorbidos aparecen en la sangre portal como aminoácidos libres, como resultado de la hidrólisis intracelular (Matthews, 1991; Ganapathy y col., 1994).

Las primeras investigaciones realizadas en perros (Elwyn y col., 1968), mostraron un aumento de los aminoácidos libres que aparecen en la sangre portal durante la digestión proteica tras la comida. Durante dicho período postprandial, los aminoácidos que aparecían en la sangre portal fueron similares en composición a aquellos ingeridos con la comida, excepto glutámico y aspártico, que fueron captados por las VDP, y lisina e histidina que aparecieron en cantidades superiores. Curiosamente, el flujo neto portal (FNP) de aminoácidos fue mayor que la cantidad ingerida, sugiriendo una hidrólisis y absorción completa de la proteína en el intestino junto a una ausencia de metabolización y/o una aportación de aminoácidos de la proteína endógena.

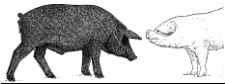


De los experimentos realizados en cerdos, parece claro que la digestibilidad nunca alcanza el 100% y una parte significativa de varios AAE y no esenciales presentes en el contenido del intestino delgado se metaboliza durante su transporte a través de las células epiteliales del intestino delgado hacia el torrente sanguíneo portal. Numerosos estudios demuestran que de los aminoácidos ingeridos, menos del 100% aparecen en sangre portal tras una comida (Rérat y col., 1992; Wu y Morris, 1998; van Goudoever y col., 2000). Stoll y col. (1998) observaron que la recuperación portal de AAE ingeridos fue del 56%; expresados como porcentaje de la ingesta de aminoácidos: el 38, 57, 54, 60, 61, 48 y 69% de treonina, leucina, lisina, fenilalanina, valina, metionina e isoleucina, respectivamente, fueron recuperados en la sangre portal de los cerdos jóvenes. Por lo que la utilización de los aminoácidos por los tejidos de las VDP, bien para sintetizar proteína o para ser oxidados, durante el proceso de absorción parece ser substancial (Stoll y col., 1998; Wu, 1998; van Goudoever y col., 2000).

Tras ingerir una dieta hiperproteica, la producción de energía en el intestino proviene de la oxidación del glutámico, glutamina y aspártico, aunque la oxidación sólo de estos aminoácidos no explica la producción total de CO₂ ni la producción de alanina y amonio de las VDP (van Goudoever y col., 2000). Por tanto, otros aminoácidos, quizás incluyendo AAE son oxidados en las VDP existiendo evidencias de que la leucina y la metionina son oxidados por los enterocitos (Benevenga y col., 1982; Yu y col., 1992) al igual que la lisina y fenilalanina (Stoll y col., 1999).

Mientras determinados aminoácidos son catabolizados en los enterocitos, otros son generados por el epitelio del intestino delgado. La alanina es el aminoácido liberado en mayor cantidad por las VDP (Rérat y col., 1992; Prior y Gross, 1995), transfiriendo nitrógeno y carbono al hígado para la síntesis de urea y glucosa (Jungas y col., 1992). La elevada liberación de alanina a la vena porta revela la transaminación del glutamato y el catabolismo de la glutamina por las VDP, proveyendo energía para el metabolismo gastrointestinal (Britton y Krehbiel, 1993).

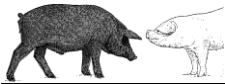
Conocer la cantidad exacta de proteína que es digerida y absorbida por las células del intestino delgado sería especialmente interesante por ser este tramo del tracto gastrointestinal el principal responsable del desproporcionado impacto de las



VDP en el metabolismo completo del animal (Stoll y Burrin, 2006). Este estudio resulta muy complicado debido a la secreción de proteína endógena en el lumen del intestino delgado, al metabolismo de ciertos aminoácidos en la mucosa intestinal (Stoll y col., 1997) como el glutamato (Stoll y col., 1999) y a la influencia de la flora intestinal que usa y transforma los aminoácidos de la dieta.

Para el estudio del metabolismo de los aminoácidos en el intestino se pueden realizar experimentos tanto *in vivo* como *in vitro*. Un diseño experimental *in vivo* ampliamente utilizado para estimar la absorción intestinal aparente de aminoácidos es el método de la diferencia arterio-venosa. Consiste en medir las concentraciones de aminoácidos en diferentes tiempos después de una comida, tanto en la sangre arterial como portal, así como la medida continua del flujo de sangre en la vena porta. Este método permite colegir si un aminoácido dado se degrada o genera durante su transporte a través la mucosa intestinal. Esta aproximación experimental tiene el inconveniente de que en la vena porta no drenan aminoácidos del intestino exclusivamente sino también de otros tejidos viscerales (en particular, del estómago, páncreas y bazo). Para corregir dicho problema se pueden utilizar proteína marcada con isótopos y de esta manera conocer el destino metabólico de los aminoácidos ingeridos tras su digestión, absorción y metabolismo (Blachier y col., 2013).

Para el estudio *in vitro* del metabolismo de aminoácidos en las células epiteliales del intestino delgado y grueso se usan generalmente enterocitos y colonocitos aislados para medir su capacidad metabólica con respecto a diferentes aminoácidos. Aunque esta aproximación *in vitro* ha demostrado ser útil para comprender el destino metabólico de los aminoácidos en las células intestinales, los resultados obtenidos no reflejan necesariamente lo que sucede *in vivo* en la mucosa intestinal. De hecho, la mucosa intestinal no contiene exclusivamente células epiteliales sino que también tiene otros numerosos tipos celulares incluyendo células musculares lisas e inmunes. Es importante destacar que el metabolismo en los enterocitos es diferente según la etapa de desarrollo del cerdo y está relacionado con el suministro de energía a los enterocitos y colonocitos, con la síntesis de metabolitos con importantes funciones fisiológicas locales y periféricas, y con la síntesis de otros aminoácidos (Blachier y col., 2013).

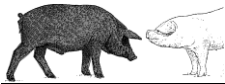


En esta Tesis Doctoral hemos empleado la técnica de la diferencia arterio-venosa para comparar los FNP de lisina y metionina en raza Ibérica y Landrace.

Como ya se ha mencionado anteriormente, históricamente se ha asumido que los aminoácidos de la dieta eran absorbidos desde el lumen hasta la circulación portal sin sufrir ninguna modificación, aunque este concepto fue cuestionado al observarse que la concentración plasmática de cisteína disminuía cuando dietas con metionina como único aminoácido azufrado eran suministradas parenteralmente, mientras que la concentración aumentaba inmediatamente al suministrarlas por vía oral (Stegink y Bensten, 1972). Estos resultados revelaron que los tejidos esplácnicos (principalmente intestino e hígado) debían jugar un papel importante en la utilización de la metionina de la dieta para la síntesis de cisteína. Shoveller y col. (2003a, b) también encontraron que, independientemente de la deficiencia o el exceso de cisteína en la dieta, las necesidades de metionina en lechones eran ~30% más bajas cuando ésta era suministrada por vía parenteral en comparación con la vía enteral, lo que confirmó aún más la importante demanda metabólica de la metionina de la dieta por los tejidos esplácnicos.

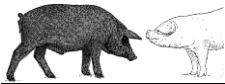
A pesar de estos estudios, la contribución relativa de los tejidos gastrointestinales al metabolismo de la metionina en la dieta sigue siendo un tema de debate. Con la creciente evidencia de que el intestino desempeña un importante papel en la alteración de las concentraciones y perfiles en sangre portal de los aminoácidos de la dieta, tales como la glutamina (Windmueller 1982), el metabolismo intestinal de la metionina de la dieta ha generado un elevado interés entre los investigadores.

Stoll y col. (1998) observaron en lechones que la aparición neta portal (ANP) de metionina representa el 48% de la ingesta, sugiriendo que una buena parte de la metionina de la dieta es consumida por el intestino. Basándose en los resultados de ANP se ha considerado que es la metionina, en lugar de la lisina, el primer aminoácido limitante para los lechones. Estudios en ratas (Finkelstein, 2000) y posteriormente en cerdos (Shoveller y col., 2005; Bauchart-Theveret y col., 2009a) demostraron que los tejidos gastrointestinales poseen la dotación enzimática necesaria para la síntesis de cisteína a partir de metionina, lo cual proporcionó una



mayor base bioquímica para explicar la elevada utilización de metionina por el intestino (Shoveller y col., 2005; Bauchart-Theveret y col., 2009b). Riedijk y col. (2007) obtuvieron que el tracto gastrointestinal de los lechones consumía aproximadamente el 20% de la metionina de la dieta y que el 40% de la metionina era oxidada a CO₂ mientras que Fang y col. (2010a) observaron que la cantidad de metionina metabolizada por el intestino suponía un 30% de la ingesta.

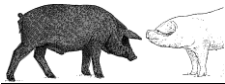
Sin embargo, los estudios *in vitro* parecen contradecir la idea de que el intestino es un sitio cuantitativamente importante en la conversión de la metionina de la dieta en homocisteína y cisteína. Chen y col. (2007, 2009) observaron que la metionina es poco catabolizada en enterocitos porcinos sugiriendo que debe ser sustancialmente consumida por otras células de las VDP, la mucosa intestinal y/o debe ser degradada por la microbiota del intestino grueso (Blachier y col., 2007). De acuerdo con esta idea, se ha visto que en cerdos, los aminoácidos dietarios y procedentes de la proteína endógena son los principales contribuyentes a la proteína microbiana del intestino superior llegando como en el caso de la valina a alcanzar valores del 92% (Libao-Mercado y col., 2009). Esto significa que la proteína microbiana, si posteriormente no es digerida y absorbida, supondrá una pérdida neta de aminoácidos para el hospedador. Sin embargo, también es posible que la oxidación observada *in vivo* de en cerdos sea realizada por otros tipos celulares y/o tejidos de las VDP, tales como linfocitos, fibroblastos, tejido pancreático, tejido del bazo o estómago ya que todos ellos drenan al sistema porta. La transmetilación (de metionina a homocisteína) y la transulfuración (de homocisteína a cisteína) son las dos vías metabólicas responsables de la mayoría de la utilización de metionina por el tracto gastrointestinal (Riedijk y col., 2007). Existe una demanda de metionina para ser metabolizada a cisteína en la síntesis de mucinas ricas en cisteína secretadas por las células caliciformes intestinales que participan en la función inmune innata (van Klinken y col., 1998). Del mismo modo, el que la radiactividad en el páncreas fuera aproximadamente el doble que en el intestino después de la administración de L-1-¹⁴C-metionina (Saunderson, 1985) podía implicar un papel significativo del páncreas en el metabolismo de la metionina de la dieta, el cual aún está por definirse.



No hay que olvidar que los resultados *in vitro* obtenidos con enterocitos aislados tienen sus limitaciones y no reflejan necesariamente lo que sucede *in vivo* en la mucosa intestinal. Existiendo varias razones para ello:

Primero, debido a que las membranas apicales y basolaterales de cada enterocito son química, bioquímica y físicamente diferentes (Madara, 1991), los enterocitos pueden recibir selectivamente nutrientes de dos fuentes diferentes: de la sangre arterial a través de la membrana basolateral y del lumen intestinal a través de la membrana apical (Wu y col., 2005; Stoll y Burrin, 2006). Hay evidencias que apuntan a que el intestino oxida preferentemente la metionina arterial en lugar de la luminal (Riedijk y col., 2007), confirmando así la importancia de la naturaleza bipolar del intestino. En este sentido, el cultivo primario *in vitro* de células epiteliales aisladas (Chen y col., 2009) puede limitar la utilización de metionina por estas células. Segundo, la alta tasa de transulfuración de metionina en el intestino es estimulada por las necesidades de cisteína para la síntesis de glutatión debido al estrés oxidativo asociado con la actividad metabólica de la proliferación celular del epitelio. Por tanto, la diferencia potencial entre estudios *in vitro* e *in vivo* en relación a la oxidación asociada con la proliferación de las células epiteliales puede dar lugar a diferencias en el metabolismo de la metionina (Riedijk y col., 2007). Y por último, estudios previos (Dangin y col., 2001) en hombres jóvenes demostraron que una ración individual de aminoácidos libres con una composición idéntica a una ración individual de caseína de digestión lenta indujo una oxidación mayor, más rápida y transitoria de la proteína. Por lo que el tipo de nutriente (aminoácidos vs. proteína) utilizado en los estudios *in vitro* e *in vivo* junto con su velocidad de absorción (rápido vs. lento) por los enterocitos pueden provocar diferencias en el metabolismo de la metionina entre ambos tipos de estudios, evidenciando que la contribución de las VDP y la microbiota al metabolismo de la metionina aún debe ser estudiada en mayor profundidad.

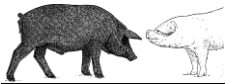
En lechones alimentados con dietas con proteína de origen lácteo, se ha observado que la ANP de lisina representa el 54% de la ingesta (Stoll y col., 1998). Estudios anteriores en humanos y animales alimentados con aminoácidos libres marcados con isótopos estables (Hoerr y col. 1991 y 1993; Biolo y col. 1992; Yu y col. 1992; Basile-Filho y col. 1997) ya habían demostrado que los tejidos espláncnicos



captaban importantes cantidades de AAE y que en el caso de leucina (Yu y col. 1992) y fenilalanina (Stoll y col., 1997) era el intestino, en lugar del hígado, el que los metabolizaba en mayor medida. Stoll y col. (1998) observaron que este mismo fenómeno ocurría con la lisina y que su metabolismo intestinal suponía un tercio de la ingesta. Alpers (1972) estableció que las células epiteliales de las vellosidades intestinales utilizaban tanto los aminoácidos del lumen como de la sangre arterial para la síntesis proteica. La hipótesis inicial de Stoll y col. (1998) era que la mayor parte de los AAE captados por el intestino eran destinados a la síntesis de proteína de la mucosa intestinal. Sin embargo, comprobaron que sólo una baja proporción de estos AAE (40% como máximo) eran destinados a este fin, por lo que el restante 60% debía ser catabolizado con fines energéticos, lo que suponía un 20% de la lisina ingerida. van Goudoever y col. (2000) observaron que la oxidación intestinal de lisina en lechones alimentados con una dieta alta en proteína suponía el 30% de la oxidación total de misma. Curiosamente, en los enterocitos aislados del intestino delgado, la lisina era poco catabolizada (Chen y col., 2009). La baja capacidad de estas células para el catabolismo de la lisina sugería que debía ser sustancialmente consumida por otras células de la mucosa intestinal y/o debía ser degradada por la microbiota del intestino. Aunque la hipótesis de un elevado catabolismo *in vivo* de lisina por la microbiota intestinal parecía plausible, se encontraron evidencias a favor de la síntesis *de novo* de lisina por la microbiota del cerdo disponible para ser usada por el hospedador (Torrallardona y col., 1996, 2003; Backes y col., 2002). El valor neto de utilización de lisina por las VDP y la producción por la microbiota intestinal siguen necesitando de una determinación precisa.

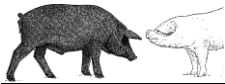
2.3.1.2. FACTORES QUE AFECTAN AL FLUJO NETO DE AMINOÁCIDOS EN LAS VDP EN CERDOS

El flujo neto de los aminoácidos en las VDP en cerdos se ve afectado por factores propios del alimento, del animal o ambientales. Entre los factores propios del alimento encontramos su composición química, factores antinutricionales (Araiza y col., 2003), procesamiento al que es sometido (Batterham, 1992), concentración de nutrientes (Kephart y Sherrit, 1990; Fan y col., 1994) e interacciones entre los



mismos. Por ejemplo, el FNP de aminoácidos se ve afectado por la composición, estructura y fuente de almidón (Huang y col., 2006). Los diferentes tipos de almidón de los alimentos tienen digestibilidades diferentes, lo que no sólo afectará a la digestión y absorción de los aminoácidos sino también a su metabolismo en la mucosa intestinal y por tanto, a la absorción neta portal y al patrón de composición de los mismos (Huang y col., 2006). El contenido de AAE (valina, isoleucina, fenilalanina, triptófano, arginina, serina, cistina, tirosina, lisina e histidina) en la vena porta de los cerdos alimentados con una dieta de almidón de guisante fue mayor que en los cerdos alimentados con almidón de maíz (van der Meulen y col., 1997). Deng y col. (2010) observaron que una dieta de arroz glutinoso con una relación de amilosa/ amilopectina de 0,18 no sólo redujo la absorción neta portal de aminoácidos sino que también cambió el patrón de composición de aminoácidos absorbidos en vena porta, redujo la proporción de AAE respecto al total y la tasa fraccional de síntesis proteica en VDP e hígado respecto a una dieta de maíz con una relación de amilosa/ amilopectina de 0,23.

El ácido fítico también reduce la utilización de la proteína (Selle y col., 2000) al igual que los taninos (Cousins y col., 1981). Los taninos de la dieta pueden disminuir la digestibilidad de la PB y aminoácidos mediante mecanismos diferentes, incluyendo la formación de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas de sus grupos hidroxilos con los grupos carbonilo de la proteína dietaria, disminuyendo la actividad de la pepsina gástrica, de la tripsina, quimotripsina pancreática, y de las peptidasas intestinales del borde en cepillo, cambiando la morfología de la mucosa gastrointestinal, disminuyendo la absorción transmembranal de nutrientes, e incrementando las secreciones endógenas de proteína (Jansman y col., 1993; Mariscal y col., 2009). Los polisacáridos no amiláceos también afectan la digestibilidad proteica. Se ha observado que la digestibilidad ileal aparente de la PB y aminoácidos totales disminuyó en un 3-5% en cerdos en crecimiento cuando los β -glucanos de la dieta aumentaron de 29,0 a 31,8 g/kg (Yin y col., 2000b, c). Igualmente, la digestibilidad ileal aparente de la PB y aminoácidos totales disminuyó en un 12 y 6%, respectivamente, cuando el contenido total en polisacáridos no amiláceos aumentó de 83 a 193 g/kg (Yin y col., 2000a). Las pectinas dietarias debido a sus propiedades de viscosidad y gelificación disminuyen la digestión y

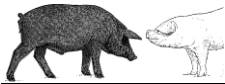


absorción de nutrientes por reducir la mezcla de los contenidos intestinales, interfiriendo con la unión de enzima-sustrato y por formar una capa de agua estática, que crea una barrera física a la absorción de nutrientes (Mariscal y col., 2009).

Por otra parte, la grasa reduce la velocidad con la que el alimento transita por el aparato digestivo, aumentando el tiempo de permanencia de la ración en el intestino, lo que mejora la digestibilidad y absorción del resto de nutrientes de la ración (Low, 1990).

Aunque el calor puede mejorar la digestibilidad de la proteína al modificar su estructura terciaria (desnaturalización), los tratamientos térmicos mal aplicados como altas temperaturas durante tiempos prolongados provocan la formación de enlaces indigestibles entre aminoácidos o entre aminoácidos y azúcares (reacción de Maillard), reduciendo así su digestibilidad (Almeida y col., 2012; Nursten, 2005).

En referencia a factores propios del animal hemos de tener en cuenta la edad y estado del animal (Caine y col., 1997; Cervantes y col., 2000), el PV (Fabián y col., 2003), el genotipo (Christon, 1988; Kinyamu y Ewan, 1994) y la microbiota intestinal. Ésta última tiene un considerable impacto en el catabolismo y la síntesis *de novo* de los aminoácidos modulando la digestión, absorción y el metabolismo de los aminoácidos en la dieta (Libao-Mercado y col., 2009; Fang y col., 2010b). En general se considera que la microbiota intestinal es beneficiosa para el huésped. Las bacterias nativas proporcionan al huésped nutrientes, incluyendo AG de cadena corta, vitamina K, vitaminas del complejo B y aminoácidos (Savage, 1986; Wostmann, 1996). También impiden la colonización por microorganismos patógenos al competir con más éxito por los nutrientes o por los sitios de adhesión al epitelio (Rolfe, 1997). Sin embargo, la microbiota ejerce un impacto negativo sobre la eficiencia del crecimiento animal. Este hecho ha sido ampliamente documentado en estudios realizados con animales libres de gérmenes, y cada vez hay más evidencias de que los efectos promotores del crecimiento de los antibióticos probablemente reflejen su capacidad tanto de disminuir la colonización bacteriana en el intestino como de modificar los perfiles de la microcomunidad (Gaskins, 2008). Se ha observado que los antibióticos orales no inducen una respuesta del crecimiento en los animales libres de gérmenes (Coates y col., 1963), mientras que la



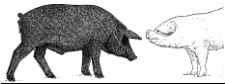
colonización de los animales libres de gérmenes con bacterias intestinales disminuye el crecimiento (Coates, 1980). Se cree que esta disminución del crecimiento es resultado de un mayor coste de mantenimiento asociado con las respuestas del huésped a la variedad de procesos catabólicos mediadores del crecimiento bacteriano en el intestino (Gaskins, 2001).

Dierick y col. (1986) canularon en duodeno, íleon o ciego a nueve cerdos en crecimiento (10- 40 kg). Tras la incubación de los contenidos intestinales frescos (4 horas) no se apreció una actividad microbiana importante a nivel duodenal mientras que a nivel ileal el 20-30% de los aminoácidos fue degradado por la flora tanto por desaminación, con formación de amoníaco, como por descarboxilación con la formación de aminas: histamina, putrescina, tiramina, feniletilamina y cadaverina (descarboxilación de la lisina). El estudio de la flora dominante en el intestino delgado del cerdo (*E. coli*, *S. faecalis*, *L. acidophilus* y *L. fermenti*) mostró que *E. coli* era el principal responsable de la producción de aminas y que el uso de antibióticos disminuía tanto la desaminación como la descarboxilación de aminoácidos. La fermentación del contenido cecal se caracterizó por una elevada producción del amoníaco.

Dado que la microbiota intestinal puede degradar aminoácidos, tiene una influencia negativa en la digestión proteica en el intestino delgado. Estos procesos catabólicos suponen la pérdida de una fracción de los mismos que, de otra manera, podrían ser utilizados para la síntesis y deposición de proteína corporal.

El equilibrio de la microbiota intestinal también tiene un impacto significativo sobre el metabolismo de los aminoácidos en el intestino debido a que la actividad de la misma afecta a la estructura y función intestinal, lo que repercute en la digestión y absorción de aminoácidos. Además, debe tenerse en cuenta que cuando la mucosa intestinal se enfrenta el efecto nocivo de algunas bacterias puede necesitar más recursos energéticos (He y col., 2013).

Las condiciones ambientales son otro de los factores que pueden afectar la digestibilidad de la proteína (Bonnet y col., 1997), en especial la temperatura y humedad relativa, aunque estos efectos han sido poco estudiados en el cerdo. En regiones con clima tropical, las altas temperaturas producen cambios fisiológicos



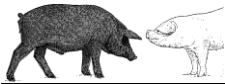
provocando una reducción en el tamaño del tracto gastrointestinal, hígado y bazo (Christon, 1988). La vida media de los enterocitos se reduce de 70 a 45 h al pasar de 10 a 35°C, presentándose igualmente una reducción en la absorción de los nutrientes en el intestino delgado (Dauncey y col., 1983).

2.3.1.3. CONTRIBUCIÓN DE LAS VDP AL GASTO ENERGÉTICO TOTAL

El consumo de O₂ por las VDP es un medio de evaluar los costes de absorción de nutrientes en relación a la raza, el estado productivo, la dieta o el consumo de O₂ total por el animal (Huntington y Tyrrell, 1985).

Multitud de trabajos, principalmente en rumiantes, han puesto de manifiesto la importante contribución de las VDP y el hígado al gasto energético del organismo completo en relación a su masa. Huntington y Reynolds (1987) indicaron que en bovino las VDP eran responsables del 18 al 25% del consumo de O₂ total del animal, mientras que su contribución al peso corporal era del 8 al 10%. Por su parte, el consumo de O₂ del hígado fue aún mayor que el de las VDP cuando su contribución al peso corporal era tan sólo del 1 al 2%. En corderos, los tejidos espláncnicos representaron el 52% del consumo de O₂ total, del cual del 18 al 29% correspondió a las VDP y el 25% al hígado, cuando su contribución al peso corporal fue aproximadamente del 7 y 2%, respectivamente (Burrin y col., 1989).

Los estudios en cerdos son mucho más escasos y realizados, casi exclusivamente, en razas mejoradas. Así, Yen y col. (1989) y Yen (1997) obtuvieron que las VDP eran responsables del 25% del consumo de O₂ total cuando sus masas representaban sólo el 5% del total. De manera similar, Webster (1981) indicó que los órganos del sistema digestivo tenían una tasa de renovación proteica considerablemente mayor que otros componentes corporales. De hecho, se ha comprobado que, tanto en cerdos como en ganado bovino, la síntesis proteica del tracto gastrointestinal, hígado, páncreas y riñones con respecto a la total fue superior (35-40%) a la del músculo esquelético (24-28%) (Lobley y col., 1980; Simon y col., 1982). El tracto gastrointestinal tiene una rápida tasa tanto de síntesis como de degradación proteica, estimándose la deposición proteica neta en menos del 2%



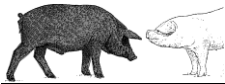
(Sainz y col., 1986; Early y col., 1990). Webster y col. (1978) sugirieron una estrecha relación entre la síntesis proteica corporal total y la pérdida de calor en ratas congénitamente obesas y magras.

Podemos concluir, tal y como hicieron Koong y col. (1983), que la producción de calor de estos órganos tan activos metabólicamente constituye una porción importante de la total. Esto puede deberse en parte a que los tejidos espláncnicos (junto al sistema nervioso, el corazón y los riñones) reciben más aporte sanguíneo que el músculo, el tejido adiposo o la piel (Ferrell, 1988).

Según Edelstone y Holzman (1981), los órganos y tejidos satisfacen sus necesidades de O_2 alterando las relaciones entre el flujo sanguíneo, el suministro de O_2 y su extracción. Cómo se interrelacionan estos factores depende de cada órgano y tejido y del estado fisiológico aunque, de manera general, el incremento en el consumo de O_2 por las VDP se produce como consecuencia de un flujo sanguíneo mayor en respuesta a un aumento de la ingesta energética (Lomax y Baird, 1983).

El flujo sanguíneo intestinal está sujeto a mecanismos reguladores tanto intrínsecos como extrínsecos, aumentando pronunciadamente la irrigación sanguínea tras la alimentación durante el proceso de la digestión. Los mecanismos intrínsecos involucrados en este proceso son el reflejo local a la presencia de contenido luminal, la liberación de hormonas gastrointestinales vasoactivas (gastrina, secretina y/o colecistoquinina) y el incremento del metabolismo intestinal (Granger y col., 1980). En cambio, el control neural extrínseco estaría gobernado principalmente por el sistema nervioso simpático, cuya actividad reduce la resistencia vascular de las arterias y arteriolas (las venas tienen una menor inervación simpática). Esta resistencia vascular a través del intestino determina el flujo mesentérico y, por tanto, el flujo venoso portal (Takala, 1996).

Dada la importancia metabólica de las VDP en el organismo y su mayor contribución al peso total en la raza Ibérica con respecto a razas magras o mejoradas, es necesario conocer el impacto de las mismas en la producción de calor total del animal. Actualmente la información existente sobre la contribución de las VDP al gasto energético total del cerdo Ibérico ha sido generada en nuestro laboratorio.

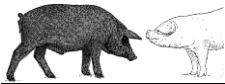


2.3.1.4. MEDIDA DEL METABOLISMO DE LAS VDP: MÉTODO DE LA DIFERENCIA ARTERIO-VENOSA

El método de Fick o de diferencia arterio-venosa posibilita el estudio *in vivo* del metabolismo de un órgano o tejido mediante la medición de la diferencia de concentración en los nutrientes y metabolitos que entran y salen del mismo (Irtun y col., 2001).

El principio de Fick (Fick, 1870) se basa en que si la concentración arterial y venosa de una sustancia X es constante, el flujo sanguíneo es constante y la captación (o liberación) de X es constante, entonces, la entrada de X a un tejido u órgano (determinado como el flujo multiplicado por la concentración arterial) es igual a la salida de X de ese tejido u órgano (flujo multiplicado por la concentración venosa) más el metabolismo del tejido u órgano de la sustancia X (donde el término del metabolismo del tejido es positivo si hay una captación y negativo si hay una liberación de la sustancia). Aplicando este principio podemos calcular el intercambio neto de nutrientes o el consumo de O₂ de las VDP multiplicando, durante un período de tiempo determinado, la diferencia de concentración arterio-venosa a través de estos tejidos por el flujo sanguíneo (Huntington y Reynolds, 1987). De esta manera, el flujo neto de un nutriente (a excepción de los AG de cadena larga que se transportan vía linfática) que es absorbido y que estará disponible para el animal puede ser determinado a partir de los procesos combinados de captación y liberación del nutriente por un tejido. Un flujo neto positivo indica en general síntesis o producción, mientras que un flujo neto negativo indica catabolismo o consumo de un nutriente (Prior y Gross, 1995) según la siguiente ecuación:

$$\text{Captación ó liberación de un metabolito} = (C_a - C_v) \times FS$$



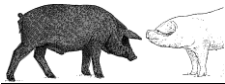
Donde C representa la concentración de ese metabolito en la arteria (C_a) o en la vena (C_v) que entra y sale, respectivamente, del órgano o tejido estudiado, y FS corresponde al flujo sanguíneo a través de ese órgano o tejido.

Sin embargo, tanto el metabolismo de un órgano o tejido (cambios en la captación o liberación de una sustancia) como el propio flujo sanguíneo varían según múltiples factores, tanto internos como externos. Zierler (1961) aplicó el principio de Fick en sistemas no estables, llegando a la conclusión de que era necesario tomar varias veces la diferencia arterio-venosa a lo largo del tiempo para poder conocer con precisión el metabolismo de un tejido u órgano y, por tanto, una única diferencia de concentración entre arteria y vena tendría sólo un valor relativo. La medición de esta diferencia es posible mediante la instalación de catéteres en los vasos sanguíneos que entran y salen del órgano (figura 2.5), esto es, la instalación quirúrgica de catéteres en la vía sanguínea aferente (de entrada) y eferente (de salida). La colocación adecuada del catéter es uno de los principales problemas de esta técnica (Defronzo, 1987).



Figura 2.5: Fotografía del muestreo sanguíneo en un cerdo Landrace según el método de la diferencia arterio-venosa (Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal, IFNA, EEZ, CSIC. Granada).

Un punto esencial en el método es que la muestra venosa constituya una buena representación de toda la sangre que salga del tejido u órgano y que no haya contaminación con sangre de venas procedentes de otros tejidos u órganos que no sean del objeto de estudio (Irtun y col., 2001). La cuantificación de la absorción de



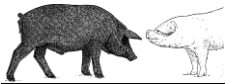
un nutriente usando este método presenta un coeficiente de variación mayor que, por ejemplo, la implantación de cánulas ileales; sin embargo, es una herramienta necesaria para estudios de dinámica de absorción tras la ingestión de la dieta (Bach Knudsen y col., 2006). Otros inconvenientes de la técnica para conseguir resultados aceptables son las complicaciones durante los procedimientos quirúrgicos, los cuidados post-operatorios, el adecuado mantenimiento de los catéteres y, principalmente, la correcta medición del flujo sanguíneo.

Resulta imprescindible determinar el flujo sanguíneo que atraviesa el tejido u órgano en estudio (Ten have y col., 1996). El método más empleado actualmente es la dilución en el torrente sanguíneo del ácido para-aminohipúrico (PAH), siendo utilizado en la mayoría de trabajos publicados para la medición del flujo sanguíneo portal (FSP) y/o hepático (figura 2.6).



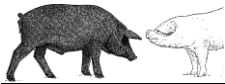
Figura 2.6: Fotografía de la infusión de para-aminohipúrico (Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal, IFNA, EEZ, CSIC. Granada).

Para la determinación del flujo portal, el PAH es infundido normalmente a través de la vena mesentérica (o la vena ilíaca, ambas drenan a la porta) con una concentración dependiente del tamaño del animal. Para aquellos animales con un PV igual o inferior a 250 kg la concentración de PAH oscila entre el 7 y el 10% (peso/volumen), con una tasa de infusión de 1 ml/min, mientras que si son animales más pesados (como el caso de vacas lecheras) requiere un 10% (peso/volumen)



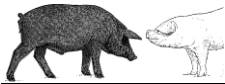
con una tasa mayor (2 ml/min) para alcanzar una concentración adecuada en sangre (Huntington y col., 1989). Según Ortigues y col. (1994) la dosis adecuada de PAH sería de 12 mg/kg PV y hora, posterior a una dosis inicial de 3,75 mg de PAH/kg PV. Huntington y col. (1989) infundían una primera dosis de PAH igual a 15 veces la tasa de infusión de mantenimiento por minuto (min), consiguiendo finalmente concentraciones de PAH en sangre arterial en torno a 20 mg/l. La recogida de muestras sanguíneas (1 ml por muestra) comenzaba entre 20 y 45 min después de la dosis inicial de PAH, dando tiempo así a la estabilización de su concentración en sangre. Yen y Killefer (1987) observaron que en cerdos el riñón era capaz de limpiar y establecer un equilibrio de PAH en el cuerpo, tal y como indicaron anteriormente Perry y Parker (1981) y, por tanto, era una técnica aplicable también para estos animales, así como ya se hizo anteriormente en ovejas o perros (Katz y Bergman, 1969).

Sin embargo, la medición del flujo con PAH también presenta algunos inconvenientes como el descrito por Reynolds y Huntington (1988) en bovinos, al sugerir que las variaciones en la medida del flujo sanguíneo de las VDP eran debidas a una inadecuada mezcla del PAH en la sangre como resultado de la corta longitud de la vena porta, y de las turbulencias creadas por la convergencia de las venas gastroesplénica y mesentérica. Otras fuentes de error pueden ser la mala elección del lugar de infusión o de colocación de los catéteres, lo que puede provocar una gran variabilidad en la medición del flujo sanguíneo (Isserty y Ortigues, 1994). Además, este método presenta limitaciones si se quieren detectar flujos pulsátiles o cambios en el flujo sanguíneo que ocurran en s o min (Eisemann y col., 1987). Debido a esto, hay autores que introducen ciertos cambios para lograr una medida más exacta del flujo sanguíneo. Una de estas mejoras es la infusión del PAH a través de varios puntos y de forma simultánea para una mejor mezcla del marcador, disminuyendo así las posibles variaciones en la medición del flujo sanguíneo, como las descritas por Reynolds y Huntington (1988), ocasionadas por una incompleta mezcla de la sangre procedente de la vena gastroesplénica y mesentérica (Hecker, 1974). Estos lugares de infusión varían según los autores. Hay descritas infusiones de ácido PAH empleando dos ramas distintas de la vena mesentérica (van der Meulen y col., 1997), dos ramas de la aorta abdominal



(Eisemann y col., 1987), la vena del bazo y la aorta abdominal (Ten have y col., 1996; Bruins y col., 2000) o una vena meséptica y una ruminal (Ortigue y col., 1994). La infusión múltiple del PAH está especialmente aconsejada en estudios que precisen la medición del flujo sanguíneo a través del hígado (Ortigue y col., 1994). Ushioda y col. (1982) recomiendan, además, la inclusión del corazón siempre que sea posible entre el lugar de infusión y el de muestreo para que tenga lugar una buena mezcla del indicador en la sangre.

Se ha demostrado que en ovejas una fracción del PAH es metabolizada a nivel hepático convirtiéndolo en PAH acetilado (Katz y Bergman, 1969). Más tarde, Isserty y col. (1998) demostraron que realmente existe una subestimación de la concentración del PAH de la sangre procedente de la vena hepática, estimándose en un 13% del ácido PAH infundido en ovinos y, en consecuencia, una sobreestimación del flujo sanguíneo a nivel del hígado y en particular de la arteria hepática. Para corregir esto, los mencionados autores recomendaban realizar una etapa de desacetilación en ácido clorhídrico a 90°C durante 60 min previa al análisis del ácido PAH. En cambio, Goetsch y col. (1994) no incluían esta etapa a la hora de determinar la concentración del ácido PAH en un estudio de absorción de nutrientes y consumo de O₂ llevado a cabo en ovejas. Según ellos, los errores potenciales derivados de la subestimación en la concentración del PAH parecen ser muy pequeños, puesto que la relación flujo sanguíneo arterial/venoso que obtuvieron en el hígado fue similar a la de otros estudios que sí incluían la etapa de desacetilación. En un trabajo reciente realizado en el Instituto Nacional de Investigación Agronómica de Francia (INRA), se hace hincapié en la realización de esta etapa de desacetilación cuando se determine PAH en plasma de vacuno y además, en la necesidad de preparar los patrones de PAH en una matriz de plasma del propio animal (Rodríguez-López y col., 2014). En nuestro laboratorio, hemos comprobado que es necesario igualmente, cuando se determina el PAH en plasma de cerdo, el preparar los patrones en plasma o suero de cerdo para evitar una subestimación del flujo sanguíneo (Fernández-Fígares, comunicación personal). En cerdos, son pocos los trabajos que incluyen esta etapa de desacetilación (Ten have y col., 1996; Bruins y col., 2000), no existiendo ninguno que refleje la necesidad de llevarla a cabo.

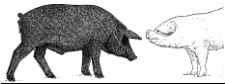


Uno de los factores que es necesario tener en cuenta es el nivel de ingesta, además de la composición de la dieta, puesto que influyen en el tiempo inicial de aparición del nutriente objeto de estudio en la vena porta (Rérat y col., 1984). Por ejemplo, en cerdos se ha comprobado que las diferencias porto-arteriales sólo desaparecen transcurridas entre 20 y 22 horas tras la ingestión de cebada y trigo, respectivamente (Rérat, 1981). Si no existe un tiempo suficiente de ayuno previo a la ingestión pueden quedar restos de alimento en el intestino grueso. La llegada de nuevo alimento a un tubo digestivo aún no vaciado del todo podría no provocar la hiperemia tan marcada que se produce tras un ayuno más prolongado (Rérat y Vaissade, 1993), lo que conllevaría a errores al considerar tales niveles como basales. Un periodo de ayuno prolongado antes del experimento tampoco es aconsejable porque se puede inducir un aumento en la velocidad del vaciado gástrico al suministrar la dieta experimental (Rérat y col., 1984). También hay que considerar la postura del animal durante el muestreo, puesto que el flujo sanguíneo parece ser dependiente del comportamiento del animal, lo que podría alterar los estudios de cuantificación de absorción de nutrientes (Ellis y col., 1995). Por ello es aconsejable que los animales estén habituados al contacto humano antes de comenzar con las extracciones sanguíneas, para que mantengan durante todo el experimento un comportamiento relajado, lo que se reflejará en la calidad de los resultados. Además, para evitar posibles errores por pequeñas variaciones en la dilución del ácido PAH infundido entre el muestreo sanguíneo venoso y arterial, es necesario realizar ambos muestreos de forma simultánea.

En definitiva, la técnica de la diferencia arterio-venosa es adecuada para el estudio de la cinética de captación de nutrientes, la cual puede ser determinada a partir de variaciones en la concentración de nutrientes entre la sangre aferente y eferente de las VDP.

2.3.1.5. GASTO ENERGÉTICO TOTAL

La energía es el principal factor limitante en producción animal. Su disponibilidad afecta a la adaptación de los animales a su entorno, al comportamiento e incluso la estrategia de alimentación (Lachica, 2008). Los

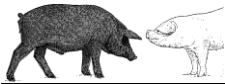


animales producen calor a partir de una variedad de procesos metabólicos como el mantenimiento, la termorregulación, la actividad física y la producción. En cerdos, la producción de calor representa más del 50% de la energía ingerida (van Milgen y Noblet, 2000).

El principal objetivo del metabolismo de los macronutrientes es producir la energía necesaria para el organismo. La vía más común de extracción de la energía química de un sustrato es su oxidación completa a dióxido de carbono (CO_2) y agua. Así pues, el destino final de los combustibles celulares (hidratos de carbono, grasas, y proteínas) es su oxidación. El término *producción de energía* se refiere a la conversión de energía libre química de los nutrientes en energía química del ATP y calor. En las combustiones biológicas se genera calor que es utilizado para mantener la temperatura corporal pero debido a su isotermita, el cuerpo no puede usar calor para realizar el trabajo. La energía química obtenida de los sustratos oxidables es transportada por moléculas (ATP) que la transfieren como energía libre para realizar trabajo químico (biosíntesis), osmótico (transporte activo) y mecánico (contracción muscular) (Ferranini, 1988). Finalmente, sin embargo, toda la energía se convertirá en calor. En este sentido, por lo tanto, el calor y la energía pueden ser utilizados como sinónimos.

Así se hace evidente que nuestras vidas dependen de la conversión de energía química en otras formas de energía y estas conversiones energéticas no constituyen una excepción al principio general de conservación de la energía o primera ley de la termodinámica (Fiorito y Chevallier, 2001). Ésta puede enunciarse del modo siguiente: “La energía no se crea ni se destruye, por lo que, en cualquier proceso termodinámico, la cantidad total de energía se mantiene constante”. De la propia definición se deduce de lo incorrecto del término “gasto energético” debiéndose utilizar el de “producción de calor” o, mejor aún, “transferencia de energía”, si bien el primer término es el normalmente usado por la comunidad científica internacional.

Resulta de especial interés la aplicación de este principio a los procesos que relacionan el trabajo y el calor que intercambia un sistema u organismo con su entorno, y la energía total que es capaz de almacenar (energía interna, U). Dichos parámetros están relacionados mediante la siguiente ecuación:



$$\Delta U = Q - W$$

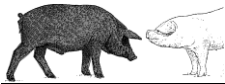
Donde ΔU es la variación de la energía interna de un sistema desde un estado inicial a uno final, Q es la suma de calor intercambiado entre el sistema y su entorno a lo largo de ese cambio de estado, y W es el trabajo realizado por el sistema o sobre éste.

El sistema ganará energía si el calor absorbido es mayor que el trabajo realizado o si el calor perdido es menor que el trabajo que se realiza sobre él. Mediante la aplicación de este principio se puede conocer, por ejemplo, cuánta de la energía ingerida por el animal queda disponible para mantenimiento y producción sin recurrir al sacrificio final del animal y los laboriosos análisis posteriores. Para ello, basta con determinar la producción de calor del organismo en reposo.

En los animales de granja las necesidades de energía se dividen básicamente en dos: mantenimiento y producción (crías, carne o leche, principalmente).

El mantenimiento puede definirse como el estado en el cual no hay ni pérdida ni ganancia de energía por el organismo. Las necesidades para el mantenimiento son la cantidad de nutrientes necesarios para conseguir ese estado de equilibrio en el organismo, aunque en animales en crecimiento es difícil de determinar puesto que, además de la energía para el mantenimiento, precisan energía extra para el crecimiento de los tejidos.

En cerdos en crecimiento, bajo condiciones normales de alimentación, la principal fuente de energía son los hidratos de carbono, seguidos de la proteína. Juntos proporcionan la energía suficiente para cubrir las necesidades de mantenimiento y crecimiento, mientras que, en general, la grasa de la dieta no necesita ser oxidada y es depositada (Chwalibog y Thorbek, 2000). Durante el ayuno, la movilización de las reservas de grasa llega a ser la principal fuente de energía, seguida por la oxidación de las proteínas. Con la realimentación, dejan de



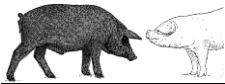
utilizarse las reservas de grasa y proteína del organismo, usándose los nutrientes de la dieta (Chwalibog y col., 2004).

El metabolismo puede ser definido como la suma de todos los procesos o reacciones bioquímicas, es decir, la suma de todas las transformaciones de materia y energía que ocurren en un organismo vivo. Es imposible medir la totalidad de estos procesos. Sin embargo, sí es posible medir la tasa de calor producido por las distintas reacciones químicas que se llevan a cabo en el organismo. Asimismo, como las reacciones químicas que conforman el metabolismo, en general, dependen de oxidaciones biológicas, medir la tasa de consumo de oxígeno nos da un panorama bastante aproximado de la tasa de producción de calor o tasa metabólica (Fiorito y Chevallier, 2001).

La técnica que permite medir este calor se denomina *calorimetría*, basada a su vez en la ley de Hess: “si una reacción puede producirse en varias etapas, reales o teóricas, su variación de entalpía (ΔH) es igual a la suma de las entalpías de reacción de estas reacciones intermedias”. Así, si una reacción *a* puede considerarse como suma de otras reacciones *b*, *c*, *d*, etc., se cumplirá:

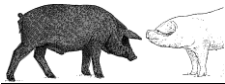
$$\Delta H_a = \Delta H_b + \Delta H_c + \Delta H_d + \dots$$

De esta manera, al medir el calor producido estamos incluyendo todos los procesos metabólicos en los que se genera calor durante un período de tiempo determinado como, por ejemplo, tras la ingestión de una cantidad conocida de alimento. La medición de la producción de calor puede realizarse por calorimetría directa o indirecta. Según Kleiber (1975): “la calorimetría directa mide la pérdida de calor; la calorimetría indirecta mide la producción de calor de un animal”. Elegir la medición de la producción de calor por calorimetría directa o indirecta dependerá del objetivo final del estudio. Es preferible utilizar la calorimetría directa cuando interese saber si un proceso en concreto está teniendo lugar y cómo de rápido, mientras que el uso de la calorimetría indirecta estaría recomendado en aquellos casos en los que interese conocer la razón o razones de la pérdida de calor observada (Lamprecht y



Schmolz, 1999). La primera determina el calor disipado entre el animal y el calorímetro y entre éste y los sistemas analíticos, calor que se disipa por evaporación en la piel y los pulmones así como por radiación, conducción y convección de la superficie corporal y por excreción de orina y heces (Jéquier, 1985). El principio de la calorimetría indirecta se basa en que todos los procesos metabólicos finalmente dependen de la oxidación biológica, es decir, de la oxidación que se produce en la célula. Es por ello que medir la tasa de consumo de oxígeno, nos acerca a una buena estimación de la tasa de producción de calor, o tasa metabólica. Así, una alta capacidad para consumir y utilizar O_2 indica una alta capacidad metabólica (Fiorito y Chevallier, 2001). El cálculo de la producción de este calor metabólico se realiza midiendo el consumo de O_2 y la producción de CO_2 del individuo objeto de estudio. Por tanto, la producción de calor en animales puede determinarse conociendo el sustrato metabolizado, en combinación con la medida del consumo de O_2 y la producción de CO_2 asumiendo que todo el oxígeno es usado para oxidar los sustratos degradables y que todo el CO_2 producido es recuperado (Ferranini 1988) para su medida. Una vez medida la tasa de consumo de O_2 y la de producción de CO_2 , se multiplica por el equivalente térmico estimado del intercambio respiratorio de gases (J/l). Sin embargo, los equivalentes térmicos tanto del consumo de O_2 como de la producción de CO_2 no son constantes, dependiendo de la proporción de lípidos, hidratos de carbono y proteínas que sean catabolizados. Para estimar estos equivalentes térmicos, se asumen tres supuestos: la catabolización exclusiva de lípidos en situaciones de ayuno, la catabolización de nutrientes en proporción a su abundancia en la dieta, y la relación de hidratos de carbono/lípidos oxidados determinada por el cociente respiratorio o RQ (respiratory quotient; Walsberg y Hoffman, 2005).

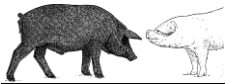
El RQ expresa los moles de CO_2 producidos con respecto a los moles de O_2 consumidos por el animal. El catabolismo exclusivo de hidratos de carbono y de grasas tiene un RQ de 1,0 y 0,7, respectivamente. A diferencia de estos sustratos, la oxidación de la proteína es un proceso incompleto produciéndose urea en los mamíferos, la cual es excretada a través de la orina. Suponiendo que se excrete como urea todo el nitrógeno de la proteína catabolizada, el valor del RQ para el catabolismo proteico se situaría en torno a 0,8 (Kleiber, 1961). Valores de RQ por encima de 1 son bastante comunes en animales en crecimiento alimentados con



dietas bajas en grasas y altas en hidratos de carbono, donde el exceso de hidratos de carbono se oxidaría y la energía producida se utilizaría para el almacenaje de grasas. Por su parte, valores entre 0,7 y 0,8 indicarían un estado de ayuno con oxidación de grasas y proteínas corporales. El RQ depende por tanto de la dieta y del estado fisiológico del animal, siendo más bajo en animales en ayunas que en animales que no lo están. Sin embargo, estas suposiciones no siempre reflejan el metabolismo real que tiene lugar en el organismo, puesto que en condiciones de ayuno pueden catabolizarse igualmente otras sustancias además de grasas y proteínas, desarrollarse de forma simultánea al catabolismo procesos de síntesis que consuman O₂ o produzcan CO₂, producirse una incompleta oxidación de los nutrientes (como la producción de cuerpos cetónicos durante el catabolismo de los lípidos) o que haya un lapso de tiempo entre el CO₂ producido y el exhalado durante un intervalo dado. Es por ello que el valor del RQ debe interpretarse con precaución, aunque es un buen indicador de la normalidad del metabolismo de los organismos (Kleiber, 1961).

Las cámaras de respirometría existentes en el Departamento de Nutrición Animal de la Estación Experimental del Zaidín siguen el principio de calorimetría indirecta pudiéndose realizar mediciones tanto en circuito abierto como en confinamiento (Aguilera y Prieto, 1986; Lachica y col., 1995). Para las mediciones en circuito abierto una corriente de aire procedente del exterior es bombeado continuamente al interior de la cámara y sale de ella como resultado de la acción de una bomba de succión situada en el circuito de salida de la cámara (Lachica, 1993). Para la medida del gasto energético es necesaria la determinación precisa del caudal de aire en condiciones estándar (1 atmósfera y 0°C) que abandona la cámara y de las concentraciones de CO₂ y O₂ en el aire que entra y sale de ella, y a partir de esto, y por la transformación de Haldane, el volumen de aire que penetra en la cámara. La siguiente ecuación muestra las operaciones realizadas por la transformación de Haldane:

$$V_{aire\ entrada} \times [N_2]_{entrada} = V_{aire\ salida} \times [N_2]_{salida}$$



$$V_{\text{aire entrada}} = \frac{V_{\text{aire salida}} \times [N_2]_{\text{salida}}}{[N_2]_{\text{entrada}}}$$

Donde V es el volumen (l) del aire que entra o sale de la cámara.

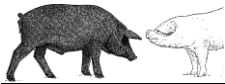
La diferencia entre estas concentraciones determina la cantidad de O₂ y CO₂ alterada por el metabolismo del individuo objeto de estudio (Ravussin y col., 1986).

Para la determinación de la producción de calor total, se procedió a la medición en cámaras de respirometría, tras 18 horas de adaptación, de la cantidad total de O₂ consumido y CO₂ producido bajo las mismas condiciones experimentales en las que tuvo lugar la medición de la diferencia arterio-venosa de O₂. Se determinó por calorimetría indirecta empleando cámaras de respirometría en confinamiento (Lachica y col., 1995). El RQ determinó los moles de CO₂ producidos con respecto a los moles de O₂ consumidos por el animal. La calorimetría indirecta además de proporcionar una estimación de la tasa metabólica y de la composición de los combustibles oxidados tiene la ventaja de ser un método no invasivo. Sin embargo, es importante comprender y tener en cuenta que existen limitaciones y errores en calorimetría indirecta, ya sea en términos de técnicas de medición (pérdida, dilución o adición de gases) como en supuestos asumidos (tratamiento del O₂ y CO₂ como gases ideales). Desafortunadamente la asunción tanto de supuestos teóricos como prácticos se hace necesaria para traducir las mediciones del intercambio gaseoso en unidades de producción de calor y utilización de combustible. A pesar de las limitaciones, la correlación entre calorimetría directa e indirecta ha sido claramente demostrada, por lo que esta técnica de medición es válida y técnicamente fiable (Fiorito y Chevallier, 2001).

2.3.2. CULTIVO *IN VITRO* DE HEPATOCITOS

2.3.2.1. TIPOS CELULARES DEL HÍGADO

Los hepatocitos o células parenquimales constituyen el 65% del número total de células hepáticas y debido a su gran tamaño ocupan el 80% del volumen total



(Weibel y col., 1969, Greengard y col., 1972; Blouin y col., 1977; Drochmans y col., 1978; Fawcett, 1994) y el 90% de la masa celular del hígado (Hierro Delgado, 2009). Mientras que las células hepáticas no parenquimales (colangiocitos, células Kupffer, sinusoidales, estrelladas y ovals) constituyen aproximadamente el 35% de las células y el 10% del volumen del órgano. Todas estas células están englobadas por un esqueleto de fibras de colágeno que compone los espacios extracelulares y que confiere en parte el volumen que presenta el órgano (Bonacini, 1992). Junto con las fibras de colágeno, la laminina, fibronectina y proteoglicanos formarían la denominada *matriz extracelular*.

Aunque las células hepáticas no parenquimales juegan un papel importante en varios aspectos de la fisiología del hígado, los hepatocitos exhiben una complejidad y diversidad de funciones sin igual. Producen la mayoría de las proteínas plasmáticas circulantes (albúmina, ceruloplasmina, transferrina, y lipoproteínas), inhibidores de proteasas (α 1-antitripsina, antitrombina, y α 2-macroglobulina), factores de coagulación de la sangre (fibrinógeno, protrombina, los factores V, VII, IX, X, etc), así como moduladores de los complejos inmunes e inflamación (proteína del complemento C3, proteína C reactiva). Controlan la homeostasis de combustibles energéticos como glucosa, glucógeno y AG, incluyendo triglicéridos (TG), así como otros compuestos esenciales como el colesterol, ácidos biliares, y vitaminas A y D. Metabolizan aminoácidos, metales (Cu y Fe) y compuestos como la bilirrubina. Además, los hepatocitos juegan un papel crítico en la eliminación de xenobióticos como contaminantes ambientales (plantas, hongos, toxinas, pesticidas, herbicidas, derivados de las combustiones domésticas e industriales, disolventes orgánicos, colorantes, conservantes, etc) y drogas (Maurel, 2010).

2.3.2.2. ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL TEJIDO HEPÁTICO

Los hepatocitos forman láminas fenestradas que se disponen en forma radiada en torno a una vena central hepática o vena centrolobulillar, considerándose a esta formación irregularmente hexagonal la unidad histológica básica hepática denominada lóbulillo hepático (Ayala y col., 1997; figura 2.7).

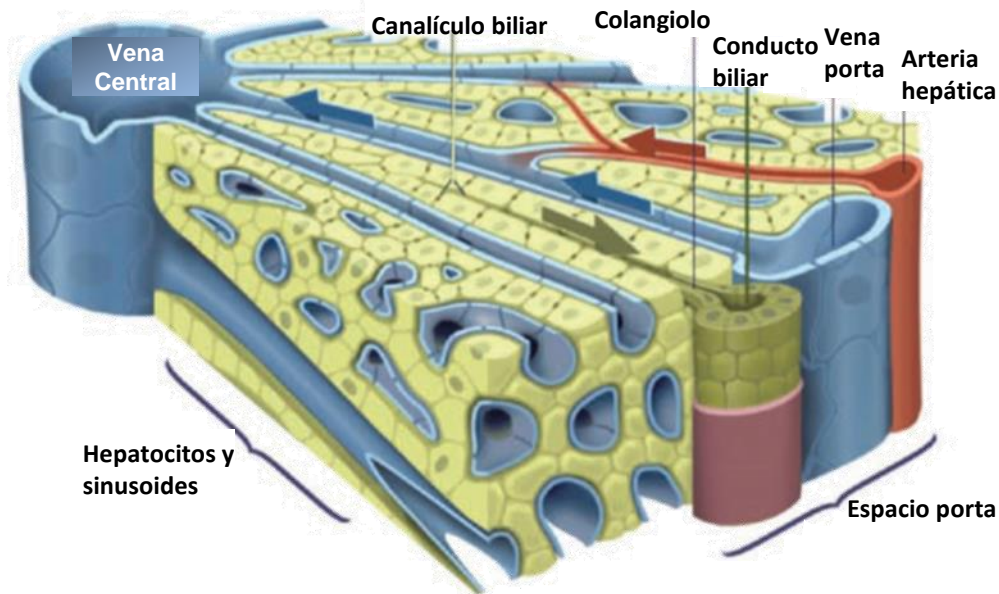
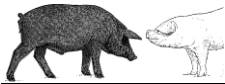
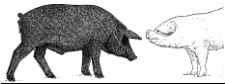


Figura 2.7: Sección de lobulillo hepático (Treyer y Müsch, 2013).

La periferia del lóbulo es demarcada por espacios porta o tríadas que son áreas triangulares situadas en los ángulos de los lobulillos hepáticos, constituidas por un estroma conjuntivo laxo y que contienen en su interior una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta, un capilar linfático y un conductillo biliar (Otero y Sierra, 2003) como se muestra en la figura 2.7.

La circulación hepática y portal confluyen en los sinusoides que se disponen entre las láminas de hepatocitos. El flujo sanguíneo a través de los sinusoides es unidireccional; los sinusoides drenan su contenido a la vena hepática central, de ésta la sangre pasa a las venas hepáticas derecha e izquierda, y finalmente a la vena cava inferior. La pared de los sinusoides está formada por una capa discontinua de células endoteliales fenestradas que carecen de membrana basal. Este hecho favorece una alta permeabilidad y que los nutrientes puedan intercambiarse con facilidad entre la sangre y el hepatocito (Babb, 1992). Entre la pared de los sinusoides y las láminas de hepatocitos, se encuentra el espacio de Disse ocupado por una red de fibras reticulares y plasma sanguíneo que baña libremente la superficie de los hepatocitos. Aquí tiene lugar el intercambio



metabólico entre los hepatocitos y el plasma. Además se encuentran células acumuladoras de grasa o células de Ito (Otero y Sierra, 2003).

La unidad funcional es el acino hepático (figura 2.8), considerado como una pequeña masa parenquimatosa de tamaño y forma irregular, organizada entre dos venas centrolobulillares y cuyo eje consiste de una arteria hepática, vena porta, conducto biliar, vasos linfáticos y nervios (Ayala y col., 1997; Bankey, 1996; Barie y Fischer, 1995).

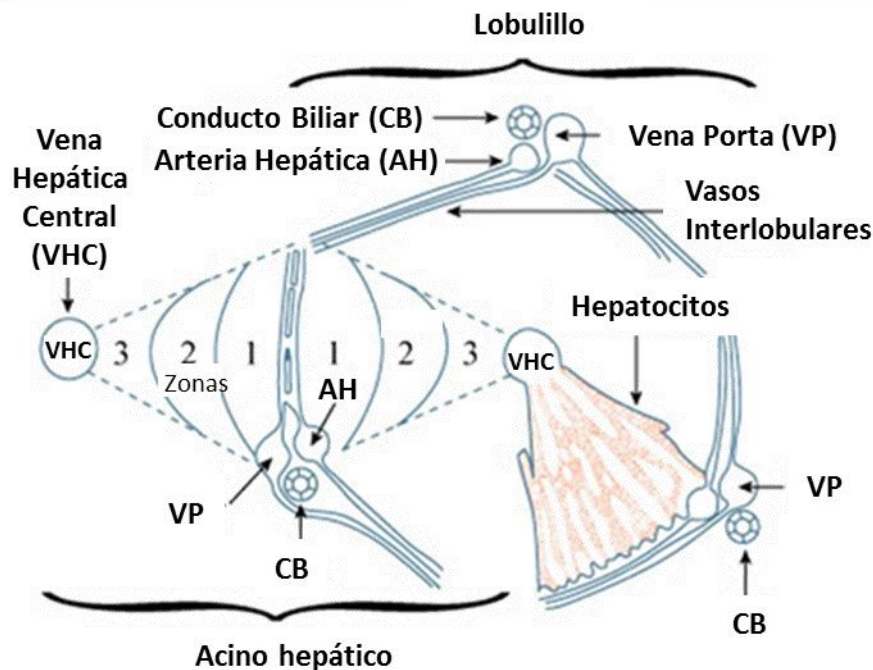
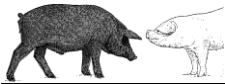


Figura 2.8: Acino hepático (Fuente: <http://ocw.mit.edu>).

Funcionalmente puede ser dividido en tres zonas: 1, 2 y 3 (Otero y Sierra, 2003). Los hepatocitos de la zona 1 reciben la sangre con el más alto contenido de oxígeno, nutrientes, ciertas hormonas intestinales y del páncreas por lo cual están adaptados a una alta actividad metabólica y oxidativa, caracterizados ultraestructuralmente por grandes mitocondrias, abundantes lisosomas y aparatos de Golgi. Entre sus múltiples actividades, destaca la gluconeogénesis (GNG), la beta oxidación de AG, la síntesis de urea y de colesterol, secreción biliar y catabolismo de



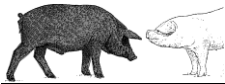
aminoácidos. Los hepatocitos de la zona 2 con una menor actividad metabólica reciben sangre con un contenido de oxígeno intermedio entre la zona 1 y 3. Los de la zona 3 reciben sangre con la menor concentración de oxígeno y tienen una alta concentración de sistemas enzimáticos de biotransformación tales como NADPH y citocromo P450. Son el lugar de detoxificación y biotransformación de muchos medicamentos y xenobióticos mediante mono-oxidación seguida de conjugación con ácido glucurónico o sulfúrico (Arthur e Iredale, 1993; Ayala y col., 1997). Por lo mencionado, es una zona predispuesta a lesiones por radicales libres y hepatotoxinas. Estos hepatocitos sintetizan glutamina, retiran amonio y también producen glicólisis y lipogénesis (Ayala y col., 1997).

La heterogeneidad funcional de los hepatocitos depende tanto de su ubicación anatómica dentro del acino como de factores genéticos. Funciones metabólicas tales como GNG, glicólisis y cetogénesis son dependientes del microambiente de la sangre a lo largo del sinusoides pero para otras, como el citocromo P450 que depende de factores genéticos (Arthur e Iredale, 1993; Ayala y col., 1997). Sin embargo, aunque sus funciones, estructura y forma dependen de su ubicación anatómica y genética, cada hepatocito individual tiene potencial para realizar todas las funciones (Alexander, 1998).

2.3.2.3. EVOLUCIÓN DE LA TÉCNICA DE AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS

Las funciones específicas del hígado son difíciles de evaluar *in vivo* debido a la interferencia que crea la actividad simultánea de otros órganos. Numerosos estudios se han realizado con el fin de superar este obstáculo y encontrar un sistema simple que imite lo mejor posible la actividad del hígado *in vivo*. Para este propósito, una serie de sistemas han sido ensayados por la comunidad científica: hígados aislados y perfundidos, explantes, células aisladas o incluso partículas subcelulares.

Aunque un hígado perfundido es la situación más parecida al animal completo, tiene la desventaja de que sólo se puede mantener de forma viable durante unas pocas horas, y en el caso de animales del tamaño del cerdo, la cantidad de medio que habría que perfundir haría prohibitiva la experimentación (Caperna y col., 1985).



Los explantes se utilizaron con mucha frecuencia hasta los años 50, pero con este sistema el periodo experimental también es limitado y los daños sufridos por el tejido son tan grandes que los resultados obtenidos son poco fiables (Ichihara y col., 1982).

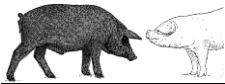
Inicialmente, la idea de separar en el hígado los hepatocitos firmemente conectados unos a otros no fue tarea fácil y todos los esfuerzos condujeron a preparaciones dañadas (Berry y Simpsons, 1962). La causa de esos fracasos se debió principalmente a una falta de conocimiento de las propiedades de los distintos componentes implicados en la adhesión celular.

Durante muchos años la tripsina fue el único enzima utilizado en este campo (Moscona, 1952) hasta que Mandl y col. (1953) aislaron y caracterizaron la colagenasa a partir de *Clostridium histolyticum*. Lasfargues (1957) utilizó este enzima para la separación celular durante el cultivo de epitelio mamario normal, y en 1961 la colagenasa ya fue preparada a escala comercial por Worthington Biochemical Corporation. Seis años más tarde, Howard y col. (1967) consiguieron el aislamiento de hepatocitos intactos de hígado de rata.

Howard y Pesch (1968) aislaron células parenquimales a partir de cortes en láminas de tejido hepático mediante digestión con colagenasa y al año siguiente Berry y Friend aislaron células mediante perfusión del hígado con colagenasa, aumentando 10 veces el rendimiento celular. Estas células conservaron muchas de las funciones específicas del hígado, como la ureogénesis y la GNG.

Gracias al desarrollo de esta nueva forma de preparación de alta producción (Berry y Friend, 1969), la técnica ha ido evolucionando y, desde entonces, muchas mejoras han sido hechas, aunque no ha sufrido grandes modificaciones con respecto a la original.

Tal vez la única modificación importante introducida ha sido el empleo del procedimiento de dos etapas, originalmente ideado por Seglen (1972,1976), en el que la perfusión del hígado se realizaba inicialmente por un medio libre de Ca^{2+} y era seguido por una perfusión con la enzima colagenasa que contiene medio enriquecido en Ca^{2+} .



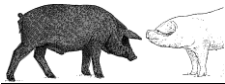
Al desarrollo de la técnica han colaborado también los aportes significativos de un gran número de investigadores de diferentes campos de investigación (Williamson y col., 1976; Berry y col., 1983): bioquímica, biología celular, microbiología, histología y microscopía electrónica.

2.3.2.4. AISLAMIENTO DE CÉLULAS HEPÁTICAS Y OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES

Podemos decir que los procesos básicos para el aislamiento de células hepáticas son:

1. Exposición de los hepatocitos a un medio pobre en Ca^{+2} .
2. Digestión con enzimas proteasas como la colagenasa.
3. Rotura por medios mecánicos.

Aunque la ruptura mecánica provoca daños en las células, es un proceso esencial en el proceso de separación celular previa al cultivo en monocapa. Debemos señalar que una vez separadas, las células son relativamente resistentes a daños mecánicos. Por otra parte, el Ca^{2+} es un ión que juega un papel muy importante en el mantenimiento de la integridad de estructuras celulares involucradas en la adhesión entre células contiguas. Estas estructuras de unión se denominan desmosomas o *mácula adherens* y están localizadas en zonas de invaginación de la membrana plasmática y vacuolas, o bien hemidesmosomas cuando se limitan a zonas de la lámina basal. Dichas estructuras constituyen los principales puntos afectados al inicio de la disgregación celular en el aislamiento de hepatocitos durante el proceso de perfusión del medio. La falta de Ca^{2+} en el medio de perfusión, ya sea por el empleo de una solución de baja concentración del ión o adicionalmente por la introducción de un agente quelante de Ca^{2+} , provoca daños irreversibles en estos complejos de unión, lo que produce la separación entre células adyacentes. Sin embargo, esta rotura no es instantánea. Un tiempo de perfusión inadecuado puede promover la restauración de los depósitos de Ca^{2+} y ocasionar la readhesión celular durante el proceso de disgregación de las células, dando lugar a



una suspensión celular dañada (Seglen, 1972; Wittenberg y col., 1986). Sin embargo, el Ca^{2+} es esencial en la actividad de la enzima colagenasa. Por tanto, la utilización de un agente quelante del Ca^{2+} o bajas concentraciones del ión durante la perfusión con la colagenasa disminuiría drásticamente su actividad.

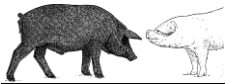


Figura 2.9: Fotografía de lóbulo hepático porcino canulado (EEZ, CSIC. Granada).

De este modo surge la técnica de aislamiento en 2 pasos, introducida inicialmente por Seglen (1976), la cual consta de una perfusión inicial del hígado con un medio bajo en Ca^{2+} (figura 2.9) para promover la rotura irreversible de desmosomas y hemidesmosomas, seguida de un medio de perfusión rico en Ca^{2+} y colagenasa.

2.3.2.5. CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS

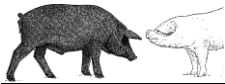
Como se ha mencionado anteriormente, el cultivo de células comienza a partir de una disgregación celular, ya sea a partir de medios enzimáticos o mecánicos, de un tejido u órgano que ocasiona una suspensión de células aptas para el cultivo. Una vez que se obtiene la suspensión celular, ésta puede cultivarse fundamentalmente de dos formas diferenciadas en función de la distribución que adquieren en el medio de cultivo: en monocapa adherente o en suspensión.



El crecimiento en monocapa implica una adhesión de las células al sustrato base o matriz extracelular para comenzar con la proliferación dentro del cultivo. La mayor parte de las líneas celulares son anclaje-dependientes, es decir, que no inician la proliferación hasta que se han adherido al sustrato a diferencia de las células hematopoyéticas maduras, algunas líneas celulares transformadas y de células procedentes de tumores, cuyo crecimiento es en suspensión. En la presente Tesis Doctoral el cultivo en monocapa ha sido el utilizado para el estudio *in vitro* con células de hígado porcino.

Desde los años 70 se realizaron numerosos estudios bioquímicos utilizando cultivos primarios de hepatocitos. Éstos se hacían generalmente con células aisladas de hígados perinatales por tripsinización y cultivadas durante largos períodos experimentales. Como consecuencia, se observó que conservaban pocas características funcionales del hígado (Ichihara, 1975). Aún es controvertido el hecho de si las líneas celulares establecidas perdieron las características de los hepatocitos durante el cultivo a largo plazo, o si las líneas se establecieron a partir de células hepáticas inmaduras o células no parenquimatosas. Estas células fueron en su mayoría transformadas y mostraron desviación en el número de cromosomas (Ichihara y col., 1982). En estos estudios también pudo observarse que las células aisladas pueden incubarse simplemente en solución salina durante unas pocas horas, pero que en los estudios sobre regulación metabólica, particularmente control hormonal, se requieren periodos de incubación de más de 24 horas. Además, Sato y col. (1975) demostraron que los diferentes tipos celulares requerían distintas mezclas de hormonas y factores de crecimiento para crecer en medios libres de suero (Hayashi, 1976).

En estos primeros cultivos pudo observarse que en los hepatocitos recién aislados las funciones estaban muy deterioradas: el recambio proteico era catabólico, la síntesis de proteínas plasmáticas era baja y las inducciones hormonales de algunas enzimas en las células eran pobres (Kato y col., 1979). Estas alteraciones funcionales se debían a que las membranas celulares se dañaban por la digestión con colagenasa. Se ha podido observar que este daño es reparado casi totalmente cuando las células se cultivan en monocapa durante 24 horas. Por ejemplo, funciones de la membrana plasmática tales como el número de



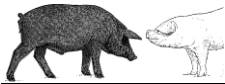
receptores de insulina y la actividad de la 5'-nucleotidasa se ven reducidos aproximadamente a la mitad de los niveles normales en las células recién aisladas, pero éstos vuelven a su estado normal tras 24 horas en cultivo, mientras que las actividades leucina aminopeptidasa y fosfatasa alcalina no se ven afectadas (Ichihara y col., 1982).

Gurr y Potter (1980) observaron al estudiar el deterioro de la sensibilidad a glucagón en las células recién aisladas, que los cultivos en monocapa son más sensibles a las hormonas que las suspensiones celulares. Para ello compararon la inducción de la tirosina transaminasa y la formación de AMPc tanto en suspensiones como en cultivos en monocapa. Además, vieron que las células recién aisladas seguían mostrando funciones similares a las observadas *in vivo* un día después del aislamiento, pero que éstas desaparecían gradualmente durante el cultivo.

A partir de estas observaciones se puede concluir que los hepatocitos aislados deben cultivarse durante al menos un día para normalizar sus funciones antes de que sean utilizados en los experimentos. Por otro lado, las células hepáticas aisladas de un tejido u órgano para cultivo, denominado primario, son viables durante varios días y los datos experimentales que se obtienen son extrapolables al órgano completo (Caperna y col., 1985).

2.3.2.6. PROCESOS METABÓLICOS HEPÁTICOS ESTUDIADOS

El hígado ocupa un lugar de primera importancia en la regulación del metabolismo energético del organismo. Recibe a través de la vena porta la mayor parte de los productos de absorción intestinal (hidratos de carbono, aminoácidos y AG de cadena corta) y productos resultantes del catabolismo bacteriano de los nutrientes (amonio, fenoles, mercaptanos, AG de cadena corta y aminas aromáticas). Estos compuestos sufren diversos procesos metabólicos: captación, interconversión, almacenamiento y procesos de biotransformación en el hígado. De este modo, controla la distribución de nutrientes al resto del organismo e impide que la sangre que drena a la vena cava esté provista de productos tóxicos provenientes de la sangre portal (Martínez Blasco, 2012).



2.3.2.6.1. GLUCONEOGÉNESIS Y DEGRADACIÓN DE GLUCÓGENO

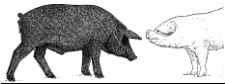
El hígado juega un papel crucial en el mantenimiento de la homeostasis de los niveles de glucosa en la sangre. Es capaz de liberar glucosa a la circulación proveniente de sus reservas de glucógeno y de convertir fragmentos de 3 carbonos (lactato, piruvato, glicerol y aminoácidos) en glucosa. Por tanto, la glucogenólisis hepática junto a la GNG son los dos procesos responsables de la producción hepática de glucosa. Un equilibrio dinámico entre los dos sirve para mantener los niveles de glucosa en sangre dentro de un rango estrecho en condiciones fisiológicas muy cambiantes (Wahren y Ekberg, 2007).

2.3.2.6.2. SÍNTESIS DE TRIGLICÉRIDOS

Tras la digestión y absorción de nutrientes, el hígado tiene un importante papel en el mantenimiento de la homeostasis lipídica. Los AG pueden sufrir esterificación con glicerol para producir TG y ser transportados como lipoproteínas en la sangre para ser depositados en otros tejidos como el tejido adiposo, funcionando como almacenes de energía (Go y col., 2013), o convertirse en cuerpos cetónicos vía β -oxidación. Cuando el suministro de glucosa en la dieta es superior a su demanda, parte de la misma puede dar lugar a AG (lipogénesis *de novo*). La síntesis de hepática de TG es más importante que la del tejido adiposo en cerdos jóvenes pero su magnitud decrece con la edad en favor del tejido adiposo (Fenton y col., 1985; Gondret y col., 2001).

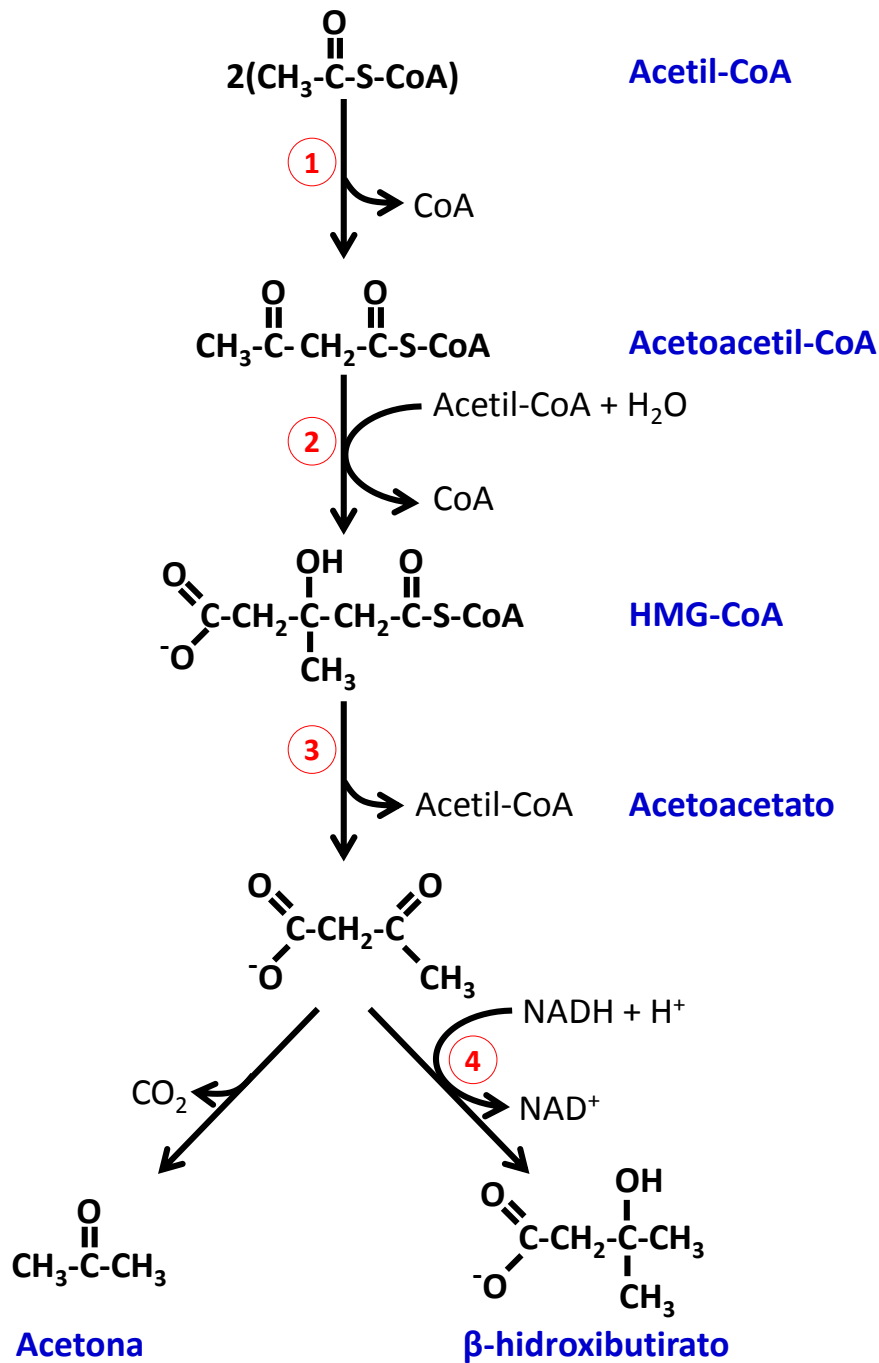
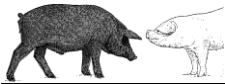
2.3.2.6.3.-SÍNTESIS DE β -HIDROXIBUTIRATO

El β -hidroxibutirato es un combustible metabólico importante para muchos tejidos periféricos como el corazón, el músculo esquelético y el sistema nervioso central especialmente (Veech y col., 2001). Bajo circunstancias normales el cerebro utiliza sólo glucosa como fuente de energía, pero en determinadas situaciones



(ayuno, diabetes, neonatos lactantes) los cuerpos cetónicos se transforman en la fuente principal de combustible (Nehlig y Pereira, 1993; Hashim y VanItallie, 2014). Su oxidación genera acetil-CoA destinado a alimentar la oxidación en el ciclo de Krebs, dando lugar, en último término, a ATP para suplir las demandas energéticas de la célula (Laffel, 1999).

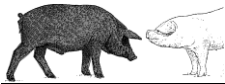
Con el objetivo de mostrar estos procesos de la manera más clara posible se describen brevemente los procesos de síntesis y catabolismo de los cuerpos cetónicos. La mayor parte del acetoacetato, que es la fuente principal de los demás cuerpos cetónicos (figura 2.10), procede de la condensación de tres moléculas de acetil-CoA que dan lugar a 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA). Este acetil-CoA puede provenir del catabolismo de los aminoácidos cetogénicos, de la descarboxilación oxidativa del piruvato y de la β -oxidación de los AG. Después, el HMG-CoA libera acetil-CoA (mediado por la HMG-CoA liasa), formándose acetoacetato (Nelson y Cox, 2009). El catabolismo de leucina, lisina, fenilalanina, tirosina y triptófano también genera acetoacetato, que puede incorporarse a la vía de la cetogenia en este punto. El acetoacetato se descarboxila espontáneamente, dando lugar a acetona, o bien es reducido por la β -hidroxibutirato deshidrogenasa a β -hidroxibutirato. Esta última reacción requiere $\text{NADH}+\text{H}^+$ como pareja de óxido-reducción y supone el destino principal del acetoacetato (Laffel, 1999).



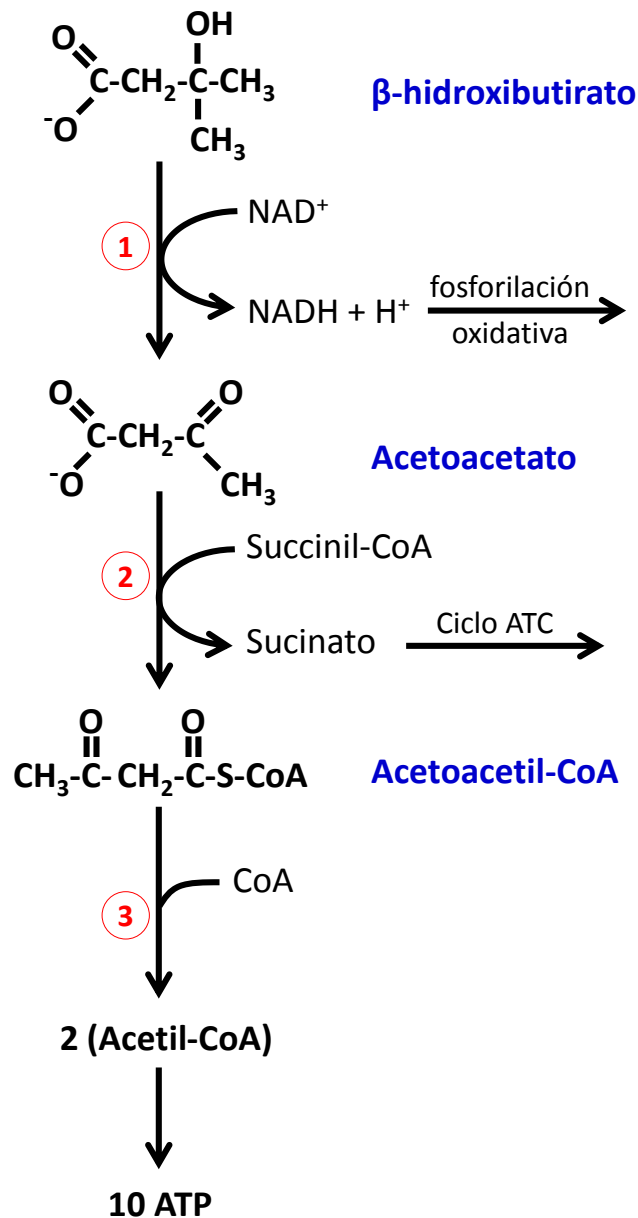
1: β -cetotilasa; 2: HMG-CoA sintasa; 3: HMG-CoA liasa; 4: β -hidroxibutirato deshidrogenasa.

Figura 2.10: Síntesis de cetonas.

La mezcla de acetoacetato libre y de β -hidroxibutirato resultante de esta reacción puede difundir fuera de las células hepáticas a la corriente sanguínea y ser

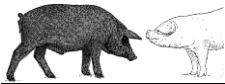


transportada a los tejidos periféricos. En ellos el β -hidroxibutirato se oxida a acetoacetato y éste es activado posteriormente por transferencia de CoA del succinil-CoA (figura 2.11).



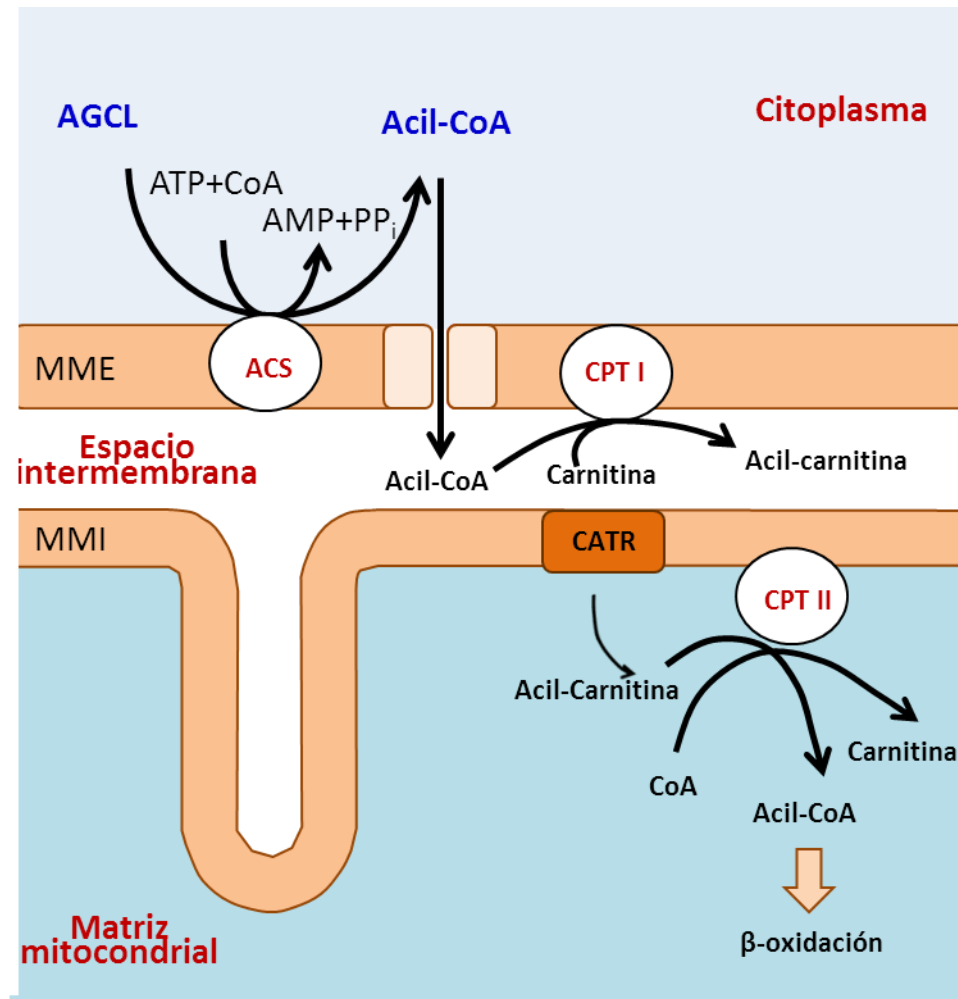
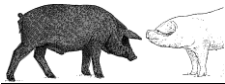
1: β -hidroxibutirato deshidrogenasa; 2: β -cetoacil CoA transferasa; 3: β -cetotilasa.

Figura 2.11: Catabolismo de las cetonas.



El succinil-CoA necesario procede de la oxidación del α -oxoglutarato. El acetoacetil-CoA formado en los tejidos periféricos por estas reacciones experimenta a continuación la escisión tiolítica, rindiendo dos moléculas de acetil-CoA, que pueden incorporarse al ciclo de Krebs (Nelson y Cox, 2009). La regulación de la síntesis de cuerpos cetónicos se realiza básicamente por la disponibilidad del sustrato (acetil-CoA). Hay dos situaciones metabólicas principales en las que la cetogénesis está especialmente activa: alta actividad del catabolismo de lípidos y tasa elevada de GNG. Cuando la GNG está activa, el oxaloacetato se deriva a síntesis de glucosa en vez de incorporarse al ciclo de Krebs. Una menor disponibilidad de oxaloacetato implica que el ciclo de Krebs consume menos acetil-CoA, lo que aumenta el acetil-CoA disponible para la formación de cuerpos cetónicos. Igualmente durante la lipólisis, los AG plasmáticos aumentan proporcionando sustratos abundantes para la β -oxidación en múltiples tejidos. En el hígado, el aumento de la β -oxidación incrementa el acetil-CoA mitocondrial de los hepatocitos (McPherson y McEneny, 2012). La β -oxidación hepática (figura 2.12) de AG de cadena larga está controlada por un sistema en el que la carnitina palmitoiltransferasa I (CPT-I) está regulada alostéricamente por cambios en la concentración del malonil-CoA y/o su sensibilidad a la inhibición por el mismo (Lin y col., 2010).

La CPT I es la enzima limitante en la oxidación de AG de cadena larga al catalizar el primer paso en la entrada de AG de cadena larga en la matriz mitocondrial, previa a la β -oxidación.

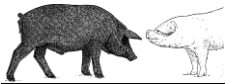


MME: membrana mitocondrial externa; MMI: membrana mitocondrial interna; ACS: acil-CoA sintetasa; CATR: carnitina-acilcarnitina translocasa; CPT: carnitina palmitoiltransferasa (con sus dos isoformas, CPT I en la MME y CPT II en la MMI).

Figura 2.12: Activación y entrada en la mitocondria de los ácidos grasos: lanzadera de carnitina.

2.3.2.6.4. SÍNTESIS DE ALBÚMINA

La contribución del hígado a la renovación proteica global es desproporcionada para su peso; por ejemplo, el hígado en cerdos Ibéricos en crecimiento tiene una tasa de síntesis proteica fraccional (% del tejido sintetizado por día) del 47% (Rivera-Ferre y col., 2005). Los estudios sobre síntesis proteica en hígado son complicados por el hecho de que este tejido además de sus propias proteínas, proteínas

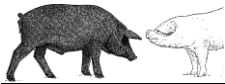


constitutivas, produce numerosas proteínas que son exportadas (Peavy y col., 1978). La albúmina sérica es la principal proteína de exportación hepática y representa del 12 al 18% de la proteína total sintetizada en los hepatocitos de rata y bovinos (Peavy y col., 1978; Strang y col., 1998). Es el constituyente mayoritario de las proteínas del plasma y juega un papel fundamental en numerosas funciones metabólicas y fisiológicas (Rothschild y col., 1988). Es esencial para el mantenimiento de la presión oncótica, funciona como anticoagulante, antioxidante y es un importante transportador de metabolitos y drogas (Quinlan y col., 2005).

2.3.2.6.5. SÍNTESIS DE UREA

Durante el crecimiento, la conversión del nitrógeno del alimento (aminoácidos) en proteína animal es un proceso relativamente ineficiente en todos los mamíferos, con una fracción sustancial de N eliminada como urea. Hay distintas funciones de la ureogénesis incluyendo la retirada del exceso de N aminoacídico para las necesidades anabólicas del animal (Meijer y col., 1990), la regulación del equilibrio ácido-base (Atkinson y Bourke, 1984) y la retirada del amonio proveniente del tracto gastrointestinal (Huizenga y col., 1996) de forma que las concentraciones de amonio periféricas sean suficientes para la síntesis de bases de ácidos nucleicos pero por debajo de aquellas tóxicas para el sistema nervioso central (Summerskill y Wolpert, 1970; Balistreri y Shaw, 1987).

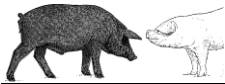
El ciclo de la urea se realiza en los hepatocitos periportales del hígado (Morris, 2002) aunque hay evidencias de un bajo nivel de actividad del ciclo de la urea también en los enterocitos (Wu, 1995). El amonio retirado de la vena porta por el hígado entra en el ciclo de la urea condensándose con el CO_2 mitocondrial para formar carbamoil fosfato, reacción catalizada por la carbamoil fosfato sintetasa (CPS; EC 6.3.4.16; Meijer y col., 1990). El amonio proporciona un solo átomo de N y el segundo lo suministra el aspartato citoplásmico. El donante de N al aspartato es probablemente el glutamato, que está involucrado en numerosas reacciones de transaminación, o la glutamina.



Aunque muchos metabolitos podrían contribuir a la síntesis de urea, en la práctica sólo los aminoácidos se absorben en cantidad suficiente como para aportar el N adicional. Interesa al organismo el mantenimiento de niveles bajos de amonio (no tóxicos) pero no la retirada completa del mismo, ya que el amonio también es precursor del glutamato, y por tanto de otros aminoácidos, y es esencial en los sistemas redox mitocondriales. La retirada del amonio tiene un impacto en la bioenergética hepática e incluso se plantea la posibilidad de que suponga una penalización a la ganancia de proteína en el animal al requerirse nitrógeno aminoacídico extra para la síntesis de urea (Lobley y col., 1995).

2.3.2.6.6. SÍNTESIS DE IGF-I

El eje somatotrópico es esencial para el desarrollo somático del organismo determinando el metabolismo celular (Muñoz y col., 2010). Aunque integra numerosas hormonas, como las tiroideas, glucocorticoides, leptina, hormonas esteroideas sexuales y proteasas, los integrantes fundamentales del eje son la hormona del crecimiento (GH), la insulina y los factores de crecimiento análogos a la insulina, tipos 1 y 2 (IGF-I e IGF-II; Yakar y col., 2002). La GH, sintetizada en la hipófisis anterior, induce la síntesis de IGF-I hepática (de Graaf-Roelfsema y col., 2007). Ambos, GH y su péptido efector (IGF-I) poseen numerosos efectos sobre una gran variedad de procesos biológicos (Jones y Clemmons, 1995). El IGF-I es el principal mediador del crecimiento del tejido esquelético, aunque posee además una gran variedad de funciones a nivel celular, entre las que se cuentan la progresión del ciclo celular, la proliferación y la diferenciación celular. Todas estas funciones implican el estímulo de la síntesis de ADN, ARN, proteínas y colágeno, entre otros (Clemmons y Underwood, 1991; Humbel, 1990). Debido a que la IGF-I estimula la captación de aminoácidos y glucosa y aumenta la síntesis de proteína (Dimitriadis y col., 1992; Tomas y col., 1992) una mayor tasa y eficiencia en el crecimiento de los cerdos puede deberse a diferencias en los niveles circulantes de IGF-I. Las ratas deficitarias en GH o IGF-I no aumentan de tamaño ni de peso hasta que se les administra GH o IGF-I exógenas (Skottner y col., 1989). De igual modo, los ratones con déficit genético de IGF-I muestran un patrón de crecimiento reducido (Powell-



Braxton y col., 1993). Por el contrario, concentraciones excesivas de IGF-I desencadenan una tasa de crecimiento exagerada (Mathews y col.,1988).

2.4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adibi, S. A., Morse, E. L. 1971. Intestinal transport of dipeptides in man: relative importance of hydrolysis and intact absorption. *Journal of Clinical Investigation*, 50:2266.

AECERIBER, Asociación española de criadores de ganado porcino selecto Ibérico puro y tronco Ibérico. 2007. *Manual de Cerdo Ibérico*. 2ª Edición.

Aguilera Sánchez, J. F., Nieto Liñán, R. M. 2012. Nutrición proteica del cerdo ibérico. Recomendaciones. *Avances en tecnología porcina*, 9:34-44.

Aguilera, J. F., Prieto, C. 1986. Description and function of an open-circuit respiration plant for pigs and small ruminants and the techniques used to measure energy metabolism. *Archives of Animal Nutrition*, 36:1009-1018.

Aguinaga, M. A., Conde-Aguilera, J. A., Ruiz-Guerrero, V., Navarro, A. I., Aguilera, J. F., Nieto, R. 2010. Incorporation of lysine from microbial origin into tissue protein of Iberian and LandracexLarge White piglets. *Livestock Science*, 133:104-106.

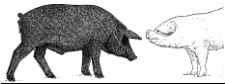
Aguinaga, M. A., Gómez-Carballar, F., Nieto, R., Aguilera, J. F. 2011. Production and composition of Iberian sow's milk and use of milk nutrients by the suckling Iberian piglet. *Animal*, 5:1390-1397.

Alexander, P. H. D. 1998. The role of nitric oxide in hepatic metabolism. *Nutrition*, 14:376-390.

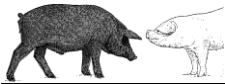
Almeida, F. N., Rojas, O. J., Stein, H. H. 2012. Efecto del procesado térmico sobre el valor nutritivo de los ingredientes alimenticios. XXVIII Curso Especialización FEDNA: Avances Nutrición y Alimentación *Animal*, XI, 269-274.

Alpers, D. H. 1972. Protein synthesis in intestinal mucosa: the effect of route of administration of precursor amino acids. *The Journal of Clinical Investigation*, 51:167-173.

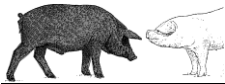
Alves, E., Óvilo, C., Rodríguez, C., Silió, L. 2003. El origen del cerdo ibérico a la luz del análisis del ADN mitocondrial. *Solo Cerdo Ibérico*, 11:27-32.



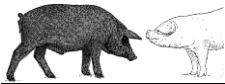
- Araiza-Pina, A., Cervantes-Ramirez, C., Morales-Maldonado, A., Espinoza-Santana, S., Cervantes-Ramirez, M., Torrentera-Olivera, N. 2003. Apparent ileal amino acid digestibility in sorghum, corn and wheat in diets for growing pigs. *Agrociencia*, 37:221-229.
- ARC, Agricultural Research Council. 1981. The nutrient requirements of pigs. Slough: Commonwealth Agricultural Bureau.
- Arthur, M. J., Iredale, J. P. 1993. Hepatic lipocytes, TIMP-1 and liver fibrosis. *Journal of the Royal College of Physicians of London*, 28:200-208.
- Atkinson, D. E., Bourke, E. 1984. The role of ureagenesis in pH homeostasis. *Trends in Biochemical Sciences*, 9:297-300.
- Ayala, A., O'Neill, P. J., Uebele, S. A., Herdon, C. D., Chaudry, I. H. 1997. Mechanism of splenic immunosuppression during sepsis: key role of Kupffer cell mediators. *Journal of Trauma-Injury, Infection, and Critical Care*, 42:882-888.
- Babb, R. R. 1992. Acute acalculous cholecystitis. A review. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 15:238-241.
- Bach Knudsen, K. E., Lærke, H. N., Steinfeldt, S., Hedemann, M. S., Jørgensen, H. 2006. *In vivo* methods to study the digestion of starch in pigs and poultry. *Animal Feed Science and Technology*, 130:114-135.
- Backes, G., Hennig, U., Petzke, K. J., Elsner, A., Junghans, P., Nurnberg, G., Metges, C. C. 2002. Contribution of intestinal microbial lysine to lysine homeostasis is reduced in minipigs fed a wheat gluten-based diet. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 76:1317-1325.
- Balistreri, W. F., Shaw, L. M. 1987. Liver function. *Fundamentals of Clinical Biochemistry*. NW Tietz, 3:729-761.
- Bankey, P. E. 1996. Hepatic regulation of systemic inflammation following acute injury. *Current Opinion in Critical Care*, 2:280-286.
- Barb, C. R., Kraeling, R. R. 2004. Role of leptin in the regulation of gonadotropin secretion in farm animals. *Animal Reproduction Science*, 82:155-167.
- Barb, C. R., Kraeling, R. R., Rampacek, G. B. 2001. Metabolic regulation of the neuroendocrine axis in pigs. *Reproduction (Cambridge, England) Supplement*, 59:203-217.
- Barea, R., Dubois, S., Gilbert, H., Sellier, P., Van Milgen, J., Noblet, J. 2010. Energy utilization in pigs selected for high and low residual feed intake. *Journal of Animal Science*, 88:2062-2072.



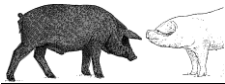
- Barea, R., Nieto, R., Aguilera, J. F. 2007. Effects of the dietary protein content and the feeding level on protein and energy metabolism in Iberian pigs growing from 50 to 100 kg body weight. *Animal*, 1:357-365.
- Barea, R., Nieto, R., Vitari, F., Domeneghini, C., Aguilera, J. F. 2011. Effects of pig genotype Iberian v. Landrace×Large White) on nutrient digestibility, relative organ weight and small intestine structure at two stages of growth. *Animal*, 5:547-557.
- Barie, P. S., Fischer, E. 1995. Acute acalculous cholecystitis. *Journal of the American College of Surgeons*, 180:232.
- Basile-Filho, A., El-Khoury, A. E., Beaumier, L., Wang, S. Y., Young, V. R. 1997. Continuous 24-h L-[1-13C] phenylalanine and L-[3, 3-2H2] tyrosine oral-tracer studies at an intermediate phenylalanine intake to estimate requirements in adults. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 65:473-488.
- Batterham, E. S. 1992. Availability and utilization of amino acids for growing pigs. *Nutrition Research Reviews*, 5:1-18.
- Bauchart-Thevret, C., Stoll, B., Burrin, D. G. 2009b. Intestinal metabolism of sulfur amino acids. *Nutrition Research Reviews*, 22:175-187.
- Bauchart-Thevret, C., Stoll, B., Chacko, S., Burrin, D. G. 2009a. Sulfur amino acid deficiency upregulates intestinal methionine cycle activity and suppresses epithelial growth in neonatal pigs. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 296:E1239-E1250.
- Benevenga, N. J., Egan, A. R. 1982. Quantitative aspects of methionine metabolism. *Progress in Clinical and Biological Research*, 125:327-341.
- Berry, M. N., Farrington, C., Grivell, A. R., Gay, S., Wallace, P. G. 1983. In: *Isolation, Characterization and Use of Hepatocytes*, Harris RA y Cornell NW (Eds). Nueva York: Elsevier Biomedical.
- Berry, M. N., Friend, D. S. 1969. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells A biochemical and fine structural study. *The Journal of Cell Biology*, 43:506-520.
- Berry, M. N., Simpson, F. O. 1962. Fine structure of cells isolated from adult mouse liver. *The Journal of Cell Biology*, 15:9-17.
- Biolo, G., Tessari, P., Inchiostro, S., Bruttomesso, D., Frongher, C., Sabadin, L., Fratton, M. G., Valerio, A. Tiengo, A. 1992. Leucine and phenylalanine kinetics during mixed meal ingestion: a multiple tracer approach. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 262:455-463.



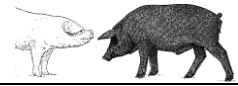
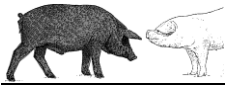
- Blachier, F., Mariotti, F., Huneau, JF., Tome, D. 2007. Effects of amino acid-derived luminal metabolites on the colonic epithelium and physiopathological consequences. *Amino Acids* 33:547–562.
- Blachier, F., Wu, G., Yin, Y., Hou, Y., Andriamihaja, M. 2013. Developmental Amino Acid Metabolism in the Pig Small and Large Intestine Epithelial Cells. In *Nutritional and Physiological Functions of Amino Acids in Pigs*. Springer Vienna. 59-74
- Blouin, A., Bolender, R. P., Weibel, E. R. 1977. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *The Journal of Cell Biology*, 72:441-455.
- Bonacini, M. 1992. Hepatobiliary complications in patients with human immunodeficiency virus infection. *The American Journal of Medicine*, 92:404-411.
- Bonnet, S., Geraert, P. A., Lessire, M., Carre, B., Guillaumin, S. 1997. Effect of high ambient temperature on feed digestibility in broilers. *Poultry Science*, 76:857-863.
- Britton, R., Krehbiel, C. 1993. Nutrient metabolism by gut tissues. *Journal of Dairy Science*, 76:2125-2131.
- Bruins, M. J., Soeters, P. B., Deutz, N. E. 2000. Endotoxemia affects organ protein metabolism differently during prolonged feeding in pigs. *The Journal of Nutrition*, 130:3003-3013.
- BSAS, British Society of Animal Science. 2003. Nutrient requirement standards for pigs. BSAS, Penicuik, United Kingdom.
- Burrin, D. G., Ferrell, C. L., Eisemann, J. H., Britton, R. A., Nienaber, J. A. 1989. Effect of level of nutrition on splanchnic blood flow and oxygen consumption in sheep. *British Journal of Nutrition*, 62:23-34.
- Caine, W. R., Sauer, W. C., Tamminga, S., Verstegen, M. W., Schulze, H. 1997. Apparent ileal digestibilities of amino acids in newly weaned pigs fed diets with protease-treated soybean meal. *Journal of Animal Science*, 75:2962-2969.
- Campbell, R. G., Johnson, R. J., Taverner, M. R., King, R. H. 1991. Interrelationships between exogenous porcine somatotropin (PST) administration and dietary protein and energy intake on protein deposition capacity and energy metabolism of pigs. *Journal of Animal Science*, 69:1522-1531.
- Caperna, T. J., Failla, M. L., Kornegay, E. T., Richards, M. P., Steele, N. C. 1985. Isolation and culture of parenchymal and nonparenchymal cells from neonatal swine liver. *Journal of Animal Science*, 61:1576-1586.



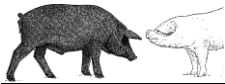
- Cava, R., Manuel Ferrer, J., Estévez, M., Morcuende, D., Toldrá, F. 2004. Composition and proteolytic and lipolytic enzyme activities in muscle Longissimus dorsi from Iberian pigs and industrial genotype pigs. *Food Chemistry*, 88:25-33.
- Cervantes Ramirez, M., González-Vizcarra, V., Rodríguez-Rubí, S., Cuca-García, M., Cromwell, G. 2000. Pérdida de AAE endógenos en cerdos con niveles variables de consumo de alimento. *Agrociencia*, 34:707-715.
- Chen, L., Li, P., Wang, J., Li, X., Gao, H., Yin, Y., Wu, G. 2009. Catabolism of nutritionally essential amino acids in developing porcine enterocytes. *Amino acids*, 37:143-152.
- Chen, L., Yin, Y. L., Jobgen, W. S., Jobgen, S. C., Knabe, D. A., Hu, W. X., Wu, G. 2007. In vitro oxidation of essential amino acids by jejunal mucosal cells of growing pigs. *Livestock Science*, 109:19-23.
- Christon, R. 1988. The effect of tropical ambient temperature on growth and metabolism in pigs. *Journal of Animal Science*, 66:3112-3123.
- Chwalibog, A. Thorbek, G. 2000. Estimation of net nutrient oxidation and lipogenesis in growing pigs. *Archives of Animal Nutrition*, 53:253-271.
- Chwalibog, A., Tauson, A. H., Thorbek, G. 2004. Energy metabolism and substrate oxidation in pigs during feeding, starvation and re-feeding. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 88:101-112.
- Clemente, I., Membrillo, A., Azor, P., Dorado, G., Rodero, A., Molina, A. 2006. Algunas consideraciones sobre las diferentes clasificaciones del tronco porcino ibérico: una propuesta integradora. *Sólo Cerdo Ibérico* 16:7-18.
- Clemmons, D. R., Underwood, L. E. 1991. Nutritional regulation of IGF-I and IGF binding proteins. *Annual Review of Nutrition*, 11:393-412.
- Coates, M. E. 1980. The gut microflora and growth. In: Lawrence T.L.J. ed. *Growth in Animals*, Butterworths, pp. 175-188.
- Coates, M. E., Fuller, R., Harrison, G. F., Lev, M., Suffolk, S. F. 1963. A comparison of the growth of chicks in the Gustafsson germ-free apparatus and in a conventional environment, with and without dietary supplements of penicillin. *British Journal of Nutrition*, 17:141-150.
- Cohnheim, O. 1901 Transformation of protein by intestine wound. *Journal of Physiological Chemistry* 33:451-465.



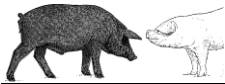
- Conde-Aguilera, J. A., Aguinaga, M. A., Lara, L., Aguilera, J. F., Nieto, R. 2011. Carcass traits and organ weights of 10–25-kg body weight Iberian pigs fed diets with different protein-to-energy ratio. *Animal Feed Science and Technology*, 164:116-124.
- Cortez-Hernández, C. A., Maldonado-Garza, H. J., Bosques-Padilla, F. J., Garza-Lara, C. I., Gutiérrez-Sánchez, J. B., Elizondo-Riojas, G. 2009. Importancia del gradiente de presión venosa hepática en pacientes con cirrosis hepática. *Medicina Universitaria*, 11:260-266.
- Cousins, B. W., Tanksley Jr, T. D., Knabe, D. A., Zebrowska, T. 1981. Nutrient digestibility and performance of pigs fed sorghums varying in tannin concentration. *Journal of Animal Science*, 53:1524-1537.
- Dai, Q. Z., Wang, K. N., Yin, Y. L., Bin, S. Y. 2005. Improvement of study on intestinal amino acid metabolism of growing pig. *J Domest Anim Eco* 26:63–69.
- Dangin, M., Boirie, Y., Garcia-Rodenas, C., Gachon, P., Fauquant, J., Callier, P., Beaufrère, B. 2001. The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 280:340-348.
- Dauncey, M. J., Ingram, D. L., James, P. S., Smith, M. W. 1983. Modification by diet and environmental temperature of enterocyte function in piglet intestine. *The Journal of Physiology*, 341:441-452.
- de Graaf-Roelfsema, E., Keizer, H. A., van Breda, E., Wijnberg, I. D., Van der Kolk, J. H. 2007. Hormonal responses to acute exercise, training and overtraining a review with emphasis on the horse. *Veterinary Quarterly*, 29:82-101.
- DeFronzo, R. A. 1987. Use of the splanchnic/hepatic balance technique in the study of glucose metabolism. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 1:837-862.
- Deng, J., Wu, X., Bin, S., Li, T. J., Huang, R., Liu, Z., Yin, Y. L. 2010. Dietary amylose and amylopectin ratio and resistant starch content affects plasma glucose, lactic acid, hormone levels and protein synthesis in splanchnic tissues. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 94:220-226.
- Dierick, N. A., Vervaeke, I. J., Decuypere, J. A., Henderickx, H. K. 1986. Influence of the gut flora and of some growth-promoting feed additives on nitrogen metabolism in pigs. I. Studies in vitro. *Livestock Production Science*, 14:161-176.
- Dimitriadis G, Parry-Billings, M, Bevan S, Dunger D, Piva T, Krause U, Wegener G Newsholme, E. A. 1992. Effects of insulin-like growth factor I on the rates of glucose transport and utilization in rat skeletal muscle in vitro. *The Biochemical Journal*, 285:269–274.



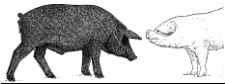
- Dobney, K., Larson, G. 2006. Genetics and animal domestication: new windows on an elusive process. *Journal of Zoology*, 269:261-271.
- Drochmans, P., Wanson, J. C., May, C., & Bernaert, D. 1978. Ultrastructural and metabolic studies of isolated and cultured hepatocytes. Hepatotrophic factors. *Ciba Foundation Symposium*, 55:7-29.
- Early, R. J., McBride, B. W., Ball, R. O. 1990. Growth and metabolism in somatotropin-treated steers: III. Protein synthesis and tissue energy expenditures. *Journal of Animal Science*, 68:4153-4166.
- Edelstone, D. I., Holzman, I. R. 1981. Oxygen consumption by the gastrointestinal tract and liver in conscious newborn lambs. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 240:297-304.
- Eisemann, J. H., Huntington, G. B., Ferrell, C. L. 1987. Blood flow to hindquarters of steers measured by transit time ultrasound and indicator dilution. *Journal of Dairy Science*, 70:1385-1390.
- Ellis, P. R., Roberts, F. G., Low, A. G., Morgan, L. M. 1995. The effect of high-molecular-weight guar gum on net apparent glucose absorption and net apparent insulin and gastric inhibitory polypeptide production in the growing pig: relationship to rheological changes in jejunal digesta. *British Journal of Nutrition*, 74:539-556.
- Elwyn, D.H., Hamendra, CR., Shoemaker, W.C. 1968 Amino acid movements between gut, liver, and periphery in unanesthetized dogs. *American Journal of Physiology* 215:1260—1275.
- Fabián, J., Chiba, L. I., Kuhlers, D. L., Frobish, L. T., Nadarajah, K., McElhenney, W. H. 2003. Growth performance, dry matter and nitrogen digestibilities, serum profile, and carcass and meat quality of pigs with distinct genotypes. *Journal of Animal Science*, 81:1142-1149.
- Fan, M. Z., Sauer, W. C., Hardin, R. T., Lien, K. A. 1994. Determination of apparent ileal amino acid digestibility in pigs: effect of dietary amino acid level. *Journal of Animal Science*, 72:2851-2859.
- Fang, Z., Huang, F., Luo, J., Wei, H., Ma, L., Jiang, S., Peng, J. 2010a. Effects of DL-2-hydroxy-4-methylthiobutyrate on the first-pass intestinal metabolism of dietary methionine and its extra-intestinal availability. *British Journal of Nutrition*, 103:643-651.
- Fang, Z., Yao, K., Zhang, X., Zhao, S., Sun, Z., Tian, G., Wu, D. 2010b. Nutrition and health relevant regulation of intestinal sulfur amino acid metabolism. *Amino acids*, 39:633-640.
- Fawcett, D. W. 1994. The liver and gallbladder. *Bloom and Fawcett. A Textbook of Histology*, 652-668.
- Fenton, J. P., Roehrig, K. L., Mahan, D. C., Corley, J. R. 1985. Effect of swine weaning age on body fat and lipogenic activity in liver and adipose tissue. *Journal of animal science*, 60:190-199.



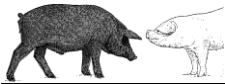
- Fernandez-Figares, I., Lachica, M., Nieto, R., Rivera-Ferre, M. G., Aguilera, J. F. 2007. Serum profile of metabolites and hormones in obese (Iberian) and lean (Landrace) growing gilts fed balanced or lysine deficient diets. *Livestock Science*, 110:73-81.
- Fernández-Figares, I., Lachica, M., Rivera-Ferre, M. G., Nieto, R., del Río, C. G., Aguilera, J. F. 2003. Comparative serum metabolites and hormonal profile of Iberian and Landrace growing pigs fed equilibrated or lysine-deficient diets. *Publication-European Association for Animal Production (EAAP)*, 109:159-162.
- Ferrannini, E. 1988. The theoretical bases of indirect calorimetry: a review. *Metabolism*, 37:287-301.
- Ferrell, C. L. 1988. Contribution of visceral organs to animal energy expenditures. *Journal of Animal Science*, 66Supplement 3:23-34.
- Fick, A. 1870. Ueber die Messung des Blutquantums in den Herzventrikeln. *Verh Phys Med Ges Wurzburg*, 2:16-28.
- Finkelstein, J.D. 2000. Pathways and regulation of homocysteine metabolism in mammals. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 26:219–225
- Fiorito, L., Chevallier, C. 2001. Composición corporal y metabolismo energético. *Boletín CESNI*. Noviembre.
- Freire, J. P. B., Peiniau, J., Cunha, L. F., Almeida, J. A. A., Aumaitre, A. 1998. Comparative effects of dietary fat and fibre in Alentejano and Large White piglets: digestibility, digestive enzymes and metabolic data. *Livestock Production Science*, 53:37-47.
- Galassi, G., Crovetto, G. M., Rapetti, L., Tamburini, A. 2004. Energy and nitrogen balance in heavy pigs fed different fibre sources. *Livestock Production Science*, 85:253-262.
- Ganapathy, V., Brandsch, M., Leibach, F.H. 1994 Intestinal transport of amino acids and peptides. In: Johnson, L.R. (ed.) *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, 3rd edn. Raven Press, New York, pp.1773—1794.
- García-Valverde, R., Barea, R., Lara, L., Nieto, R., Aguilera, J. F. 2008. The effects of feeding level upon protein and fat deposition in Iberian heavy pigs. *Livestock Science*, 114:263-273.
- Gaskins, H. R. 2001. Intestinal bacteria and their influence on swine growth. In: Lewis A.J., Southern L.L. eds. *Swine Nutrition*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 585-608.



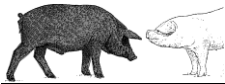
- Gaskins, H. R. 2008. Host and intestinal microbiota negotiations in the content of animal growth efficiency. Gut efficiency; the key ingredient in pig and poultry production Eds JA, Taylor-Pickard and P. Spring. Wageningen Academic Publishers. Wageningen. The Netherlands, 29-37.
- Goetsch, A. L., Ferrell, C. L., Freetly, H. C. 1994. Effects of different supplements on splanchnic oxygen consumption and net fluxes of nutrients in sheep consuming bromegrass *Bromus inermis* hay ad libitum. *British Journal of Nutrition*, 72:701-712.
- Gondret, F., Ferré, P., Dugail, I. 2001. ADD-1/SREBP-1 is a major determinant of tissue differential lipogenic capacity in mammalian and avian species. *Journal of Lipid Research*, 42:106-113.
- González-Añoover, P., Encinas, T., Gomez-Izquierdo, E., Sanz, E., Letelier, C. A., Torres-Rovira, L., Gonzalez-Bulnes, A. 2010. Advanced onset of puberty in gilts of Thrifty genotype (Iberian Pig). *Reproduction in Domestic Animals*, 45:1003-1007.
- González-Añoover, P., Encinas, T., Sanz, E., Letelier, C. A., Torres-Rovira, L., de Mercado, E., Gonzalez-Bulnes, A. 2011. Preovulatory follicle dynamics and ovulatory efficiency in sows with thrifty genotype and leptin resistance due to leptin receptor gene polymorphisms (Iberian pig). *General and Comparative Endocrinology*, 170:200-206.
- Granger, D. N., Richardson, P. D. I., Kvietys, P. R., Mortillaro, N. A. 1980. Intestinal blood flow. *Gastroenterology*, 78:837-863.
- Greengard, O., Federman, M., Knox, W. E. 1972. Cytomorphometry of developing rat liver and its application to enzymic differentiation. *The Journal of Cell Biology*, 52:261-272.
- Gunawan, A. M., Park, S. K., Pleitner, J. M., Feliciano, L., Grant, A. L., Gerrard, D. E. 2007. Contractile protein content reflects myosin heavy-chain isoform gene expression. *Journal of Animal Science*, 85:1247-1256.
- Gurr, J. A., Potter, V.R. 1980. The significance of differences between fresh cell suspensions and fresh or maintained monolayers. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 349:57-66.
- Hashim, S. A., VanItallie, T. B. 2014. Ketone Body Therapy: From ketogenic diet to oral administration of ketone ester. *Journal of Lipid Research*, jlr-R046599.
- Hayashi, I., Sato, G. H. 1976. Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. *Nature*, 259:132.
- He, Q., Yin, Y., Hou, Y., Qin, G., Sun, H., Liu, J., Zheng, Z. 2013. Factors That Affect Amino Acid Metabolism in Pigs. In *Nutritional and Physiological Functions of Amino Acids in Pigs* pp. 123-140. Springer Vienna.



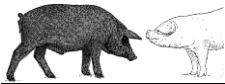
- Hecker, J. F. 1974. Experimental surgery on small ruminants. Butterworths and Co., London.
- Hierro Delgado, C. 2009. Papel de proteínas transportadoras de aniones orgánicos en la captación de sustancias antioxidantes por las células hepáticas: implicaciones fisiológicas y fisiopatológicas. Tesis Doctoral. Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Salamanca.
- Hoerr, R. A., Matthews, D. E., Bier, D. M., Young, V. R. 1991. Leucine kinetics from [2H3]-and [13C] leucine infused simultaneously by gut and vein. *The American journal of physiology*, 260:111– 117.
- Hoerr, R. A., Matthews, D. E., Bier, D. M., Young, V. R. 1993. Effects of protein restriction and acute refeeding on leucine and lysine kinetics in young men. *The American journal of physiology*, 264:567.
- Howard, R. B., Christensen, A. K., Gibbs, F. A., Pesch, L. A. 1967. The enzymatic preparation of isolated intact parenchymal cells from rat liver. *The Journal of Cell Biology*, 35:675-684.
- Howard, R. B., Pesch, L. A. 1968. Respiratory activity of intact, isolated parenchymal cells from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*, 243:3105-3109.
- Huang, R. L., Dai, Q. Z., Li, T. J., Bin, S. Y., Hou, Z. P., Zhan, P. 2006. Study on the relationship of average daily gain with net portal absorption of nutrients by portal vein-drained organs in growing pigs. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica* 37:262.
- Huizenga, J. R., Glips, C. H., Tangerman, A. 1996. The contribution of various organs to ammonia formation: A review of factors determining the arterial concentration. *Annals of Clinical Biochemistry*, 33:23-30.
- Humbel, R. E. 1990. Insulin-like growth factors I and II. *European Journal of Biochemistry*, 190:445-462.
- Huntington, G. B., Eisemann, J. H., Whitt, J. M. 1990. Portal blood flow in beef steers: comparison of techniques and relation to hepatic blood flow, cardiac output and oxygen uptake. *Journal of Animal Science*, 68:1666-1673.
- Huntington, G. B., Reynolds, C. K. 1987. Oxygen consumption and metabolite flux of bovine portal-drained viscera and liver. *The Journal of Nutrition*, 117:1167-1173.
- Huntington, G. B., Reynolds, C. K., Stroud, B. H. 1989. Techniques for measuring blood flow in splanchnic tissues of cattle. *Journal of Dairy Science*, 72:1583-1595.
- Huntington, G. B., Tyrrell, H. F. 1985. Oxygen consumption by portal-drained viscera of cattle: comparison of analytical methods and relationship to whole body oxygen consumption. *Journal of Dairy Science*, 68:2727-2731.



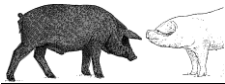
- Ichihara, A. 1975. In Control Mechanisms in Cancer. W. E. Criss, T. Ono J. R. Sabine, (Eds): 3:17-327. Raven Press, New York.
- Ichihara, A., Nakamura, T., Tanaka, K. 1982. Use of hepatocytes in primary culture for biochemical studies on liver functions. *Molecular and cellular Biochemistry*, 43:145-160.
- Irtun, Ø., Martini, W. Z., Ozkan, O., Wolfe, R. R. 2001. Caval backflow: A potential problem during blood sampling from the hepatic vein. *Metabolism*, 50:189-193.
- Isserty, A., Ortigues, I. 1994. Méthodes d'exploitation de données concernant les débits sanguins mesurés au niveau des viscères et du train-arrière chez la brebis. *Reproduction Nutrition Development*, 34:399-413.
- Isserty, A., Ortigues, I., Remond, D. 1998. Mesure des débits splanchniques par dilution de marqueur: comparaison de quatre méthodes de dosage de l'acide para-amino-hippurique. *Reproduction Nutrition Development*, 38:93-106.
- Jansman, A. J. M. 1993. Tannins in feedstuffs for simple-stomached animals. *Nutrition Research Reviews*, 61:209-236.
- Jéquier, E. 1985. Direct and indirect calorimetry in man. *Substrate and energy metabolism*, 82-92.
- Jing, Y., Flad, R. K. 2002. Pig domestication in ancient China. *Antiquity*, 76:724-732.
- Jones, J. I., Clemmons, D. R. 1995. Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins: Biological Actions*. *Endocrine Reviews*, 16:3-34.
- Jungas, R. L., Halperin, M. L., Brosnan, J. T. 1992. Quantitative analysis of amino acid oxidation and related gluconeogenesis in humans. *Physiological Reviews*, 72:419-448.
- Juzhong, L. Y. Z. 2008. Restudy of the Pigs' Bones from the Jiahu Site in Wuyang County, Henan [J]. *Archaeology*, 1:014.
- Karlsson, A. H., Klont, R. E., Fernandez, X. 1999. Skeletal muscle fibres as factors for pork quality. *Livestock Production Science*, 60:255-269.
- Kato, S., Aoyama, K., Nakamura, T., Ichihara, A. 1979. Biochemical studies on liver functions in primary cultured hepatocytes of adult rat. II Regulation of protein and amino acid metabolism. *Journal of Biochemistry*, 86:863-870.
- Katz, M. L., Bergman, E. N. 1969. Simultaneous measurements of hepatic and portal venous blood flow in the sheep and dog. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 216:946-952.



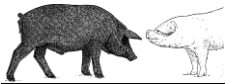
- Kephart, K. B., Sherritt, G. W. 1990. Performance and nutrient balance in growing swine fed low-protein diets supplemented with amino acids and potassium. *Journal of Animal Science*, 687:1999-2008.
- Kinyamu, H. K., Ewan, R. C. 1994. Energy and protein metabolism of the Chinese pig. *Journal of Animal Science*, 72:2068-2074.
- Kleiber, M. 1961. *The fire of life*. ed. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Kleiber, M. 1975. *The fire of life. An introduction to animal energetics*. 2nd ed. Robert E. Krieger Publishing Co., New York.
- Koong, L. J., Nienaber, J. A., Mersmann, H. J. 1983. Effects of plane of nutrition on organ size and fasting heat production in genetically obese and lean pigs. *The Journal of Nutrition*, 113:1626-1631.
- Lachica, M. 1993. Estimación del gasto energético de la actividad física en ganado caprino. Comparación de técnicas calorimétricas y no calorimétricas. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España.
- Lachica, M. 2008. Sheep and goats grazing under aridity: The energy subject. *Annals of Arid Zones*, 47:1-18.
- Lachica, M., Prieto, C., Aguilera, J. F. 1995. A confinement respiration chamber for short gaseous exchange measurements. *Archives of Animal Nutrition*, 48:329-336.
- Laffel, L. 1999. Ketone bodies: a review of physiology, pathophysiology and application of monitoring to diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 15:412-426.
- Laguna Sáenz E. 1998. *El cerdo ibérico en el próximo milenio*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa.
- Lamprecht, I., Schmolz, E. 1999. Calorimetry of small animals. In: *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry*. ed. Kemp, R. B. Elsevier Science, 4:405-467.
- Larson, G., Albarella, U., Dobney, K., Rowley-Conwy, P., Schibler, J., Tresset, A., Cooper, A. 2007a. Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104:15276-15281.
- Larson, G., Cucchi, T., Fujita, M., Matisoo-Smith, E., Robins, J., Anderson, A., Dobney, K. 2007b. Phylogeny and ancient DNA of *Sus* provides insights into neolithic expansion in Island Southeast Asia and Oceania. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104:4834-4839.
- Larson, G., Dobney, K., Albarella, U., Fang, M., Matisoo-Smith, E., Robins, J., Cooper, A. 2005. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science*, 307:1618-1621.



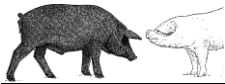
- Larson, G., Liu, R., Zhao, X., Yuan, J., Fuller, D., Barton, L., Li, N. 2010. Patterns of East Asian pig domestication, migration, and turnover revealed by modern and ancient DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107:7686-7691.
- Lasfargues, E. Y. 1957. Cultivation and behavior in vitro the normal mammary epithelium of the adult mouse: II. Observations on the secretory activity. *Experimental Cell Research*, 13:553-562.
- Libao-Mercado, A. J. O., Zhu, C. L., Cant, J. P., Lapierre, H., Thibault, J. N., Sève, B., de Lange, C. F. 2009. Dietary and endogenous amino acids are the main contributors to microbial protein in the upper gut of normally nourished pigs. *The Journal of Nutrition*, 139:1088-1094.
- Lin, X., Shim, K., Odle, J. 2010. Carnitine palmitoyltransferase I control of acetogenesis, the major pathway of fatty acid β -oxidation in liver of neonatal swine. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298:1435-1443.
- Lobley, G. E., Connell, A., Lomax, M. A., Brown, D. S., Milne, E., Calder, A. G., Farningham, D. A. H. 1995. Hepatic detoxification of ammonia in the ovine liver: possible consequences for amino acid catabolism. *British Journal of Nutrition*, 73: 667-685.
- Lobley, G. E., Milne, V., Lovie, J. M., Reeds, P. J., Pennie, K. 1980. Whole body and tissue protein synthesis in cattle. *British Journal of Nutrition*, 43:491-502.
- Lomax, M. A., Baird, G. D. 1983. Blood flow and nutrient exchange across the liver and gut of the dairy cow. *British Journal of Nutrition*, 49:481-496.
- Low, A. G. 1990. Nutritional regulation of gastric secretion, digestion and emptying. *Nutrition Research Reviews*, 3:229-252.
- Madara JL (1991) Functional morphology of epithelium of the small intestine. In: Shultz SG (ed) *Handbook of physiology: the gastrointestinal system*. American Physiological Society, Bethesda, MD, 83–120
- Mandl, I., MacLennan, J. D., Howes, E. L., DeBellis, R. H., Sohler, A. 1953. Isolation and characterization of proteinase and collagenase from *Cl. histolyticum*. *Journal of Clinical Investigation*, 32:1323.
- Mariscal, G., Parra, J. 2009. Digestibilidad ileal aparente de la proteína y aminoácidos de la torta de canola en lechones recién destetados. *Revista MVZ Córdoba*, 14.
- Martínez Blasco, M. 2012. Influencia de los factores del donante en el aislamiento y cultivo de hepatocitos humanos. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, España.



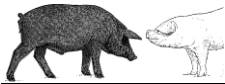
- Mathews, L. S., Hammer, R. E., Brinster, R. L., Palmiter, R. D. 1988. Expression of Insulin-Like Growth Factor I in Transgenic Mice with Elevated Levels of Growth Hormone Is Correlated with Growth*. *Endocrinology*, 123:433-437.
- Matthews, D. M. 1983 Intestinal absorption of peptides. *Biochemical Society Transactions* 11:808—810.
- Matthews, D. M. 1991 *Protein Absorption: Development and Present State of the Subject*. Wiley-Liss, New York.
- Maurel, P. (Ed). 2010. *Hepatocytes: Methods and Protocols*. Humana Press.
- McPherson, P. A. C., McEneny, J. 2012. The biochemistry of ketogenesis and its role in weight management, neurological disease and oxidative stress. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 68:141-151.
- Megens, H. J., Crooijmans, R. P. M. A., San Cristobal, M., Hui, X., Li, N., Groenen, M. 2008. Biodiversity of pig breeds from China and Europe estimated from pooled DNA samples: differences in microsatellite variation between two areas of domestication. *Genetics Selection Evolution*, 40:103-128.
- Meijer, A. J., Lamers, W. H., Chamuleau, R. A. 1990. Nitrogen metabolism and ornithine cycle function. *Physiological Reviews*, 70:701.
- Metwally, M., Ledger, W. L., Li, T. C. 2008. Reproductive endocrinology and clinical aspects of obesity in women. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1127:140-146.
- Milgen, J. V., Noblet, J., McNamara, J. P., France, J., Beever, D. E. 2000. Modelling energy expenditure in pigs. *Modelling Nutrient Utilization in Farm Animals*, 103-114.
- Morales, J., Pérez, J. F., Baucells, M. D., Mourot, J., Gasa, J. 2002. Comparative digestibility and lipogenic activity in Landrace and Iberian finishing pigs fed ad libitum corn-and corn-sorghum-acorn-based diets. *Livestock Production Science*, 77:195-205.
- Morris Jr, S. M. 2002. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annual Review of Nutrition*, 22:87-105.
- Moscona, A. 1952. Cell suspensions from organ rudiments of chick embryos. *Experimental Cell Research*, 33, 535-539.
- Muñoz, A., Riber, C., Trigo, P., Castejón, F. M. 2010. Acciones biológicas y factores determinantes de las concentraciones del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I) en el caballo. *REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria*, 1-17.



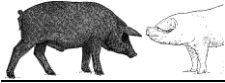
- Muñoz, G., Ovilo, C., Silió, L., Tomás, A., Noguera, J. L., Rodríguez, M. C. 2009. Single-and joint-population analyses of two experimental pig crosses to confirm quantitative trait loci on *Sus scrofa* chromosome 6 and leptin receptor effects on fatness and growth traits. *Journal of Animal Science*, 87:459-468.
- National Research Council 1998. *Nutrient Requirement of Swine*. 10th rev. ed. National Academic Press, Washington, DC.
- Nehlig, A., Pereira de Vasconcelos, A. 1993. Glucose and ketone body utilization by the brain of neonatal rats. *Progress in Neurobiology*, 40:163-220.
- Nelson, D. L., Cox, M. M. 2009. *Lehninger principios de bioquímica*. 5ª Edición, 2009. Ediciones Omega.
- Newey, H., Smyth, D. H. 1959. The intestinal absorption of some dipeptides. *The Journal of physiology*, 145:48-56.
- Nieto, R., Miranda, A., García, M. A., Aguilera, J. F. 2002. The effect of dietary protein content and feeding level on the rate of protein deposition and energy utilization in growing Iberian pigs from 15 to 50kg body weight. *British Journal of Nutrition*, 88:39-49.
- Noblet, J., Etienne, M., Dourmad, J. Y. 1998. Energetic efficiency of milk production. *The lactating sow*, 113.
- Noblet, J., Henry, Y., Dubois, S. 1987. Effect of protein and lysine levels in the diet on body gain composition and energy utilization in growing pigs. *Journal of Animal Science*, 65:717-726.
- Nursten, H. E. 2005. *The Maillard reaction: chemistry, biochemistry, and implications*. Royal Society of Chemistry.
- Ortigue, I., Durand, D., Lefaivre, J. 1994. Use of para-amino hippuric acid to measure blood flows through portal-drained-viscera, liver and hindquarters in sheep. *The Journal of Agricultural Science*, 122:299-308.
- Otero, W., Sierra, F. 2003. El hígado en Cirugía. *Rev Coloma Gastroenterol*, 18:230-8.
- Ovilo, C., Fernández, A., Noguera, J. L., Barragán, C., Letón, R., Rodríguez, C., Toro, M. 2005. Fine mapping of porcine chromosome 6 QTL and LEPR effects on body composition in multiple generations of an Iberian by Landrace intercross. *Genetical Research*, 85:57-67.
- Pasquali, R., Gambineri, A. 2006. Metabolic effects of obesity on reproduction. *Reproductive biomedicine online*, 12:542-551.
- Pasquali, R., Patton, L., Gambineri, A. 2007. Obesity and infertility. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 14:482-487.



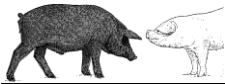
- Peavy, D. E., Taylor, J. M., Jefferson, L. S. 1978. Correlation of albumin production rates and albumin mRNA levels in livers of normal, diabetic, and insulin-treated diabetic rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75:5879-5883.
- Perry, M. A., Parker, J. C. 1981. Indicator dilution measurements of splanchnic blood flow. *Measurement of Blood Flow Applications to the Splanchnic Circulation*, 161-176.
- Powell-Braxton, L., Hollingshead, P., Warburton, C., Dowd, M., Pitts-Meek, S., Dalton, D., Stewart, T. A. 1993. IGF-I is required for normal embryonic growth in mice. *Genes development*, 7; 2609-2617.
- Prior, R. L., Gross, K. L. 1995. Dietary arginine deficiency and gut ammonium infusion alter flux of urea cycle intermediates across the portal-drained viscera of pigs. *The Journal of Nutrition*, 125:251-263.
- Quiniou, N., Dourmad, J. Y., Noblet, J. 1996. Effect of energy intake on the performance of different types of pig from 45 to 100 kg body weight. 1. Protein and lipid deposition. *Animal Science*, 63:277-288.
- Ravussin, E., Lillioja, S., Anderson, T. E., Christin, L., Bogardus, C. 1986. Determinants of 24-hour energy expenditure in man. Methods and results using a respiratory chamber. *Journal of Clinical Investigation*, 78:1568-1578.
- Rérat, A. 1981. Chronologie et bilans de l'absorption des sucres réducteurs et de l'azote a-aminé chez le porc selon la nature des aliments. *Bulletin de l'Academie Nationale de Medecine*, 165:1131-1137.
- Rérat, A., Simoes-Nunes, C., Mendy, F., Vaissade, P., Vaugelade, P. 1992. Splanchnic fluxes of amino acids after duodenal infusion of carbohydrate solutions containing free amino acids or oligopeptides in the non-anaesthetized pig. *British Journal of Nutrition*, 68:111-138.
- Rérat, A., Vaissade, P. 1993. Relations entre la prise alimentaire et la consommation d'oxygène des organes drainés par la veine porte chez le porc éveillé. *Reproduction Nutrition Development*, 33: 235-251.
- Rérat, A., Vaissade, P., Vaugelade, P. 1984. Absorption kinetics of some carbohydrates in conscious pigs. *British Journal of Nutrition*, 51:517-529.
- Reynolds, C. K., Huntington, G. B. 1988. Partition of portal-drained visceral net flux in beef steers. *British Journal of Nutrition*, 60:539-551.
- Riedijk, M. A., Stoll, B., Chacko, S., Schierbeek, H., Sunehag, A. L., van Goudoever, J. B., Burrin, D. G. 2007. Methionine transmethylation and transsulfuration in the piglet gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104:3408-3413.



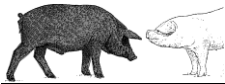
- Rivera-Ferre, M. G., Aguilera, J. F., Nieto, R. 2005. Muscle fractional protein synthesis is higher in Iberian than in Landrace growing pigs fed adequate or lysine-deficient diets. *The Journal of Nutrition*, 135:469-478.
- Rivera-Ferre, M. G., Aguilera, J. F., Nieto, R. 2006. Differences in whole-body protein turnover between Iberian and Landrace pigs fed adequate or lysine-deficient diets. *Journal of Animal Science*, 84:3346-3355.
- Rodríguez-López, J. M., Cantalapiedra-Hijar, G., Durand, D., Isserty-Thomas, A., Ortigues-Marty, I. 2014. Influence of the para-aminohippuric acid analysis method on the net hepatic flux of nutrients in lactating cows. *Journal of Animal Science*, 92:1074-1082.
- Rolfe, R. D. 1997. Colonization resistance. *Gastrointestinal Microbiology*, 2:501-536.
- Rothschild, M. A., Oratz, M., Schreiber, S. S. 1988. Serum albumin. *Hepatology*, 82, 385-401.
- Sainz, R. D., Calvert, C. C., Baldwin, R. L. 1986. Relationships among dietary protein, feed intake and tissue protein turnover in lactating rats. *The Journal of Nutrition*, 116:1820-1829.
- Sato, G. H. 1975. The role of serum in cell culture. *Biochemical Actions of Hormones*, 3:391-396.
- Saunderson, C. L. 1985. Comparative metabolism of L-methionine, DL-methionine and DL-2-hydroxy 4-methylthiobutanoic acid by broiler chicks. *British journal of nutrition*, 54:621-633.
- Savage, D. C. 1986. Gastrointestinal microflora in mammalian nutrition. *Annual Review of Nutrition*, 6:155-178.
- Seglen, P. O. 1972. Preparation of rat liver cells: I. Effect of Ca²⁺ on enzymatic dispersion of isolated, perfused liver. *Experimental Cell Research*, 74:450-454.
- Seglen, P. O. 1976. Preparation of isolated rat liver cells. En: *Methods in Cell Biology* DM Prescott, ed Academic Press, New York, NY, 133.
- Selle, P. H., Ravindran, V., Caldwell, R. A., Bryden, W. L. 2000. Phytate and phytase: consequences for protein utilisation. *Nutrition Research Reviews*, 13:255-278.
- Serra, X., Gil, F., Pérez-Enciso, M., Oliver, M. A., Vázquez, J. M., Gispert, M., Noguera, J. L. 1998. A comparison of carcass, meat quality and histochemical characteristics of Iberian (Guadyerbas line) and Landrace pigs. *Livestock Production Science*, 56:215-223.
- Shoveller, A. K., Brunton, J. A., House, J. D., Pencharz, P. B., & Ball, R. O. (2003b). Dietary cysteine reduces the methionine requirement by an equal proportion in both parenterally and enterally fed piglets. *The Journal of nutrition*, 133(12), 4215-4224.



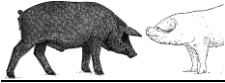
- Shoveller, A. K., Brunton, J. A., Pencharz, P. B., & Ball, R. O. (2003a). The methionine requirement is lower in neonatal piglets fed parenterally than in those fed enterally. *The Journal of nutrition*, 133(5), 1390-1397.
- Shoveller, A. K., Stoll, B., Ball, R. O., & Burrin, D. G. (2005). Nutritional and functional importance of intestinal sulfur amino acid metabolism. *The Journal of nutrition*, 135(7), 1609-1612.
- Simon, O., Bergner, H., Münchmeyer, R., Zebrowska, T. 1982. Studies on the range of tissue protein synthesis in pigs: the effect of thyroid hormones. *British Journal of Nutrition*, 48:571-582.
- Skottner, A., Clark, R. G., Fryklund, L., Robinson, I. C. A. F. 1989. Growth responses in a mutant dwarf rat to human growth hormone and recombinant human insulin-like growth factor I. *Endocrinology*, 124:2519-2526.
- Stegink, L. D., Den Besten, L. 1972. Synthesis of cysteine from methionine in normal adult subjects: effect of route of alimentation. *Science*, 178:514-516.
- Stoll, B., Burrin, D. G. 2006. Measuring splanchnic amino acid metabolism *in vivo* using stable isotopic tracers. *Journal of Animal Science*, 84:60-72.
- Stoll, B., Burrin, D. G., Henry, J. F., Jahoor, F., Reeds, P. J. 1999. Dietary and systemic phenylalanine utilization for mucosal and hepatic constitutive protein synthesis in pigs. *American Journal of Physiology*, 276:49-57.
- Stoll, B., Burrin, D. G., Henry, J., Jahoor, F., Reeds, P. J. 1997. Phenylalanine utilization by the gut and liver measured with intravenous and intragastric tracers in pigs. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 273:1208-1217.
- Stoll, B., Henry, J., Reeds, P. J., Yu, H., Jahoor, F., Burrin, D. G. 1998. Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. *The Journal of Nutrition*, 128:606-614
- Strang, B. D., Bertics, S. J., Grummer, R. R., Armentano, L. E. 1998. Relationship of triglyceride accumulation to insulin clearance and hormonal responsiveness in bovine hepatocytes. *Journal of Dairy Science*, 81:740-747.
- Summerskill, W. H., Wolpert, E. 1970. Ammonia metabolism in the gut. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 23:633-639.
- Takala, J. 1996. Determinants of splanchnic blood flow. *British Journal of Anaesthesia*, 77:50-58.



- Ten Have, G. A., Bost, M. C., Suyk-Wierds, J. C., van den Bogaard, A. E., Deutz, N. E. 1996. Simultaneous measurement of metabolic flux in portally-drained viscera, liver, spleen, kidney and hindquarter in the conscious pig. *Laboratory Animals*, 30:347-358.
- Tomas, F. M., Knowles, S. E., Owens, P. C., Chandler, C. S., Francis, G. L., Read, L. C., Ballard, F. J. 1992. Insulin-like growth factor-I IGF-I and especially IGF-I variants are anabolic in dexamethasone-treated rats. *Biochemical Journal*, 282:91-97.
- Torrallardona, D., Harris, C. I., Coates, M. E., Fuller, M. F. 1996. Microbial amino acid synthesis and utilization in rats: incorporation of N from NH₄Cl into lysine in the tissues of germ-free and conventional rats. *British Journal of Nutrition*, 76:689-700.
- Torrallardona, D., Harris, C. I., Fuller, M. F. 2003. Pigs' gastrointestinal microflora provide them with essential amino acids. *The Journal of Nutrition*, 133:1127-1131.
- Treyer, A., Müsch, A. 2013. Hepatocyte Polarity. *Comprehensive Physiology*, 3:243-287.
- Ushioda, E., Nuwayhid, B., Tabsh, K., Erkkola, R., Brinkman, C. R., Assali, N. S. 1982. Mixing problems in using indicators for measuring regional blood flow. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 142:74-82.
- van der Meulen, J., Bakker, J. G. M., Smits, B., De Visser, H. 1997. Effect of source of starch on net portal flux of glucose, lactate, volatile fatty acids and amino acids in the pig. *British Journal of Nutrition*, 78:533-544.
- van Goudoever, J. B., Stoll, B., Henry, J. F., Burrin, D. G., Reeds, P. J. 2000. Adaptive regulation of intestinal lysine metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97:11620-11625.
- van Klinken, B.J., Einerhand, A.W., Buller, H.A., Dekker, J. 1998. Strategic biochemical analysis of mucins. *Analytical Biochemistry*, 265:103-116
- van Lunen, T. A., Cole, D. J. A., Garnsworthy, P. C., Wiseman, J., Haresign, W. 1996. Energy-amino acid interactions in modern pig genotypes. In *Recent advances in animal nutrition 1996*, 233-261. Nottingham University Press.
- van Milgen, J., Noblet, J. 2000. Modelling energy expenditure in pigs. In: *Modelling Nutrient Utilization in Farm Animals*. J. P. McNamara, J. France, D. E. Beever, ed. CAB International, Oxon, U. K. 103-114.
- van Slyke, D. D., Meyer, G. M. 1912. The Amino-Acid Nitrogen of the Blood Preliminary Experiments on Protein Assimilation. *Journal of Biological Chemistry*, 12:399-410.

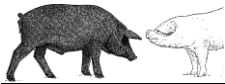


- Veech, R. L., Chance, B., Kashiwaya, Y., Lardy, H. A., Cahill Jr, G. F. 2001. Ketone bodies, potential therapeutic uses. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 51:241.
- Vela, M. E. F. V. 2006. Señalización de la leptina. *Revista de Educación Bioquímica*, 25:50-54.
- Wahren, J., Ekberg, K. 2007. Splanchnic regulation of glucose production. *Annual Review of Nutritio.*, 27:329-345.
- Walsberg, G. E., Hoffman, C. M. 2005. Direct calorimetry reveals large errors in respirometric estimates of energy expenditure. *Journal of Experimental Biology*, 208:1035-1043.
- Webster, A. J. 1981. The energetic efficiency of metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*, 40:121-128.
- Webster, A. J., Lobley, G., Reeds, P. J., Pullar, J. D. 1978. Protein mass, protein synthesis and heat loss in the Zucker rat. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 37:21A-21A.
- Weibel, E. R., Stäubli, W., Gnägi, H. R., Hess, F. A. 1969. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. *The Journal of Cell Biology*, 42:68-91.
- Wiggans, D. S., Johnston, J. M. 1959. The absorption of peptides. *Biochimica et Biophysica Acta*, 32:69-73.
- Williamson, J. R., Gimpel, J. A., Meijer, A. J., DeLeeuw, G. A., Refino C. 1976. In: *Use of Isolated Liver Cells and Kidney Tubules in Metabolic Studies*, Tager JM, Söling HD y Williamson JR Eds. Amsterdam: North-Holland Publ Co.
- Windmueller, H. G. 1982. Glutamine utilization by the small intestine. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 53:37.
- Wittenberg, B. A., White, R. L., Ginzberg, R. D., Spray, D. C. 1986. Effect of calcium on the dissociation of the mature rat heart into individual and paired myocytes: electrical properties of cell pairs. *Circulation Research*, 59:143-150.
- Wostmann, B. S. 1996. Nutrition. In: *Wostmann, B.S. ed Germfree and Gnotobiotic Animal Models*, CRC Press, Boca Raton, FL. 71-87.
- Wu, G. 1995. Urea synthesis in enterocytes of developing pigs. *The Biochemical Journal*, 312:717-723.
- Wu, G. 1998. Intestinal mucosal amino acid catabolism. *The Journal of Nutrition*, 128:1249-1252.
- Wu, G., Knabe, D. A., Flynn, N. E. 2005. Amino acid metabolism in the small intestine: biochemical bases and nutritional significance. *Biology of Growing Animals*, 3:107-126.



- Wu, G., Morris, J. S. 1998. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. *Biochemical Journal*, 336:1-17.
- Yakar, S., Wu, Y., Setser, J., Rosen, C. J. 2002. The role of circulating IGF-I. *Endocrine*, 193, 239-248.
- Yen, J. T. 1997. Oxygen consumption and energy flux of porcine splanchnic tissues. In *Digestive physiology in pigs: Proceedings of the VIIIth International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*.
- Yen, J. T., Killefer, J. 1987. A method for chronically quantifying net absorption of nutrients and gut metabolites into hepatic portal vein in conscious swine. *Journal of Animal Science*, 64:923-934.
- Yen, J. T., Nienaber, J. A., Hill, D. A., Pond, W. G. 1989. Oxygen consumption by portal vein-drained organs and by whole animal in conscious growing swine. *Experimental Biology and Medicine*, 190:393-398.
- Yin, Y. L., McEvoy, J. D. G., Schulze, H., Hennig, U., Souffrant, W. B., McCracken, K. J. 2000a. Apparent digestibility ileal and overall of nutrients and endogenous nitrogen losses in growing pigs fed wheat var. Soissons or its by-products without or with xylanase supplementation. *Livestock Production Science*, 62:119-132.
- Yin, Y. L., McEvoy, J. D. G., Schulze, H., McCracken, K. J. 2000b. Studies on cannulation method and alternative indigestible markers and the effects of food enzyme supplementation in barley-based diets on ileal and overall apparent digestibility in growing pigs. *Animal Science*, 70:63-72.
- Yu, Y. M., Burke, J. F., Vogt, J. A., Chambers, L., Young, V. R. 1992. Splanchnic and whole body L-[1-¹³C, 15N] leucine kinetics in relation to enteral and parenteral amino acid supply. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 262:687-694.
- Zeder, M. A., Emshwiller, E., Smith, B. D., Bradley, D. G. 2006. Documenting domestication: the intersection of genetics and archaeology. *Trends in Genetics*, 22:139-155.
- Zierler, K. L. 1961. Theory of the use of arteriovenous concentration differences for measuring metabolism in steady and non-steady states. *Journal of Clinical Investigation*, 40:2111.

CAPÍTULO 3
METODOLOGÍA



Los cuidados de los animales y los procedimientos experimentales usados en estos experimentos fueron aprobados por el Comité de Bioética del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).

3.1. EXPERIMENTOS *IN VIVO*: DETERMINACIÓN DEL FLUJO NETO PORTAL DE AMINOÁCIDOS, PRODUCCIÓN DE CALOR DE LAS VDP Y PRODUCCIÓN DE CALOR DEL ANIMAL COMPLETO

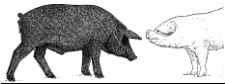
3.1.1. ANIMALES Y DIETAS

Se utilizaron seis hembras Ibéricas y seis Landrace de aproximadamente 25 kg PV inicial a las que se les proporcionó *ad libitum* una dieta estándar y libre acceso al agua hasta que los animales alcanzaron los 28 kg PV, momento en que fueron sometidos a cirugía. Una vez recuperados los animales de la cirugía, se les administraron dos dietas isoenergéticas (14,25 MJ EM/kg MS), que contenían cebada y soja con dos niveles de proteína, la dieta LCP con un nivel de proteína del 14,5% y la HCP con un nivel del 18,7% (MS), en un diseño con intercambio. La determinación de la composición de las dietas (tabla 3.1) se realizó siguiendo la metodología de la AOAC (2000).

**Tabla 3.1.** Composición (g/kg) y análisis químico (materia seca) de las dietas.

Item	DIETA	
	LCP	HCP
Cebada grano	866	802
Torta de soja	96,2	125
Harina de pescado	4	40
Carbonato cálcico (CO ₃ Ca)	8	8
Fosfato bi cálcico (PO ₄ HCa*2H ₂ O)	12	12
Cloruro sódico (ClNa)	5	5
L-Lisina	4,32	3,92
L-Treonina	1,05	0,96
DL-Metionina	0,47	0,21
Corrector vitamínico-mineral*	3	3
Análisis químico		
Materia seca (g/kg)	870,1	875,1
Proteína bruta (g/kg)	145,4	187,1
Cenizas (g/kg)	58,4	60,0
Energía (MJ/kg)	17,8	18,1

*Contiene por kg: retinol, 9836 UI; colecalciferol, 2253 UI; D- α -tocoferol, 2,52 UI; menadiona bisulfato, 1,5 mg; tiamina, 0,15 mg; riboflavina, 3 mg; piridoxina, 0,5 mg; cianocobalamina, 15 μ g; ácido fólico, 15 μ g; ácido nicotínico, 22,5 mg; pantotenato cálcico, 15 mg; Mn, 15 mg; Fe, 75 mg; Zn, 120 mg; I, 60 mg; Cu, 60 mg; Co, 300 mg.



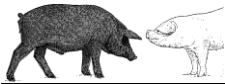
Los animales fueron cateterizados (Rodríguez-López y col., 2013) en vena porta, vena mesentérica y arteria carótida y alojados individualmente en jaulas metabólicas en condiciones de temperatura y humedad controladas. El período de adaptación a la dieta (tabla 3.1) con el nivel de proteína más bajo (14,5% en MS) fue de 7 días y la ingesta fue restringida a 1000 g/d (2,4×EM). La dieta fue fraccionada en dos tomas, del 25 y 75%, ofrecidas a las 09:00 y 15:00 horas respectivamente.

El día 8 se les ofreció a los animales el 25% de la ingesta y se muestreó la sangre durante 6 horas. Tras las 6 horas de muestreo se les suministró a los animales el 75% restante de su ración y se les trasladó en su propia jaula a una cámara de respirometría donde permanecieron 18 horas como período de adaptación. El día 9 se midió la producción de calor en cámaras de respirometría durante 6 horas tras consumir el 25% de la ración del día. Finalizada la medición, los animales recibieron el resto de la ración.

El día 10, los animales, ya fuera de las cámaras de respirometría, tomaron la segunda dieta experimental (18,7% PB en MS) durante 7 días (tabla 3.1) y se procedió a realizar los muestreos de sangre y de producción de calor siguiendo el mismo protocolo descrito.

3.1.2. TOMA DE MUESTRA Y PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Previamente (45 min) al muestreo de sangre, se infundió 15 ml de ácido PAH (2% peso/volumen) a través del catéter situado en la vena ileal seguido de una infusión continua de 0,8 ml/min con una bomba de infusión (Model 33, Harvard Apparatus Inc., Holliston, MA, USA). Se tomaron dos muestras sanguíneas simultáneamente de la arteria carótida y la vena porta, para la determinación de gases y otros metabolitos, 5 min antes y 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5 y 6 horas después de la ingestión del 25% de la ración diaria. Se utilizaron para el muestreo jeringas heparinizadas (Monovette VetMed LH; Sarstedt, Nümbrecht, Germany) de 2,5 ml para gasometría y de 4,5 ml para el resto de determinaciones. Inmediatamente tras el muestreo se midieron en un hemoxímetro (OSM 3 Hemoximeter; Radiometer Corporation, Copenhagen, Denmark) la concentración de

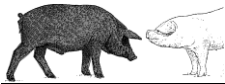


oxígeno y hemoglobina de la sangre arterial y portal. A continuación se tomó una alícuota de sangre heparinizada con un tubo capilar para determinar su hematocrito usando una microcentrífuga (11500 g, 5 min; Biocen, Orto-Alresa, Madrid, Spain). Se centrifugó la sangre mantenida en hielo (Eppendorf 5810R AG, 22331, Hamburg, Germany) para obtener el plasma (4°C, 2000 g durante 30 min) y estas muestras fueron mantenidas a -20°C para la posterior determinación de la concentración de aminoácidos y ácido PAH.

3.1.2.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE PAH EN PLASMA

La solución de ácido PAH (Sigma P-1422) al 2% (peso/volumen) para infundir a los animales se preparó a diario ajustando el pH de la solución a 7,4 con NaOH mediante un pH-metro (Crison GLP 21; Crison Instruments, SA, Alella, Barcelona, Spain) y se esterilizó mediante filtrado a través de unidades de filtración desechables Nalgene (0,22 µm, Nalgene Co., Rochester, N.Y, USA).

Para la determinación del PAH se siguió la técnica fotocolorimétrica de Bratton y Marshal (1939) modificada por Smith (Smith y col., 1945). Las muestras de plasma y suero (0,25 g) se desproteinizaron con 2,5 g de ácido tricloroacético (12% peso/volumen) y posteriormente se centrifugaron a 1308 g, 25° C, 10 min (Eppendorf 5810R AG, 22331, Hamburg, Germany). Una alícuota (1 g) del sobrenadante se colocó en un tubo de precipitado y se añadieron cada 3 min de manera sucesiva 125 µl de los siguientes reactivos: nitrito de sodio (0,1% en peso/volumen), sulfamato de amonio (0,5% peso/volumen) y N-(1-naftil) dihidrocloruro de etilendiamina (0,1% en peso/volumen). Es un análisis colorimétrico utilizado para la cuantificación de sulfonamidas mediante el acoplamiento de sus sales de diazonio con N-(1-naftil) dihidrocloruro de etilendiamina para formar una solución coloreada que absorbe en la región visible. El grupo amino libre del PAH reacciona con el nitrito de sodio en medio ácido dando lugar a la formación de sales de diazonio. El exceso de nitrito de sodio es destruido por el sulfamato de amonio para evitar la formación de compuestos nitrosos. La sal de diazonio es altamente reactiva y forma un complejo coloreado en presencia de N-(1-naftil) dihidrocloruro de etilendiamina en medio ácido. Treinta min después de la última adición de reactivo, las concentraciones se



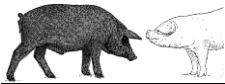
determinaron mediante la medida de la absorbancia a 540 nm (CECIL CE 2041 spectrophotometer 2000 series, CECIL Instruments, Cambridge, England). Se realizaron análisis por cuadruplicado.

3.1.2.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AMINOÁCIDOS EN PLASMA

Se empleó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa ya que su uso para la determinación cuantitativa de aminoácidos en fluidos biológicos es más rápido que con la cromatografía clásica de intercambio iónico (Fekkes y col., 2000; Schwarz y col., 2005).

Seguimos el método Pico-Tag para aminoácidos fisiológicos (Cohen y col., 1989). Se utilizó una columna C18 Waters Pico-Tag (300x3,9 mm, 4 μ m) a una temperatura constante de 38°C y un gradiente multietapas de dos solventes. El solvente A fue una mezcla 0,068 M de acetato de sodio (pH 6,45)-acetonitrilo (97,5:2,5 volumen/volumen) y el solvente B fue agua-acetonitrilo (40:60, volumen/volumen). Se usó la norleucina como estándar interno para la cuantificación.

Las muestras de plasma (500 μ l) recién obtenidas fueron desproteinizadas adicionando 500 μ l de una solución de ácido tricloroacético al 20% con DL-norleucina 2 mM como patrón interno. Posteriormente se sometieron a centrifugación durante 60 min a 2.700 g (Eppendorf 5810R AG, 22331, Hamburg, Germany) con el propósito de separar los aminoácidos libres de la proteína precipitada, protegiendo de esta manera la columna de compuestos de alto peso molecular. Este sobrenadante ácido se mantuvo a -20°C hasta su análisis. El sobrenadante ácido se secó al vacío en una centrífuga termorregulada (SpeedVac, SPD131DDA-230, Thermo, Milford, MA, USA). Seguidamente se añadió la solución de resecado (metanol/acetato sódico 1,0M /triethylamina, 2:2:1) volviéndose a secar en vacío. De esta manera se neutraliza cualquier residuo ácido que pudiera quedar adherido al tubo. A continuación, se añadió el reactivo de derivación (metanol/agua Milli-Q®/triethylamina/ fenilisotiocianato, 7:1:1:1). En esta etapa el grupo amino primario reacciona para formar un fenil-tiocarbamil-aminoácido (PTC-AA) que puede



detectarse con alta sensibilidad a 254 nm, después de haber hecho la separación de los derivados por cromatografía en fase reversa.

La identificación de los aminoácidos se hizo a partir de los tiempos de retención de los picos del patrón. Se intercalan patrones de distinta concentración entre las muestras para corregir las posibles derivas en los tiempos de retención y cuantificar la concentración de aminoácidos a partir de una recta de calibrado con distintas concentraciones de cada aminoácido utilizando la norleucina como patrón interno.

3.1.2.3. DETERMINACIÓN DEL FLUJO SANGUÍNEO DE UN ÓRGANO O TEJIDO

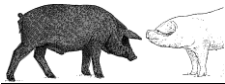
Una vez determinada la concentración de PAH en la sangre arterial y venosa, el flujo sanguíneo de un órgano o tejido (l/h) se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Flujo sanguíneo} = \frac{R_{inf} \text{ PAH} \times C_{inf} \text{ PAH}}{[\text{PAH}]_v - [\text{PAH}]_a}$$

Donde $R_{inf} \text{ PAH}$ (l/h) es la tasa con que se infunde el PAH, $C_{inf} \text{ PAH}$ (mg/l) es la concentración del PAH en la solución infundida y $[\text{PAH}]_v$ y $[\text{PAH}]_a$ es la concentración de PAH en la sangre venosa y arterial (mg/l), respectivamente (Huntington y col., 1990). La concentración de PAH en porta es siempre mayor que en sangre arterial al diluirse el PAH en la circulación general. Cuanto mayor sea la diferencia, es decir, mayor sea la concentración de PAH portal respecto a la arterial, menor es el flujo.

3.1.2.4. DETERMINACIÓN DEL FLUJO NETO PORTAL DE AMINOÁCIDOS

Para la determinación del flujo portal de aminoácidos (mg/min) se empleó la siguiente ecuación:



$$\text{Flujo portal de aminoácidos} = (C_a - C_v) \times FS$$

Donde C representa la concentración de aminoácidos (mg/ml) en la arteria (C_a) o en la vena (C_v) que entra y sale, respectivamente, de las VDP, y FS corresponde al flujo sanguíneo (ml/min) a través las mismas.

3.1.2.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE O_2 EN SANGRE

La saturación de O_2 (%) y cantidad de hemoglobina de la sangre portal y arterial se midieron inmediatamente tras el muestreo en condiciones de anaerobiosis mediante un hemoxímetro (OSM 3 Hemoximeter; Radiometer Corporation, Copenhagen, Denmark).

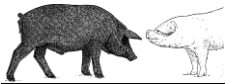
La concentración de O_2 (mM) en sangre arterial y portal se determinó aplicando la siguiente ecuación (Huntington y col., 1990):

$$\text{Concentración de } O_2 = \frac{Hb \times \text{Saturación de } O_2 \times 1,33}{100 \times 22,4}$$

Donde Hb (g/l) es la concentración de hemoglobina en sangre, y los valores 1,33 (ml O_2 /g Hb) y 22,4 (ml O_2 /mmol O_2) son constantes que indican la cantidad de O_2 (ml) presente por g de hemoglobina y milimoles de O_2 , respectivamente.

3.1.2.6. DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE O_2 Y PRODUCCIÓN DE CALOR DE LAS VDP

El consumo de O_2 (mol/min) se determinó empleando la ecuación siguiente:



$$\text{Consumo } O_2 = ([O_2]_A - [O_2]_V) \times FSP$$

Donde $[O_2]$ es la concentración de O_2 (mmol/l) determinada en la sangre extraída tanto de la arteria carótida ($[O_2]_A$) como de la vena porta ($[O_2]_V$) y FSP el flujo sanguíneo portal (l/min) determinado mediante el ácido PAH (Katz y Bergman, 1969).

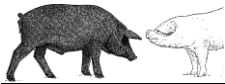
Para calcular la producción de calor de las VDP, se utilizó el valor de 20,4 kJ/l como equivalente energético del O_2 (Rérat y Vaissade, 1993). El valor obtenido se refirió a peso metabólico y día.

3.1.2.7. DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CALOR TOTAL

Según los principios del confinamiento no existe entrada de aire desde el exterior ni salida desde el interior. Para evitar concentraciones de CO_2 más allá del 1% como consecuencia del intercambio gaseoso del animal, lo que le causaría trastornos respiratorios, se renovaba el aire de la cámara antes de alcanzar esa concentración. Al inicio y al final del período de medida, se analizaba O_2 y CO_2 en una alícuota de aire del interior de la cámara, que era devuelta a ella formándose así un circuito cerrado cámara-analizadores de gases (Lachica y col., 1995). Al multiplicar el volumen de la cámara en condiciones estándar por las concentraciones de CO_2 y O_2 , se obtuvo el volumen de estos gases en los períodos inicial y final y, por diferencia de ambos, la cantidad producida y consumida por el animal, respectivamente (Lachica y Aguilera, 2000).

Una vez obtenidos los valores del consumo de O_2 y de producción de CO_2 por el animal, la producción de calor se determinó según la ecuación de Brouwer (1965):

$$PC = (16,18 \times O_2) + (5,02 \times CO_2) - (2,17 \times CH_4) - (5,99 \times N)$$



Donde PC es la producción de calor (kJ), O₂, CO₂ y CH₄ representan volúmenes de O₂ consumido y de CO₂ y CH₄ producidos (l), y N es la cantidad (g) de nitrógeno urinario excretado (McLean, 1972).

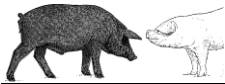
Ni el CH₄ ni el N se consideraron en la determinación de la producción de calor total en los experimentos llevados a cabo, ya que ambos se producen en cantidades mínimas. De hecho, incluso en cerdos alimentados con una dieta alta en fibra, la producción de CH₄ fue inferior al 1,3% del total de energía perdida, situándose en el 0,2% en dietas con bajo contenido; mientras que el N urinario se aproximó al 2,4% del total de energía perdida (Jørgensen y col., 1996). El CH₄ y N urinario excretado contribuyen en torno al 1% de la producción de calor total. En general se considera que el O₂ contribuye aproximadamente el 75% y el CO₂ el 25% restante (McLean, 1972). De ahí que la mayoría de trabajos excluyan igualmente la medición de la producción de CH₄ y de N, realizando sólo medidas del consumo de O₂ y de la producción de CO₂ para la determinación de la producción de calor total del animal (Henken y col., 1991; Yen y col., 1991; van Milgen y col., 1997; Lachica y Aguilera, 2000; Quiniou y col., 2001).

Tradicionalmente, se ha relacionado la producción de calor total con el peso corporal mediante una función alométrica capaz de comparar animales adultos de distintas especies, el llamado tamaño corporal metabólico (Kleiber, 1961).

$$PC = a \times PV^b$$

Donde “a” y “b” son constantes; “a” varía según el mayor o menor plano de alimentación y según la temperatura ambiental, y “b” es el cociente entre el incremento de la producción de calor (PC) con respecto al incremento en el peso corporal (PV).

Normalmente se utiliza un valor de “b” de 0,75, obtenido a partir de comparaciones en la producción de calor en ayunas entre diferentes especies de animales adultos (Kleiber, 1975). Sin embargo, existe una gran variabilidad de esta



constante en comparaciones intraespecíficas (Brown y Mount, 1982) debido a factores diversos como la edad, la raza y/o el nivel de nutrición (Burrin y col., 1989). De hecho, para cerdos en crecimiento, el exponente parece estar cercano a 0,60 (van Milgen y col., 1998). El flujo sanguíneo a través de un órgano también se ha relacionado alométricamente con el peso corporal del animal mediante un valor de “b” de 0,75, lo que significa que animales más grandes tendrían relativamente menor flujo sanguíneo a través de un órgano cuando se expresase por unidad de volumen o peso del órgano (West y col., 1997; Anderson y Holford, 2008).

Los datos de producción de calor se expresaron en relación al peso metabólico con un valor de “b” de 0,75 para su extrapolación a cualquier especie animal.

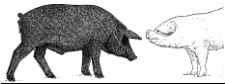
3.2. EXPERIMENTOS *IN VITRO*: AISLAMIENTO Y CULTIVO PRIMARIO DE HEPATOCITOS DE CERDO IBÉRICO

Los lechones Ibéricos y Landrace fueron proporcionados por Sánchez Romero Carvajal Jabugo S.A. (Sevilla, España) y Granja El Arenal (Córdoba, España), respectivamente. Salvo indicación, los reactivos se adquirieron de Sigma Aldrich España.

3.2.1. AISLAMIENTO DE HEPATOCITOS

Los hepatocitos se aislaron a partir de cerdos Ibéricos puros (n=10, 9-45 kg PV) y Landrace (n=8, 23-41 kg PV).

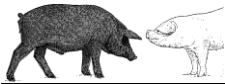
A la llegada, los lechones fueron alimentados de forma restringida, 85% de *ad libitum*, con una dieta comercial estándar. Durante las 24 horas previas al sacrificio se permitió el libre acceso del animal al alimento para que las reservas hepáticas de glucógeno estuviesen completas. De este modo, los hepatocitos pueden aumentar su viabilidad al disponer de las reservas energéticas necesarias durante el aislamiento hasta disponer de un medio de crecimiento que les aporte nutrientes.



Para realizar el aislamiento hemos seguido la “técnica de perfusión de colagenasa en dos pasos” modificada por Seglen (1976). La primera perfusión se llevó a cabo con un medio pobre en Ca^{2+} , que ayuda a disolver las uniones celulares facilitando la acción de las proteasas, mientras que el segundo medio contiene Ca^{2+} para obtener una actividad óptima de la colagenasa.

La técnica comenzó con el sacrificio del lechón mediante desangrado, previo aturdimiento por electronarcosis (200V, 10-13 sec). Tras el sacrificio, se abrió la cavidad abdominal del animal sin romper ninguna sección del tracto digestivo para evitar posibles contaminaciones. Se extrajo el hígado y se seccionó el lóbulo lateral izquierdo encima de una tabla estéril. Dicho lóbulo se introdujo en un medio frío y estéril (Minimum Essential Medium Eagle con Hanks' salts Sigma M9288, 4,464 mM NaCO_3H , 0,2 mM NaOH) y se transportó al laboratorio para canular una rama de la vena porta con la mayor rapidez posible. Se elige una rama que perfunda la mayor parte posible del lóbulo y tras asegurar la cánula de infusión, se recorta el lóbulo hasta un tamaño (80-90 g) que permita la digestión del mismo con enzima colagenasa. Los extremos del lóbulo se cerraban lo más posible cosiéndolos para permitir que el infusato se retenga en el tejido. Durante la canulación y costura del hígado se infunde un tampón frío (4°C) rico en glucosa (buffer A: NaCl 142 mM, KCl 6,7 mM, HEPES 8,5 mM y glucosa 5,55 mM; pH 7,4). Una vez canulado el hígado, se infunde un tampón con EGTA (quelante del Ca^{2+}) a temperatura fisiológica (37°C). A continuación se recircula la solución con colagenasa durante 80 min, incrementando la velocidad de perfusión paulatinamente hasta llegar a un flujo de 90 ml/min. Durante estas etapas es primordial evitar la posible entrada de burbujas, ya que provocaría una disminución del rendimiento del proceso por una perfusión intermitente del lóbulo, reduciendo el número de células que se perfunden.

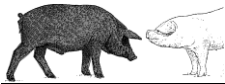
Una vez concluida la recirculación de colagenasa, se seccionó longitudinalmente el lóbulo en condiciones de esterilidad a baja temperatura (4°C), y con ayuda de un raspador se arrastraron con delicadeza los hepatocitos a tubos de centrífuga filtrando con una gasa para retener el tejido conectivo. Se añadió tampón de lavado frío, y se llevaron a cabo sucesivas centrifugaciones (5-6) a bajas revoluciones (80 g) y 4°C hasta obtener un sobrenadante libre de desechos celulares y otras células no parenquimatosas del hígado. Se deben extremar las



precauciones para no aspirar el precipitado de hepatocitos junto con el medio sobrante. A continuación, se procedió a la determinación de la viabilidad de dicho precipitado celular mediante el método de exclusión de azul tripán usando una cámara de Neubauer (Tolnai, 1975) y el microscopio óptico con el objetivo de 20 aumentos.

3.2.2. CULTIVO DE HEPATOCITOS

Tras calcular el porcentaje de viabilidad y el número de células viables totales aisladas, se procedió a la siembra de los hepatocitos en placas de cultivo de 25 cm² con 5 ml de medio William's E suplementado con β-mercaptoetanol (0,1 mM), glutamina (2 mM), antibioticos (gentamicina, penicilina, estreptomicina y anfotericina B), ITS (insulina:transferrina:selenio, 5 μg/ml:2,75 μg/ml:2,5 ng/ml) y con suero bovino fetal (10%, Hyclone, Logan, UT, USA). Las células fueron sembradas a una densidad de 4,5x10⁶ hepatocitos por placa y el rendimiento medio del aislamiento fue de 4,9±0,5x10⁸ hepatocitos viables. La incubación se realiza en estufa a 37°C y 5% de CO₂. Transcurridas 3 horas, se comprobó la adhesión de las células al sustrato mediante su observación por el microscopio. Se lavaron las placas con tampón salino-HEPES y se sustituyó el medio por William's E suplementado con 5% de suero bovino fetal incubándose en estufa hasta la mañana siguiente. Transcurrida la noche, se volvió a comprobar el estado del cultivo al microscopio y se cambió el medio por William's E libre de suero suplementado con dimetil sulfóxido (1 mg/l), carnitina (1 mM), Na₂SeO₃ (100 nM), dexametasona (10 nM), insulina (1 o 100 ng/ml) y glucagón (1, 10 o 100 ng/ml) según las condiciones experimentales de cada ensayo como se describirá más adelante. Todos los medios contenían 2 g/l de glucosa salvo indicación expresa. Para cada condición experimental se utilizaron matraces duplicados y el medio de cultivo se cambiaba cada 24 horas. El hecho de que los hepatocitos mantenían su morfología típica y permanecían sin replicarse durante al menos 120 horas, permitió investigar los efectos a largo plazo de factores del crecimiento y hormonas específicas sobre el metabolismo hepático. Las células se recogían en Triton X-100, lo que disminuye la variabilidad. La figura 3.1 muestra



una fotografía tomada por microscopía óptica con el objetivo de 10 aumentos a las 3 horas de la siembra.

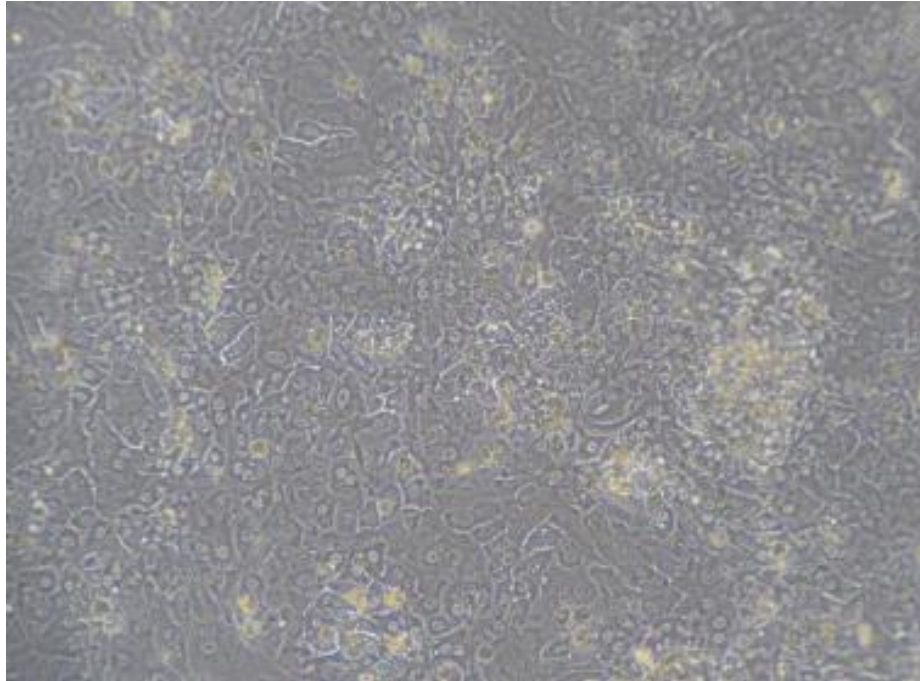


Figura 3.1: Fotografía de placa de cultivo de hepatocitos porcinos tomada con el objetivo de 10 aumentos (Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal, IFNA, EEZ, CSIC. Granada).

3.2.3. CÁLCULO DE PARÁMETROS

3.2.3.1. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA

Para estandarizar la concentración de los distintos metabolitos medidos es habitual expresar su cantidad relativa a la de proteína o ADN del cultivo. La concentración en proteína se analizó por el método colorimétrico de Lowry o Folin-fenol (figura 3.2).

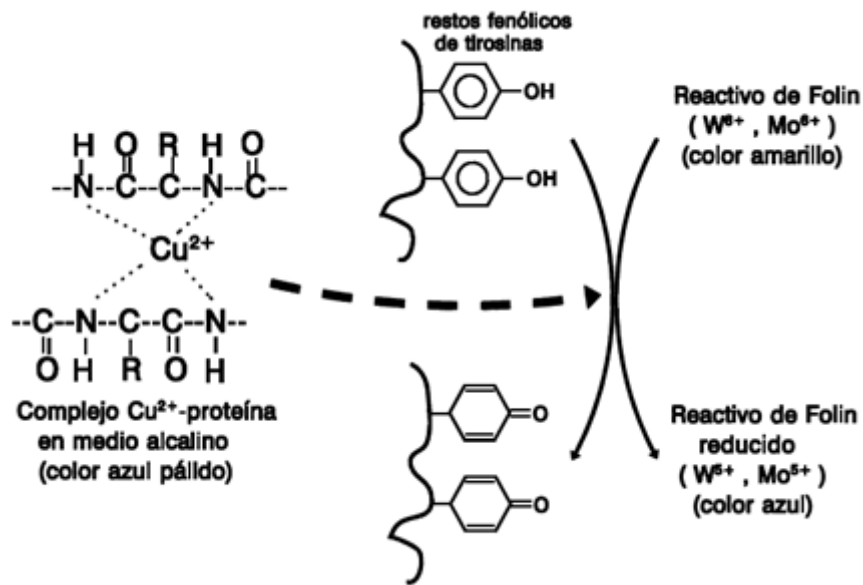
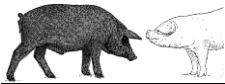
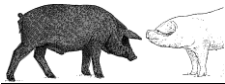


Figura 3.2: Método Lowry (Universidad de Alcalá, www.uah.es).

El método, inicialmente descrito por Lowry y col. (1951), y modificado posteriormente por Peterson (1983), está basado en la reacción de Biuret, en la cual los iones Cu^{2+} acomplejados al tartrato en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de N de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. A continuación se produce la reducción en medio básico del reactivo de Folin-Ciocalteu por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina de la proteína, donde el Cu^{2+} actúa como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido da lugar a un complejo de color azul intenso cuya concentración se mide en un espectrofotómetro a 660 nm.

3.2.3.2. DETERMINACIÓN DE LA GLUCONEOGÉNESIS

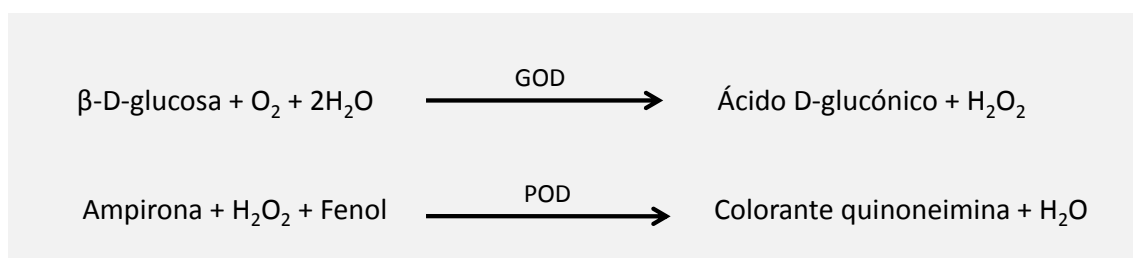
Para cuantificar la GNG (glucosa sintetizada a partir de otros sustratos), las células se preincubaron en unas condiciones que favorecen la degradación de glucógeno (William's E libre de suero suplementado con una concentración de insulina muy baja (1 ng/ml) y alta de glucagón (100 ng/ml) durante 24 horas para



provocar el agotamiento de las reservas hepáticas del mismo. Cada matraz se lavó dos veces con tampón salino-HEPES libre de glucosa. A continuación se incubaron durante 2 horas en un medio libre de glucosa (Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Sigma D5030) con aminoácidos (5,17 mM) insulina (1 ng/ml) y glucagón (100 ng/ml), suplementado con los sustratos gluconeogénicos piruvato, lactato y alanina (0,5 mM). Las células y el medio fueron recogidos y congelados a -80°C hasta su posterior análisis.

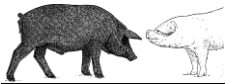
La GNG se cuantificó como glucosa liberada al medio asumiendo que la glucosa procedente de glucogenólisis fue inapreciable debido al agotamiento de las reservas celulares de glucógeno lograda mediante la preincubación con glucagón.

La concentración de glucógeno de las muestras se cuantificó por el método descrito por Nyguyen y col. (1998). En este método las muestras se incuban en ausencia o en presencia de amiloglucosidasa (E.C. 3.2.1.3) para liberar las moléculas de glucosa que forman el glucógeno. La glucosa resultante se cuantifica por el método enzimático-colorimétrico de la glucosa oxidasa peroxidasa (GOD-POD) descrito por Trinder (1969). En el método GOD-POD (figura 3.3), la glucosa oxidasa cataliza la oxidación de la β -D-glucosa a ácido D-glucónico con formación de peróxido de hidrógeno. Éste es utilizado por la enzima peroxidasa para oxidar la ampirona y el fenol dando lugar a una quinoneimina coloreada que posteriormente se mide en espectrofotómetro a 505 nm. La intensidad de color será proporcional a la concentración de glucosa.



GOD: *glucosa oxidasa*; POD: *peroxidasa*.

Figura 3.3: Método GOD-POD (Trinder, 1969).



3.2.3.3. DETERMINACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE GLUCÓGENO

Para la estimación de la glucogenólisis, las células se preincubaron en un medio con elevada concentración de insulina (100 ng/ml), durante 24 horas, con el fin de elevar el contenido de glucógeno celular. Para cuantificar el nivel de glucógeno al inicio se recogieron las células de dos matraces y al resto se le cambió el medio de cultivo por otro sin glucosa y rico en glucagón (DMEM libre de glucosa con glucagón 10 ng/ml e insulina 1 ng/ml), lo que facilitó la degradación de glucógeno y se cultivó durante 3 horas hasta recoger las células para determinar su contenido en glucógeno.

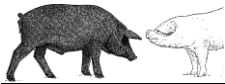
La glucogenólisis se estimó por diferencia entre el contenido de glucógeno de las células recogidas tras la preincubación con niveles máximos de glucógeno y el contenido en glucógeno de las células cultivadas según las condiciones experimentales.

3.2.3.4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE TRIGLICÉRIDOS Y ESTERIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Para el cálculo del contenido de TG se preincubaron las células en un medio con elevada concentración de insulina (100 ng/ml) y baja de glucagón (1 ng/ml) durante 24 horas, con el fin de imitar condiciones postprandiales (matraces control).

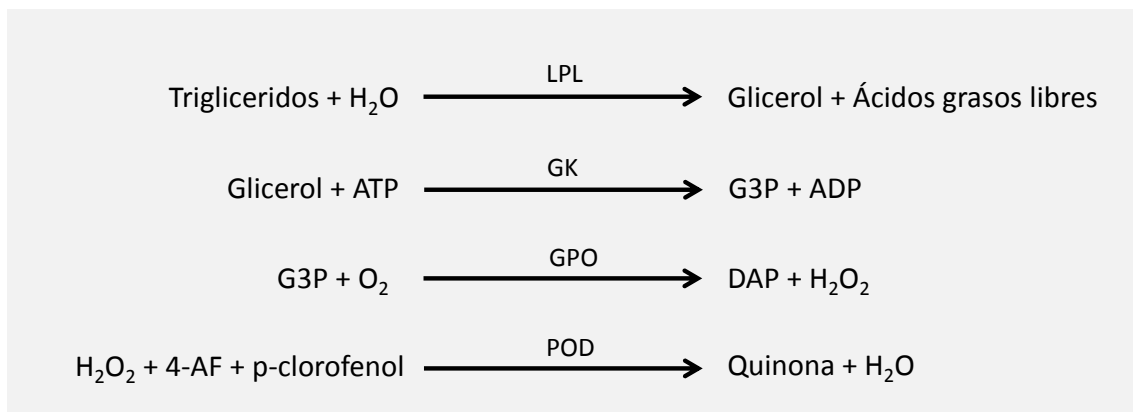
Para el estudio del efecto del tipo de ácido graso (AG) sobre la esterificación las células se cultivaron durante 96 horas en un medio idéntico al anterior al cual se le añadió CLA o bien ácido linoleico (0,2 mM) como precursores de TG.

En el experimento, el contenido de TG en los matraces control se debió fundamentalmente al contenido inicial de TG más la lipogénesis a partir de glucosa o sustratos gluconeogénicos ya que no se agregó a los medios AG libres. Mientras que en los matraces suplementados con los AG libres, CLA o LA, el contenido de TG fue la suma del contenido inicial de TG, la lipogénesis *de novo* y la esterificación de



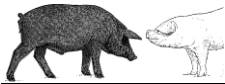
los AG añadidos. De esta manera, se calculó la esterificación por diferencia asumiendo que no hubo ningún efecto de la presencia de AG libres en la lipogénesis *de novo*, ya que el diseño no permitía estudiar el efecto de cada AG en la lipogénesis *de novo*.

El contenido intracelular de TG se determinó extrayendo los lípidos celulares con isopropanol según el método descrito por Ametaj y col. (2003) y cuantificando los TG por el método enzimático-colorimétrico de la glicerolfosfato deshidrogenasa peroxidasa (GPO-POD; Bucolo y col., 1973). En este método (figura 3.4), los TG incubados con lipoproteinlipasa (LPL) liberan glicerol y AG libres. El glicerol es fosforilado por la glicerol quinasa (GK) en presencia de ATP para producir glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces oxidado a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) por la G3P deshidrogenasa (GPO). El peróxido de hidrogeno reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y p-clorofenol, en presencia de peroxidasa (POD), obteniéndose una quinona coloreada que absorbe a 505 nm y cuya concentración es proporcional al contenido en TG de la muestra.



LPL: *lipoproteinlipasa*; GK: *glicerol quinasa*; G3P: *glicerol-3-fosfato*; GPO: *glicerol-3-fosfato deshidrogenasa*; DAP: *dihidroxiacetona fosfato*; 4-AF: *4-aminofenazona*; POD: *peroxidasa*.

Figura 3.4: Método GPO-POD (Bucolo y col., 1973).



3.2.3.5. DETERMINACION DE LA SÍNTESIS DE UREA

Para la determinación de urea, se preincubaron las células en un medio con elevada concentración de insulina (100 ng/ml) y baja de glucagón (1ng/ml) durante 24 horas (estado postprandial). Posteriormente se cultivaron durante 3 horas en medios idénticos al anterior a los cuales se les añadió cloruro de amonio para alcanzar concentraciones de 2,5, 5 o 10 mM de amonio.

La producción de urea se estimó por diferencia entre el contenido de urea de las células cultivadas en medios con diferentes concentraciones de amonio y el contenido en urea de las células cultivadas en un medio con una concentración de amonio de 0 mM.

La urea fue determinada mediante espectrofotometría UV/VIS utilizando un método colorimétrico (*o*-Ftalaldehído 37°C, Labkit, Chemelex, S.A., Barcelona, España) en el cual la urea presente en la muestra reacciona con el *o*-ftalaldehido en medio ácido originando un complejo coloreado que puede cuantificarse espectrofotométricamente:

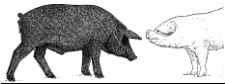


Figura 3.5: Método *o*-ftalaldehído 37°C (Kaplan y col., 1984).

La intensidad del color formado puede ser medida en el espectrofotómetro a 510 nm siendo proporcional a la concentración de urea en la muestra ensayada.

3.2.3.6. DETERMINACIÓN DE LA SÍNTESIS DE ALBÚMINA

Para la estimación de la capacidad de producción de albúmina las células fueron preincubadas en un medio con albúmina de suero bovino (BSA) bien con una



elevada concentración de insulina o de glucagón durante 24 horas. Posteriormente estos medios fueron reemplazados por medios similares pero esta vez sin BSA durante otras 24 horas.

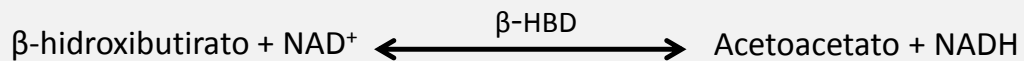
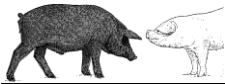
La albúmina fue determinada en el medio de cultivo mediante técnica inmunoenzimática utilizando para ello un kit comercial (Pig albumin ELISA quantitation kit; Bethyl, Montgomery, USA). El procedimiento utilizado fue un Elisa tipo sandwich en el que el primer anticuerpo no marcado captura el antígeno de la muestra y lo retiene. Posteriormente se añadía una solución con un segundo anticuerpo conjugado con una enzima que era la que detectaba al antígeno de la muestra. Por último, se añade el sustrato enzimático en la solución, se dejó reaccionar y se determinó la densidad óptica mediante espectrofotometría (450 nm).

3.2.3.7. DETERMINACIÓN DE LA SÍNTESIS DE β -HIDROXIBUTIRATO

Para el estudio de la formación de β -hidroxibutirato las células fueron preincubadas durante 24 horas en medios con alta (estado postprandial) o bien con baja (ayuno) relación insulina/glucagón. Posteriormente estos medios fueron reemplazados por medios idénticos y cultivadas durante 24 horas más.

Debido a que se esperaban niveles bajos de β -hidroxibutirato se empleó la fluorimetría para aumentar la sensibilidad de medida del NADH (excitación: 350 nm, emisión: 455 nm) usando un fluorímetro (HTS 7000, Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA).

Se determinó siguiendo una modificación de Harano y col. (1985) y Williamson y Mellanby (1974) para microplacas. La técnica se fundamenta en que la enzima (β -HBD) cataliza la oxidación del β -hidroxibutirato a acetoacetato. Durante la oxidación, una cantidad equimolar de NAD^+ se reduce a NADH. El NADH absorbe la luz a 340 nm y así, el aumento de la absorbancia es directamente proporcional a la concentración del cuerpo cetónico en la muestra.



β -HBD: *β -hidroxibutirato deshidrogenasa.*

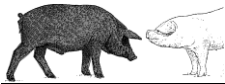
Figura 3.6: Oxidación del β -hidroxibutirato a acetoacetato.

3.2.3.8. DETERMINACION DE LA SÍNTESIS DE IGF-I

Para la determinación de la capacidad de síntesis de IGF-I se preincubaron las células en un medio con elevada concentración de insulina (100 ng/ml) y baja de glucagón (1 ng/ml) durante 24 horas. Posteriormente este medio se reemplazó por otro idéntico y tras 24 horas de incubación en las condiciones descritas, se realizó la recogida y almacenamiento del medio a -80°C hasta su posterior análisis. (w

Como los niveles en el medio de cultivo de IGF-I eran casi indetectables se procedió a la concentración del medio (12 veces) mediante una centrifuga de vacío (SpeedVac, SPD131DDA-230, Thermo, Milford, MA, USA).

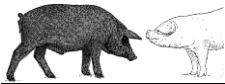
La cuantificación de la IGF-I en las muestras se llevó a cabo por ensayo inmunorradiométrico (IRMA, Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Webster, TX, USA, cat. no DSL-5600; Milles y col., 1974) previamente validado (Fernández-Fígares y col., 2007). El procedimiento utilizado incluyó un paso de extracción en el que la IGF-I se separa de sus proteínas transportadoras (IGFBP) mediante incubación con una solución etanólica de ácido clorhídrico. El IRMA es un ensayo no competitivo en el que la IGF-I (analito) queda fijada entre dos anticuerpos en una reacción tipo sandwich. El primer anticuerpo (de captura) se encuentra adherido a un soporte fijo y el segundo, marcado radiactivamente con ^{125}I , se une a la IGF-I unida al anticuerpo de captura formando el complejo tipo sandwich. La radiactividad medida es directamente proporcional a la cantidad de analito, contrariamente al radioinmunoensayo clásico. El reactivo marcado que no se haya unido se elimina mediante decantación y lavado de las muestras. Posteriormente se mide la radiactividad en un contador gamma.



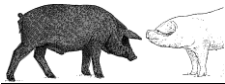
El coeficiente de variación intra e inter-ensayo fue de 2,5 y 6,7%, respectivamente.

3.3. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

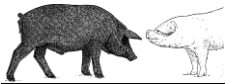
- Ametaj, B.N., Bobe, G., Lu, Y., Young, J.W., Beitz, D.C. 2003. Effect of sample preparation, length of time, and sample size on quantification of total lipids from bovine liver. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:2105-10.
- Anderson, B. J., Holford, N. H. 2008. Mechanism-based concepts of size and maturity in pharmacokinetics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 48:303-332.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists. 2000. *Official Methods of Analysis*. 17th Ed. Arlington, VA, USA.
- Bratton, C. A., Marshall, E. K. 1939. A new coupling component for sulfanilamide determination. *Journal of Biological Chemistry*, 128:537-550.
- Brouwer, E. 1965. Report of sub-committee on constants and factors, in *Proceedings of the 3rd Symposium on Energy Metabolism*. EAAP. London, Academic Press, 11:441-443.
- Brown, D., Mount, L. E. 1982. The metabolic body size of the growing pig. *Livestock Production Science*, 9:389-398.
- Bucolo, G., David, H. 1973. Quantitative determination of serum triglycerides by use of enzymes. *Clinical Chemistry*, 19:476-482.
- Burrin, D. G., Ferrell, C. L., Eisemann, J. H., Britton, R. A., Nienaber, J. A. 1989. Effect of level of nutrition on splanchnic blood flow and oxygen consumption in sheep. *British Journal of Nutrition*, 62:23-34.
- Cohen, S. A., Meys, M., Tarvin, T. L. 1989. *The Pico. Tag Method: A Manual of Advanced Techniques for Amino Acid Analysis*. Water's Manual, 2.
- Fekkes, D., Voskuilen-Kooyman, A., Jankie, R., Huijmans, J. 2000. Precise analysis of primary amino acids in urine by an automated high-performance liquid chromatography method: comparison with ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 744:183-188.



- Fernández-Figares, I., Lachica, M., Nieto, R., Rivera-Ferre, M.G., Aguilera, J. 2007. Serum profile of metabolites and hormones in obese (Iberian) and lean (Landrace) growing gilts fed balanced or lysine deficient diets. *Livestock Science*, 110:73-81.
- Harano, Y., Ohtsuki, M., Ida, M., Kojima, H., Harada, M., Okanishi, T., Shigeta, Y. 1985. Direct automated assay method for serum or urine levels of ketone bodies. *Clinica Chimica Acta*, 151:177-183.
- Henken, A. M., van der Hel, W., Brandsma, H. A., Verstegen, M. W. 1991. Difference in energy metabolism and protein retention of limit-fed growing pigs of several breeds. *Journal of Animal Science*, 69:1443-1453.
- Huntington, G. B., Eisemann, J. H., Whitt, J. M. 1990. Portal blood flow in beef steers: comparison of techniques and relation to hepatic blood flow, cardiac output and oxygen uptake. *Journal of Animal Science*, 68:1666-1673.
- Jørgensen, H., Zhao, X. Q., Eggum, B. O. 1996. The influence of dietary fibre and environmental temperature on the development of the gastrointestinal tract, digestibility, degree of fermentation in the hind-gut and energy metabolism in pigs. *British Journal of Nutrition*, 75:365-378.
- Kaplan, A. 1984. Urea. *Clinical Chemistry The CV Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton*, 1257-1260.
- Katz, M. L., Bergman, E. N. 1969. Simultaneous measurements of hepatic and portal venous blood flow in the sheep and dog. *American Journal of Physiology*, 216:946-952.
- Kleiber, M. 1961. *The fire of life*. ed. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Kleiber, M. 1975. *The fire of life. An introduction to animal energetic*. 2nd ed. Robert E. Krieger Publishing Co., New York.
- Lachica, M., Aguilera, J. F. 2000. Estimation of the energy costs of locomotion in the Iberian pig *Sus mediterraneus*. *British Journal of Nutrition*, 83:35-41.
- Lachica, M., Prieto, C., Aguilera, J. F. 1995. A confinement respiration chamber for short gaseous exchange measurements. *Archives of Animal Nutrition*, 48:329-336.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*, 193:265-75.
- McLean, J. A. 1972. On the calculation of heat production from open-circuit calorimetric measurements. *British Journal of Nutrition*, 27:597-600.

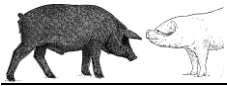


- Miles, L. E. M., Lipschitz, D. A., Bieber, C. P., Cook, J. D. 1974. Measurement of serum ferritin by a 2-site immunoradiometric assay. *Analytical Biochemistry*, 61:209-224.
- Nguyen, L. T., Stephenson, D. G., Stephenson, G. M. 1998. A direct microfluorometric method for measuring subpicomole amounts of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, glucose, and glycogen. *Analytical biochemistry*, 259: 274-278.
- Peterson GL. 1983. Determination of total protein. *Methods in enzymology*, 91:95-119.
- Quiniou, N., Noblet, J., van Milgen, J., Dubois, S. 2001. Modelling heat production and energy balance in group-housed growing pigs exposed to low or high ambient temperatures. *British Journal of Nutrition*, 85:97-106.
- Rérat, A., Vaissade, P. 1993. Relations entre la prise alimentaire et la consommation d'oxygène des organes drainés par la veine porte chez le porc éveillé. *Reproduction Nutrition Development*, 33:235-251.
- Rodríguez-López, J. M., Lachica, M., González-Valero, L., Fernández-Figares, I. 2013. Approaches for quantifying gastrointestinal nutrient absorption and metabolism in a native and a modern pig breed. *Journal of Agricultural Science*, 151:434-443.
- Schwarz, E. L., Roberts, W. L., Pasquali, M. 2005. Analysis of plasma amino acids by HPLC with photodiode array and fluorescence detection. *Clinica Chimica Acta*, 354:83-90.
- Seglen, P. O. 1976. Preparation of isolated rat liver cells. En: *Methods in Cell Biology* DM Prescott, ed Academic Press, New York, NY, 133.
- Smith, H.W., Finkelstein, N., Aliminosa, L., Crawford, B., Graber, M., 1945. The renal clearances of substituted hippuric acid derivatives and other aromatic acids in dogs and man. *Journal of Clinical Investigation*, 24:388-404.
- Tolnai, S. 1975. A method viable for cell count. *Methods in Cell Science*, 1:37-38.
- Trinder, P. 1969. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry in medicine*, 6:24-27.
- van Milgen, J., Bernier, J. F., Lecozler, Y., Dubois, S., Noblet, J. 1998. Major determinants of fasting heat production and energetic cost of activity in growing pigs of different body weight and breed/castration combination. *British Journal of Nutrition*, 79:509-517.
- van Milgen, J., Noblet, J., Dubois, S., Bernier, J. F. 1997. Dynamic aspects of oxygen consumption and carbon dioxide production in swine. *British Journal of Nutrition*, 78:397-410.



- West, G. B., Brown, J. H., Enquist, B. J. 1997. A general model for the origin of allometric scaling laws in biology. *Science*, 276:122-126.
- Williamson, D. H., Mellanby, J. A. N. E. 1974. D-(-)-3-hydroxybutyrate. *Methods of Enzymatic Analysis*, 4:1836-1839.
- Yen, J. T., Nienaber, J. A., Klindt, J., Crouse, J. D. 1991. Effect of ractopamine on growth, carcass traits, and fasting heat production of US contemporary crossbred and Chinese Meishan pure-and crossbred pigs. *Journal of Animal Science*, 69:4810-4822.

CAPÍTULO 4
PRUEBAS EXPERIMENTALES



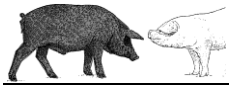
Differences in portal appearance of lysine and methionine in Iberian and Landrace pigs



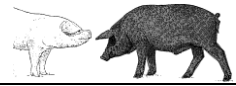
4.1 PRUEBA 1

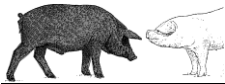
Differences in portal appearance of lysine and methionine in Iberian and Landrace pigs

(Journal of Animal Science, 2012)



Differences in portal appearance of lysine and methionine in Iberian and Landrace pigs





Differences in portal appearance of lysine and methionine in Iberian and Landrace pigs



JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE

The Premier Journal and Leading Source of New Knowledge and Perspective in Animal Science

Differences in portal appearance of lysine and methionine in Iberian and Landrace pigs

L. Gonzalez-Valero, J. Rodriguez-Lopez, M. Lachica and I. Fernandez-Figares

J ANIM SCI 2012, 90:110-112.

doi: 10.2527/jas.51774

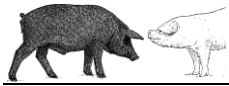
The online version of this article, along with updated information and services, is located on the World Wide Web at:

http://www.journalofanimalscience.org/content/90/Supplement_4/110

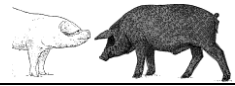


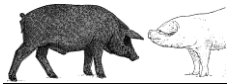
American Society of Animal Science

www.asas.org



Differences in portal appearance of lysine and methionine in Iberian and Landrace pigs





Differences in portal appearance of lysine and methionine in Iberian and Landrace pigs¹

L. Gonzalez-Valero, J. Rodriguez-Lopez, M. Lachica, and I. Fernandez-Figares²

Institute of Animal Nutrition, Estacion Experimental del Zaidin, CSIC, Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain

ABSTRACT: Compared to modern breeds, Iberian pigs have lower rates of muscle protein deposition and greater viscera weight. Factors that limit growth performance of Iberian pigs are unknown. We hypothesized that differences in net portal appearance of the essential AA Lys and Met might partially explain the lower growth rate reported in Iberian pigs compared to modern breeds. Net portal appearance of AA was measured in 6 Iberian and 6 Landrace gilts (28 kg BW) fitted with chronic catheters in the portal vein, carotid artery, and mesenteric vein. Blood samples were taken for 6 h after feeding 2 isoenergetic diets (14.0 to 14.5

MJ ME/kg DM) with low CP (LCP) and high CP (HCP) (13 vs. 16%, respectively) in a crossover design after a 1-wk adaptation. Net portal appearance of Lys was greater ($P < 0.05$) when pigs consumed the HCP than LCP diet (23 vs. 15 $\mu\text{mol}/\text{min}$); breeds did not differ. Net portal appearance of Met tended to be higher ($P = 0.076$) for pigs fed HCP than LCP diet (4.4 vs. 3.6 $\mu\text{mol}/\text{min}$); breeds did not differ. In conclusion, differences in portal appearance of Lys and Met did not exist between Iberian and Landrace pigs fed barley (*Hordeum vulgare*)–soybean (*Glycine max*) diets with low and high protein concentration.

Key words: amino acid, pig, portal appearance

© 2012 American Society of Animal Science. All rights reserved.

J. Anim. Sci. 2012.90:110–112

doi:10.2527/jas51774

INTRODUCTION

The Iberian pig has a reduced capacity for protein deposition at maximal growth compared with fast growing lean breeds (Nieto et al., 2002). Furthermore, whole-body protein synthesis and degradation rates were lower in Iberian than Landrace pigs when given an optimal dietary AA supply (Rivera-Ferre et al., 2006). Surprisingly, muscle fractional protein synthesis was higher in Iberian than in Landrace growing gilts (Rivera-Ferre et al., 2005), although muscles were smaller in the former. Splanchnic tissues contribution to total BW was greater in Iberian than Landrace pigs (Rivera-Ferre et al., 2005) although portal drained viscera heat production was higher for the latter (Rodríguez-López et al., 2010). Information about the digestive capacity of Iberian pigs is controversial. The N digestibility was lower for Iberian compared to Landrace postweaning pigs (Rivera-Ferre et al., 2006) and apparent total tract digestibility of CP did not differ in piglets (Freire et al., 2003). Differential capacity of AA absorption or

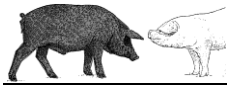
use by the gastrointestinal tract would imply diverging amount of nutrients available to the peripheral tissues. Nevertheless, little information exists that compares capacity of AA absorption between modern and native pig breeds. The main objective of this study was to investigate differences between Iberian and Landrace growing pigs on portal appearance of Lys and Met after feeding diets with low and high CP concentration.

MATERIALS AND METHODS

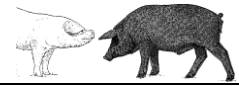
The experiment was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee at the Spanish National Research Council. Six purebred Iberian and 6 Landrace gilts (25 kg BW) allowed ad libitum access to a standard diet were allocated in a controlled environment room ($21 \pm 1.5^\circ\text{C}$) in individual pens until surgery and fed once a day with free access to water. At 28 kg BW pigs were surgically fitted with 3 chronic indwelling catheters: in the portal vein (PV) and mesenteric vein (MV) and in the carotid artery (CA) as previously described (Rodríguez-López et al., 2010). Pigs resumed their normal eating habits in 3 d. Isoenergetic barley–soybean meal diets (14.0 to 14.5 MJ ME/kg DM) of low CP (LCP) and high CP (HCP) content (13 vs.

¹This research was supported by grants AGL 2006-5937 and AGL 2009-8916 from the Spanish Ministry of Science and Education.

²Corresponding author: ifigares@eez.csic.es



Differences in portal appearance of lysine and methionine in Iberian and Landrace pigs



16%, respectively) were restrictively fed (1000 g/d; 2.4 × ME for maintenance) in a crossover design with a 1-wk adaptation for both diets. Forty-five minutes prior to blood sampling a 15 mL pulse dose of para-aminohippuric acid (PAH; 2% w/v) was infused into the MV followed by an infusion of 0.8 mL/min. A 4.5-mL blood sample was anaerobically taken simultaneously from the CA and PV 5 min before and every 30 min for 4 h and then hourly until 6 h after feeding 25% of the total daily ration. Blood was centrifuged for hematocrit and plasma harvested and stored at -20°C until analysis for PAH and free AA by HPLC. Net portal appearance of AA was calculated by multiplying the porto-arterial plasma concentration difference of the AA by the portal plasma flow rate. The portal blood flow (PBF) rate was estimated using PAH as indicator and the hematocrit. Repeated measures analyses were carried out using the mixed procedure of SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). An α -level of 0.05 was used for determination of significance.

RESULTS AND DISCUSSION

Feeding increased ($P < 0.001$) plasma Lys and Met in both portal and arterial samples and net portal appearance throughout the postprandial period (data not shown). The postprandial increase in portal and arterial concentrations of AA and the subsequent gradual decrease are similar to results in the literature (Lenis et al., 1996; Yen et al., 2004a).

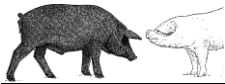
The PBF of pigs was less ($P < 0.001$) when pigs were fed the LCP than the HCP diet (Table 1). This greater PBF could be a circulatory response to a more active gastrointestinal function related to the process of digestion and absorption of a higher amount of protein in HCP diet. Furthermore, this response might be further enhanced by the secretion and reabsorption of endogenous AA associated with digestion of a diet with greater protein content to release more protein-bound AA (Yen et al., 2004a). Both portal and arterial plasma Lys and Met were greater ($P < 0.01$) when pigs were fed the HCP than when fed the LCP diet. The overall net portal appearance

of Lys during the 6-h postprandial period was greatest ($P < 0.05$) when pigs consumed the HCP and Met net portal appearance tended to be higher ($P < 0.10$). Simoes Nunes et al. (1991) reported increased AA absorption when pigs fed 24% casein were compared to pigs fed 12% casein diets, except for Met. The greater portal absorptions of Lys when pigs were fed the HCP diet might be caused by increased reabsorption of endogenous Lys from greater gut endogenous protein secretion. A high proportion of endogenously secreted protein is digested along with dietary protein and absorbed before the terminal ileum in pigs (Nyachoti et al., 1997) and the ileal endogenous protein of growing pigs contains high concentrations of Lys (Boisen and Moughan, 1996). Additionally, the quantity of endogenous protein secreted into the gut increases substantially with increasing dietary protein levels (Nyachoti et al., 1997).

We did not find comparisons of capacity of AA absorption between breeds in the literature. Although Iberian pigs have greater viscera weight relative to BW compared to modern breeds (Rivera-Ferre et al., 2005), Iberian compared to Landrace pigs had a lower ($P < 0.001$) PBF in the present study and in previous studies (Rodríguez-López et al., 2010) and could be related to the lower energy requirement of Iberian compared to modern pigs (Nieto et al., 2002). Nevertheless, compared with Western crossbred pigs, Meishan pigs had greater pre- and postprandial PBF rates (Yen et al., 2004b), probably due to the greater viscera mass of the latter. The mean PBF in the present study is similar to results in pigs 35 to 55 kg (Yen et al., 1989, 2004b; Lenis et al., 1996; Rodríguez-López et al., 2010). The overall net portal appearance of Lys and Met during the 6-h postprandial period was similar in both breeds ($P > 0.10$). In spite of the greater PBF rate in Landrace pigs, mean postprandial Lys and Met net portal appearance were similar in Landrace and Iberian pigs. Portal balance of Lys and Met was within the range of values reported in Large White pigs (Simoes Nunes et al., 1991) fed casein or rapeseed proteins, crossbred barrows fed casein diets

Table 1. Arterial and portal concentrations ($\mu\text{mol/L}$) and net portal appearance (NPA; $\mu\text{mol/min}$) of Lys and Met and portal blood flow (PBF; mL/min) in Iberian and Landrace pigs receiving either low CP (LCP; 13% CP) or high CP (HCP; 16% CP) diets

Item	Breed		SE ¹	Diet		SE ¹	P-value		
	Iberian	Landrace		LCP	HCP		Breed	Diet	Breed × diet
PBF	776	1178	22	924	1030	23	<0.001	<0.001	0.184
Arterial Lys	238	211	6.7	214	235	7.1	0.004	0.023	0.467
Portal Lys	270	235	7.9	238	268	8.3	0.002	0.007	0.172
Lys NPA	18	20	1.7	15	23	1.8	0.32	0.001	0.363
Arterial Met	31	29	1.0	28	32	1.1	0.165	0.006	0.269
Portal Met	37	34	1.2	33	38	1.3	0.056	0.002	0.004
Met NPA	3.6	4.3	0.36	3.5	4.4	0.38	0.204	0.076	<0.001

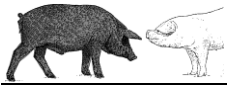


supplemented or not with fiber (Lenis et al., 1996), or crossbred piglets fed milk protein (Stoll et al., 1998).

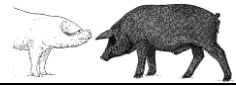
In conclusion, differences in portal appearance of Lys and Met did not exist between Iberian and Landrace pigs fed barley–soybean diets of different protein concentration.

LITERATURE CITED

- Boisen, S., and P. L. Moughan. 1996. Dietary influences on endogenous ileal protein and amino acid loss in the pig. A review. *Acta Agric. Scand., Sect. A* 46:154–164.
- Freire, J. P. B., R. I. M. Dias, L. F. Cunha, and A. Aumaitre. 2003. The effect of genotype and dietary fibre level on the caecal bacterial enzyme activity of young piglets: Digestive consequences. *Anim. Feed Sci. Technol.* 106:119–130.
- Lenis, N. P., P. Bikker, J. van der Meulen, J. T. van Diepen, J. G. Bakker, and A. W. Jongbloed. 1996. Effect of dietary neutral detergent fiber on ileal digestibility and portal flux of nitrogen and amino acids and on nitrogen utilization in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 74:2687–2699.
- Nieto, R., A. Miranda, M. A. Garcia, and J. F. Aguilera. 2002. The effect of dietary protein content and feeding level on the rate of protein deposition and energy utilization in growing Iberian pigs from 15 to 50 kg body weight. *Br. J. Nutr.* 88:39–49.
- Nyachoti, C. M., C. F. M. de Lange, B. W. McBride, and H. Schulze. 1997. Significance of endogenous gut nitrogen losses in the nutrition of growing pigs: A review. *Can. J. Anim. Sci.* 77:149–163.
- Rivera-Ferre, M. G., J. F. Aguilera, and R. Nieto. 2005. Muscle fractional protein synthesis is higher in Iberian than in Landrace growing pigs fed adequate or lysine-deficient diets. *J. Nutr.* 135:469–478.
- Rivera-Ferre, M. G., J. F. Aguilera, and R. Nieto. 2006. Differences in whole-body protein turnover between Iberian and Landrace pigs fed adequate or lysine-deficient diets. *J. Anim. Sci.* 84:3346–3355.
- Rodríguez-López, J. M., M. Lachica, L. González-Valero, and I. Fernández-Figares. 2010. Energy expenditure of splanchnic tissues in Iberian and Landrace growing gilts. *Livest. Sci.* 133:61–63.
- Simoes Nunes, C., I. Galibois, A. Rérat, L. Savoie, and P. Vaugelade. 1991. Hepatic and portal-drained viscera balances of amino acids, insulin, glucagon and gastrin in the pig after ingestion of casein or rapeseed proteins. *Reprod. Nutr. Dev.* 31:217–231.
- Stoll, B., J. Henry, P. J. Reeds, H. Yu, F. Jahoor, and D. G. Burrin. 1998. Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. *J. Nutr.* 128:606–614.
- Yen, J. T., B. J. Kerr, R. E. Easter, and A. M. Parkhurst. 2004a. Difference in rates of net portal absorption between crystalline and protein-bound lysine and threonine in growing pigs fed once daily. *J. Anim. Sci.* 82:1079–1090.
- Yen, J. T., J. A. Nienaber, D. A. Hill, and W. G. Pond. 1989. Oxygen consumption by portal vein-drained organs and by whole animal in conscious growing swine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 190:393–398.
- Yen, J. T., V. H. Varel, and J. A. Nienaber. 2004b. Metabolic and microbial responses in western crossbred and Meishan growing pigs fed a high-fiber diet. *J. Anim. Sci.* 82:1740–1755.



Differences in portal appearance of lysine and methionine in Iberian and Landrace pigs



References

This article cites 13 articles, 7 of which you can access for free at:
http://www.journalofanimalscience.org/content/90/Supplement_4/110#BL



Contribution of portal-drained viscera to heat production in iberian gilts fed a high protein diet: comparison to Landrace



4.2 PRUEBA 2

Contribution of portal-drained viscera to heat production in Iberian gilts fed a high protein diet: comparison to Landrace



Contribution of portal-drained viscera to heat production in iberian gilts fed a high protein diet: comparison to Landrace





CONTRIBUTION OF PORTAL-DRAINED VISCERA TO HEAT PRODUCTION IN IBERIAN GILTS FED A HIGH PROTEIN DIET: COMPARISON TO LANDRACE.

INTRODUCTION:

In terms of whole-body metabolism, visceral tissues have a disproportionate influence with respect to their masses and under certain circumstances their high metabolic rate may compromise nutrient availability to the tissues of productive/economic interest. Splanchnic tissues contribution to total BW was greater in Iberian than Landrace pigs (Rivera-Ferre et al., 2005) for that reason we hypothesized that the low energy efficiency of Iberian compared to modern breeds could partially be explained by a higher contribution of portal-drained viscera to heat production.

This experiment is closely linked to our previously published work (Rodríguez-López et al., 2010) in which the portal-drained viscera heat production (VDPHP) was measured. Rodríguez-López et al. (2010) observed lower postprandial portal blood flow (PBF; 970 vs. 1357; $P < 0.05$) and PDVHP (3.25 vs. 4.17; $P < 0.05$) in Iberian compared to Landrace pigs fed high protein content diet (HCP; 187 g/kg of CP and 14–14.5MJ ME/kg DM). Similar results were reported when the same Iberian and Landrace gilts were fed a diet with lower protein content (LCP; 145 g/kg of CP and 14–14.5MJ ME/kg DM; Rodríguez-López et al., 2011).

The objective of this study was to determine the relative contribution of PDVHP to total heat production (THP) in Iberian and Landrace gilts fed a HCP diet.



MATERIAL AND METHODS:

Animals, diets and surgery

All procedures used in this study (AGL2006-05937/GAN) were approved by the Bioethical Committee of the Spanish Council for Scientific Research (CSIC, Spain), and the animals cared for in accordance with the Royal Decree No. 1201/2005 (Spain). Twelve gilts 6 purebred Iberian (Silvela strain) and 6 Landrace gilts (25 kg BW) were used. The pigs were housed in individual pens in a controlled environment room ($21 \pm 1.5^\circ\text{C}$). *Ad libitum* access to a standard diet (145 g crude protein (CP) kg^{-1} dry matter (DM) and 14.3 MJ metabolizable energy (ME) kg^{-1} DM) and water was offered before the study. After surgery, pigs from both genotypes were fed at $2.4 \times$ ME for maintenance ($444 \text{ kJ d}^{-1} \text{ kg}^{-0.75}$; NRC, 1998). The daily ration was offered in two portions, at 09.00 (0.25) and 15.00 h (the remaining 0.75). Composition and chemical analysis of the diet (table 2) was performed by standard procedures (AOAC, 2000).

Experimental design and analyses

Gilts (29 kg BW) were fasted 24 h before surgery. Three catheters were placed: in carotid artery (CA) and portal vein (PV) for blood sampling, and in mesenteric vein (MV) for para-aminohippuric acid (PAH) infusion to measure blood flow. Detailed description of the catheters design, construction and maintenance, surgical procedure and post-surgery care of pigs have been reported previously (Rodríguez-López et al., 2013). Pigs were on metabolic cages and restrictively fed along the



Contribution of portal-drained viscera to heat production in iberian gilts fed a high protein diet: comparison to Landrace



whole experiment twice a day 25 and 75% of the daily ration (1 kg) at 9 am and 3 pm, respectively. Pigs resumed their regular eating habits in 3 d. Two trials were carried out. First trial began when animals recovered their pre-surgery appetite for at least 7 days, 10 days on average. A 15 mL pulse dose of para-aminohippuric acid (PAH; 2% w/v; Yen and Killefer, 1987) into IV was administered 45 min prior the first blood sampling, followed by a continuous infusion of 0.8 mL min⁻¹ using a syringe pump (Model 33, Harvard Apparatus Inc., Holliston, MA, USA). Two blood samples per sampling site using 2 and 4.5 mL (Blood Gas-Monovette for blood traits and Monovette VetMed for packed cell volume (PCV) and PAH analysis, respectively; Sarstedt, Nümbrecht, Germany) heparinized tubes were taken anaerobically, simultaneously from CA and PV -5 min, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5 and 6 h after feeding 0.25 of total daily ration. Blood O₂ and total haemoglobin were measured immediately with a hemoximeter (OSM 3 Hemoximeter, Radiometer Corporation, Copenhagen, Denmark). Plasma was obtained by centrifugation (4°C and 1145 g for 30 min) and stored at -20°C until PAH analysis using the gravimetric approach (Lobley et al., 1995). PCV was determined using a microcentrifuge (11 500 g for 5 min; Biocen, Orto-Alresa, Ajalvir, Madrid, Spain). The remaining daily ration was given immediately after sampling. Whole-blood flow and O₂ consumption rates were based on Fick principle. For the second trial, after blood sampling pigs were individually moved on their own metabolic cage to a respirometry chamber. After 18 h of adaptation, THP was measured over 6 h following the same feeding protocol of first trial.



Statistical analysis

Repeated measures analyses were carried out for total haemoglobin, PCV and postprandial PBF, arterio-portal O₂ concentration difference, PDV O₂ consumption and PDVHP using the mixed procedure of SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Breed, time, and breed × time interaction were treated as fixed effects. Animal was a random effect and gilt was used as the experimental unit.

The GLM procedure of SAS was performed to analyse THP, RQ and preprandial PBF, where breed was considered the main effect and gilt was the experimental unit. Differences between means for the main effects were established using the Tukey's procedure. The differences were considered significant when $P < 0.05$ and a trend if $0.05 < P < 0.10$.

RESULTS AND DISCUSSION:

Compared to Landrace, Iberian gilts (29 ± 0.9 kg body weight (BW)) had lower postprandial PDVHP (3.25 vs. 4.17 kJ h⁻¹ kg^{-0.75}; $P < 0.01$) and PDVHP/THP ratio (0.096 vs. 0.135). THP was higher in Iberian gilts (33.7 vs. 30.8 kJ h⁻¹ kg^{-0.75}) although differences were not significant (table 2).

The lower PDVHP of Iberian pigs compared to Landrace was unexpected. Rivera-Ferre et al. (2005) observed heavier weight (as a proportion of BW) of stomach, large intestine, total GIT and liver of Iberian compared to Landrace gilts of approximately 25 kg BW, whereas Barea et al. (2011) did not find differences in total GIT in heavier Iberian compared to Landrace × Large White pigs. Nevertheless, narrower duodenal and ileal Tunica muscularis total width were found in Iberian compared to Landrace ×



Contribution of portal-drained viscera to heat production in iberian gilts fed a high protein diet: comparison to Landrace



Large White (Barea et al., 2011). Muscle layers in the small intestine of pigs have been related to a resistance of digesta passage and hence digesta transit through the small intestine (Redlich et al., 1997; Laplace et al., 1994) which would enhance tissue energy expenditure. This fact and the lower ileal villi length and villi-to-crypt ratio in Iberian compared to Landrace×Large White pigs (Barea et al., 2011), would be in accordance with decreased postprandial O₂ consumption by the PDV of Iberian compared to Landrace gilts. Furthermore the Iberian gilts were slightly more restricted (Nieto et al., 2001; BSAS, 2003) compared to Landrace (71 and 90% ad libitum, respectively). Iberian pigs have a greater voluntary feed intake than Landrace gilts, which might confound the intake of nutrients (Nieto et al., 2001; Morales et al., 2002) for that reason the intake was restricted so that the same amount of feed was offered to Iberian and Landrace gilts.

Similar THP was found when Meishan were compared to Meishan×White composite and Duroc×White composite crossbred pigs (Yen et al., 1991b; Hansen et al., 1997; Yen et al., 2004). However, Rodríguez-López (2011) obtained higher THP in Iberian compared to Landrace gilts (38.5 and 31.8, respectively; P<0.05) restricted to the same extent and fed 14.5% CP diets. On the other hand, reduced fasting HP (basal metabolic rate) was found in Meishan compared to Large White and Pietrain barrows of 22-27 kg BW (van Milgen *et al.*, 1998). Despite the similarities significant metabolic differences exist when Iberian and Meishan pigs are compared. Unfortunately there is lack of information in the literature about differential THP in lean and obese pigs.

The values of THP of Landrace and Iberian gilts in our experiments (30.8 and 33.7 kJ h⁻¹ kg^{-0.75}, respectively) were slightly higher than the values found in the literature



Contribution of portal-drained viscera to heat production in iberian gilts fed a high protein diet: comparison to Landrace



in pigs of different breeds and BW (Henken et al., 1991; Yen et al., 1991a; Schrama et al., 1996; Jørgensen et al., 1996; Brown-Brandl et al., 2001; Chwalibog et al., 2004). Although these results were similar to the values described by Rodríguez-López et al. (2011) in gilts restricted to the same extent but fed diets with a lower protein content (14.5% DM, 31.8 and 38.5 kJ h⁻¹ kg^{-0.75} for Landrace Iberian, respectively).

It is interesting that Iberian pigs had higher THP compared to Landrace pigs. Protein is less efficient from an energetic point of view than lipid synthesis (van Milgen and Noblet, 2003). In fact, HP associated with protein deposition in nonruminants is approximately twice that of fat accretion (Yen *et al.*, 1991b). The high muscle protein turnover and degradation rate of Iberian pigs compared to Landrace (Rivera-Ferre *et al.*, 2005), would imply an elevated energetic cost reflected in THP and might explain their low partial efficiency of ME for protein deposition (Nieto *et al.*, 2002). Also, greater THP of Iberian with respect to Landrace pigs could be partly explained by their higher degree of alertness since there is evidence of a common origin for Iberian and Spanish wild boar (Alves *et al.*, 2003). It is known the relationship between the grade of wildness and alertness (Price, 1984 and 1999) and the greater energy expenditure (THP) coupled with these facts (Robert *et al.*, 1987; Gustafsson *et al.*, 1999).

The PDV contribution to THP (0.096 for Iberian and 0.135 for Landrace) was similar compared with results obtained by Rodríguez-López et al. (2011) using the same pigs and experimental design than in the present experiment and fed a 145 g CP kg⁻¹ DM diet. Nevertheless Yen *et al.* (2004) reported greater PDVHP/THP ratio with Duroc×White composite crossbred and Meishan pigs (0.30 and 0.48,



Contribution of portal-drained viscera to heat production in iberian gilts fed a high protein diet: comparison to Landrace



respectively) probably as a result of the lower energy offered in the present study (0.25 of daily ration) to monitor PDVHP and THP for 6 h (0.25 of the day length). Although PDVHP might have been underestimated, differences in PDVHP between Iberian and Landrace pigs seem to exist.

PDVHP in Landrace and Iberian gilts in the present experiment (4.17 and 3.25 kJ h⁻¹ kg^{-0.75}, respectively) were lower than values reported in the literature for other breeds as the Large White (6,8-7,17 kJ h⁻¹ kg^{-0.75}) in barrows of 59 kg BW (Rerat and Vaissade, 1993) or Meishan and WhitexDuroc crossbred pigs composite (8.95 and 7.75 kJ h⁻¹ kg^{-0.75}, respectively) similar BW to those in our study. These differences could be related to differences associated with the type of diet and / or level of intake (Rodríguez-López et al., 2011). Jørgensen and Zhao (1997) measured the consumption of O₂ in the duodenal mucosa of rats fed different protein content diets and observed a higher PDV O₂ consumption with increasing protein content diet. Similarly, Rodriguez-Lopez et al. (2010) obtained a lower postprandial PDV O₂ consumption in the Iberian and Landrace gilts (1.35 and 1.82 mmol/min, respectively) when a lower protein content diet was offered (145 g CP/kg DM). PDV O₂ consumption in lambs fed *ad libitum* decreased 37% when the amount of food intake was restricted to maintain body weight during 21 days (Burrin et al., 1989). As feed intake has a great impact on PDV O₂ consumption, it was decided to feed the gilts with an amount of feed proportional to the measurement period (6 hours). Animals consumed only 25% of the daily ration (<10 g diet/kg BW), which would allow to extrapolate the results to 24 hours without incurring the overestimation due to increased O₂ consumption that would occur if total ration was given in the beginning of the measurement period. Thus the low values obtained for Iberian and Landrace



Contribution of portal-drained viscera to heat production in iberian gilts fed a high protein diet: comparison to Landrace



could be due to low energy intake offered for measurements compared to other studies (Rérat and Vaissade., 1993; Yen et al, 2004)

The RQ obtained (0.76-0.77), could be related to a preferential lipid oxidation which is in line with the low level of intake offered. Although RQ is a good indicator of normal animal metabolism it must be taken with caution (Kleiber, 1972).

CONCLUSION:

In the present study, the low energetic efficiency and growth rate of Iberian pigs compared to modern breeds cannot be explained by increased contribution of portal-drained viscera (PDV) to whole body energy expenditure. The high THP observed in Iberian breed may help to understand differences in efficiency of energy utilization and growth rate between native and modern breeds.



Contribution of portal-drained viscera to heat production in iberian gilts fed a high protein diet: comparison to Landrace



LITERATURE CITED:

- Alves, E., Ovilo, C., Rodriguez, M. C., Silio, L. 2003. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogenetic relationships among Iberian pigs and other domestic and wild pig populations. *Animal Genetics*, 34:319-324.
- AOAC, Association of Official Analytical Chemists. 2000. *Official Methods of Analysis*. 17th Ed. Arlington, VA, USA.
- Barea, R., Nieto, R., Vitari, F., Domeneghini, C., Aguilera, J. F. 2011. Effects of pig genotype Iberian v. Landrace×Large White) on nutrient digestibility, relative organ weight and small intestine structure at two stages of growth. *Animal*, 5:547-557.
- Brown-Brandl, T. M., Eigenberg, R. A., Nienaber, J. A., Kachman, S. D. 2001. Thermoregulatory profile of a newer genetic line of pigs. *Livestock Production Science*, 71:253-260.
- BSAS, British Society of Animal Science. 2003. *Nutrient requirement standards for pigs*. BSAS, Penicuik, United Kingdom.
- Burrin, D. G., Ferrell, C. L., Eisemann, J. H., Britton, R. A., Nienaber, J. A. 1989. Effect of level of nutrition on splanchnic blood flow and oxygen consumption in sheep. *British Journal of Nutrition*, 62:23-34.
- Chwalibog, A., Tauson, A. H., Thorbek, G. 2004. Energy metabolism and substrate oxidation in pigs during feeding, starvation and re-feeding. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 88:101-112.
- Gustafsson, M., P. Jensen, F. H. de Jonge, and T. Schuurman. 1999. Domestication effects on foraging strategies in pigs *Sus scrofa*. *Applied Animal Behaviour Science*, 62:305- 317.
- Hansen, J. A., Yen, J. T., Nelssen, J. L., Nienaber, J. A., Goodband, R. D., Wheeler, T. L. 1997. Effects of somatotropin and salbutamol in three genotypes of finishing barrows: growth, carcass, and calorimeter criteria. *Journal of Animal Science*, 75:1798-1809.
- Henken, A. M., van der Hel, W., Brandsma, H. A., Verstegen, M. W. 1991. Difference in energy metabolism and protein retention of limit-fed growing pigs of several breeds. *Journal of Animal Science*, 69:1443-1453.
- Jørgensen, H., Zhao, X. Q. 1997. Influence of environmental temperature on in vivo energy expenditure and in vitro ouabain-sensitive respiration in duodenal mucosa and liver in rats fed different levels of dietary fibre or protein. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 36:278-284.
- Jørgensen, H., Zhao, X. Q., Eggum, B. O. 1996. The influence of dietary fibre and environmental temperature on the development of the gastrointestinal tract, digestibility, degree of fermentation in the hind-gut and energy metabolism in pigs. *British Journal of Nutrition*, 75:365-378.
- Kleiber, M. 1972. The fire of life. *Acribia*. 79-90.
- Laplace J. P., Souffrant, W. B., Hennig, U., Chabeauti, E., Fevrier, C. 1994. Measurement of precaecal dietary protein and plant cell wall digestion in pigs; comparison of four surgical procedures for ileorectal anastomosis. *Livestock Production Science*, 40:313-328.
- Lobley, G. E., Connell, A., Lomax, M. A., Brown, D. S., Milne, E., Calder, A. G., Farningham, D. A. H. 1995. Hepatic detoxification of ammonia in the ovine liver: possible consequences for amino acid catabolism. *British Journal of Nutrition*, 73:667-685.



Contribution of portal-drained viscera to heat production in iberian gilts fed a high protein diet: comparison to Landrace



- Morales, J., Pérez, J. F., Baucells, M. D., Mourot, J., Gasa, J. 2002. Comparative digestibility and lipogenic activity in Landrace and Iberian finishing pigs fed ad libitum corn-and corn-sorghum-acorn-based diets. *Livestock Production Science*, 77:195-205.
- Nieto, R., Lara, L., García, M. A., Gómez, F., Zalvide, M., Cruz, M., Aguilera, J. F. 2001. Evaluation of an integrated feeding system in the Iberian pig. Study of food consumption and productive parameters. *Sólo Cerdo Ibérico*, 6:57-69.
- Nieto, R., Miranda, A., García, M. A., Aguilera, J. F. 2002. The effect of dietary protein content and feeding level on the rate of protein deposition and energy utilization in growing Iberian pigs from 15 to 50 kg body weight. *British Journal of Nutrition*, 88:39-49.
- NRC, National Research Council, Nutrient Requirements of Swine, 10th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC 1998.
- Price, E. O. 1984. Behavioral aspects of animal domestication. *Quarterly Review of Biology*, 1-32.
- Price, E. O. 1999. Behavioral development in animals undergoing domestication. *Applied Animal Behaviour Science*, 65:245-271.
- Redlich, J., Souffrant, W. B., Laplace, J. P., Hennig, U., Berg, R., Mouwen, J. M. V. M. 1997. Morphometry of the small intestine in pigs with ileo-rectal anastomosis. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 61:21-27.
- Rérat, A., Vaissade, P. 1993. Relations entre la prise alimentaire et la consommation d'oxygène des organes drainés par la veine porte chez le porc éveillé. *Reproduction Nutrition Development*, 33:235-251.
- Rivera-Ferre, M. G., Aguilera, J. F., Nieto, R. 2005. Muscle fractional protein synthesis is higher in Iberian than in Landrace growing pigs fed adequate or lysine-deficient diets. *Journal of Nutrition*, 135:469-478.
- Robert, S., Dancosse, J., and Dallaire, A. 1987. Some observations on the role of environment and genetics in behaviour of wild and domestic forms of *Sus scrofa* European Wild Boars and Domestic Pigs. *Applied Animal Behaviour Science*, 17:253-262.
- Rodríguez-López, J. M. 2011. Contribución al gasto energético de las vísceras que drenan al sistema porta en cerdos Ibéricos y Landrace en crecimiento. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España
- Rodríguez-Lopez, J. M., Lachica, M., Gonzalez-Valero, L., Fernandez-Figares, I. 2013. Approaches for quantifying gastrointestinal nutrient absorption and metabolism in a native and a modern pig breed. *Journal of Agricultural Science*, 151:434-443.
- Rodríguez-López, J. M., Lachica, M., González-Valero, L., Fernández-Figares, I. 2010. Energy expenditure of splanchnic tissues in Iberian and Landrace growing gilts. *Livestock Science*, 133:61-63.
- Schrama, J. W., Verstegen, M. W., Verboeket, P. H., Schutte, J. B., Haaksma, J. 1996. Energy metabolism in relation to physical activity in growing pigs as affected by type of dietary carbohydrate. *Journal of Animal Science*, 74:2220-2225.
- Van Milgen, J., Noblet, J. 2003. Partitioning of energy intake to heat, protein, and fat in growing pigs. *Journal of Animal Science*, 81:86-93.
- Yen, J. T., Killefer, J. 1987. A method for chronically quantifying net absorption of nutrients and gut metabolites into hepatic portal vein in conscious swine. *Journal of Animal Science*, 64:923-934.



Contribution of portal-drained viscera to heat production in iberian gilts fed a high protein diet: comparison to Landrace



- Yen, J. T., Nienaber, J. A., Hill, D. A., Pond, W. G. 1991a. Potential contribution of absorbed volatile fatty acids to whole-animal energy requirement in conscious swine. *Journal of Animal Science*, 69:2001-2012.
- Yen, J. T., Nienaber, J. A., Klindt, J., Crouse, J. D. 1991b. Effect of ractopamine on growth, carcass traits, and fasting heat production of US contemporary crossbred and Chinese Meishan pure-and crossbred pigs. *Journal of Animal Science*, 69:4810-4822.
- Yen, J. T., Varel, V. H., Nienaber, J. A. 2004. Metabolic and microbial responses in western crossbred and Meishan growing pigs fed a high-fiber diet. *Journal of Animal Science*, 82:1740-1755.



Contribution of portal-drained viscera to heat production in iberian gilts fed a high protein diet: comparison to Landrace



Table 1. Composition (g kg⁻¹) and chemical analysis (dry matter basis) of diet

Item	Amount
Barley grain	802
Soybean meal	125
Fish meal	40
Calcium carbonate	8
Calcium acid phosphate	12
Sodium chloride	5
L-Lysine	3.92
L-Threonine	0.96
DL-Methionine	0.21
Vitamin-mineral premix*	3
Chemical analysis	
Dry matter (g kg ⁻¹)	875.1
Crude protein (g kg ⁻¹)	187.1
Ash (g kg ⁻¹)	60.0
Gross energy (MJ kg ⁻¹)	18.1

* Provided per kg of complete diet: 9836 international units (IU) of vitamin A as retinyl acetate; 2253 IU of vitamin D3 as cholecalciferol; 2.52 IU of vitamin E as DL- α -tocopheryl acetate; 1.5 mg of menadione sodium bisulfite; 0.15 mg of thiamine; 3 mg of riboflavin; 0.15 mg of pyridoxine; 15 μ g of cyanocobalamin; 15 μ g of folic acid; 22.5 mg of nicotinic acid; 15 mg of D-pantothenic acid as calcium pantothenate; 15 mg of Mn as MnSO₄·4H₂O; 75 mg of Fe as FeSO₄·7H₂O; 120 mg of Zn as ZnO; 450 μ g of I as KI; 60 mg of Cu as CuSO₄·5H₂O; and 300 μ g of Co as CoSO₄·7H₂O.



Contribution of portal-drained viscera to heat production in iberian gilts fed a high protein diet: comparison to Landrace



Table 2. Portal-drained viscera heat production, total heat production and respiratory quotient of Iberian (n=6) and Landrace gilts (n=6) fed 0.25 of their daily ration (values are mean±SEM for ten postprandial measurements)

	Iberian	Landrace	SEM
PDVHP (kJ h ⁻¹ kg ^{-0.75}) *	3.25 ^a	4.17 ^b	3.4
THP (kJ h ⁻¹ kg ^{-0.75})	33.7	30.8	0.99
PDVHP/THP	0.096	0.135	
RQ	0.763	0.766	0.01

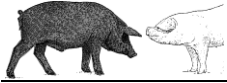
Values within a row with unlike superscript letter were significantly different ($P < 0.05$).

*Rodríguez-López et al. (2010)

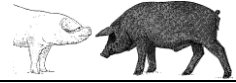


Contribution of portal-drained viscera to heat production in iberian gilts fed a high protein diet: comparison to Landrace





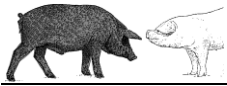
Metabolic differences in hepatocytes of obese and lean pigs



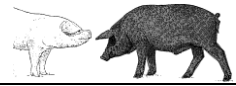
4.3 PRUEBA 3

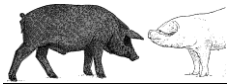
Metabolic differences in hepatocytes of obese and lean pigs

(Animal, 2014)



Metabolic differences in hepatocytes of obese and lean pigs





Metabolic differences in hepatocytes of obese and lean pigs

L. González-Valero, J. M. Rodríguez-López, M. Lachica and I. Fernández-Fígares[†]

Department of Physiology and Biochemistry of Animal Nutrition, Estación Experimental del Zaidín, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Camino del Jueves s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain

(Received 25 November 2013; Accepted 27 May 2014; First published online 15 July 2014)

There are important differences in terms of metabolic activity, energy utilization and capacity of protein and fat deposition when Iberian and modern pigs are compared. Primary culture of hepatocytes was used to evaluate hepatic function and sensitivity to hormones between breeds without the interference of circulating blood factors. Hepatocytes were isolated from pure Iberian (n = 10) and Landrace (n = 8) pigs of similar BW (24.5 ± 12.1 and 32.9 ± 6.1 kg BW, respectively), by collagenase perfusion. Monolayers were established in medium containing fetal bovine serum for 1 day and switched to serum-free medium for the remainder of the culture period. Hepatocytes were maintained in William's E supplemented with β-mercaptoethanol (0.1 mM), glutamine (2 mM), antibiotics (gentamicin, penicillin, streptomycin and amphotericin B), dimethyl sulfoxide (1 μg/ml), dexamethasone (10⁻⁸ M), insulin (0.173 and 17.3 nM) and glucagon (0.287, 2.87 and 28.7 nM) for 24 to 48 h. Gluconeogenesis (GNG), glycogen degradation, triglycerides (TG) content and esterification, β-hydroxybutyrate (BHB) synthesis, IGF-1 synthesis, albumin and urea synthesis were determined. Iberian pigs had greater capacity of GNG than Landrace (24%, P < 0.05), although no difference in glycogen degradation was found (P > 0.10). TG content and esterification tended to be lower in hepatocytes from Iberian compared with Landrace pigs (12% and 31%, respectively; 0.10 < P < 0.05). Furthermore, addition of free fatty acids (CLA or linoleic acid, 0.2 mM) increased TG content (64%, P < 0.001) although no difference between fatty acids was found. When free fatty acids were compared, a trend toward increased esterification (41%, P = 0.078) was found for CLA. Although glucagon stimulated and insulin inhibited BHB synthesis, no difference between breeds was found (P > 0.10). IGF-1 synthesis was diminished in hepatocytes from Iberian compared with Landrace pigs (16%, P < 0.05). On the contrary, rate of albumin synthesis was greater in Iberian compared with Landrace pigs (58%, P < 0.05). Finally, the capacity of urea synthesis was lower in hepatocytes of Iberian compared with Landrace pigs (37%, P < 0.05). When ammonia was added to the media, urea concentration increased (648%, 1108% and 2791% when 0 mM was compared with 2.5, 5 and 10 mM, respectively). Urea synthesis increased on increasing ammonia content (55% and 325% when 0 mM was compared with 5 and 10 mM, respectively; P < 0.0001). In conclusion, the genetic background accounts for important differences in protein and energy metabolism pathways found in primary culture of hepatocytes from lean and obese pigs.

Keywords: hepatocytes, metabolism, pig

Implications

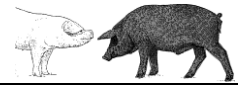
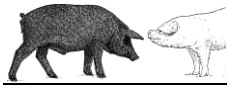
Several studies have shown the existence of numerous dissimilarities in metabolic activity between Iberian and modern pig breeds that might be explained by genotypic differences. Primary hepatocyte cultures are a valuable tool to study specific metabolic liver functions, without the interference of changing levels of metabolites and hormones found *in vivo*. These cultures give more clear-cut results than freshly isolated cells, perfused liver, liver slices or *in vivo* experiments. Furthermore, primary cultures, unlike immortalized cell lines, retain the specific liver functions and characteristics of the donor animal.

Introduction

It is well established that genetic background of piglets have a deep impact on their growth and development, which may be mediated by differences in metabolism and nutrient partitioning between fat and protein accretion among pig breeds. Considering the vascular route followed by ingested nutrients, the liver, for its anatomic position and metabolic functions, plays an essential role in nutrient distribution to peripheral tissues. In terms of whole-body metabolism, the liver has a disproportionate influence with respect to its mass and under certain circumstances its high metabolic rate may compromise nutrient availability to the periphery.

Primary hepatocytes in monolayer culture is a good technique to study functional aspects of the liver where

[†] E-mail: ifigares@eez.csic.es



González-Valero, Rodríguez-López, Lachica and Fernández-Figares

metabolic events can be studied in a defined, easily manipulated, population of cells over a period of days or even weeks, enabling long-term tests. Moreover, in animal science, hepatocytes are a valuable tool to elucidate regulation of metabolism by hormones or mechanism of action of nutrients or additives after digestive absorption by the animal. Nevertheless, there is a lack of information about differences in metabolic activity in hepatocytes from breeds with divergent metabolic profile. The Iberian pig is an obese slow growing Mediterranean breed with higher whole-body fat content than lean-type pigs and distinct hormone and metabolite profile (Fernández-Figares *et al.*, 2007). When comparing breeds with disparate metabolic profiles it is presumable that hepatocytes may behave differently. In addition, porcine hepatocytes more often serve as a non-rodent model in pharmacology and toxicology research and they have not been extensively characterized. Therefore, the aim of the present experiment was to determine differences in metabolic activity in primary hepatocytes isolated from pure Iberian and Landrace pigs that may help to explain the divergent metabolic profile found *in vivo*.

Material and methods

Isolation of liver cells and cell culture

Care and treatment of all pigs were approved in advance by the Institutional Bioethical Committee of CSIC. Except where noted, reagents were purchased from Sigma Aldrich, Tres Cantos, Madrid, Spain. Hepatocytes were isolated from pure Iberian ($n = 10$, 9 to 45 kg BW) and Landrace ($n = 8$, 23 to 41 kg BW) pigs. Piglets were restrictively fed (85% *ad libitum*) a standard commercial diet. The day before slaughter they had free access to food. After stunning by electric shock they were exsanguinated and livers were immediately excised, the left lateral lobe removed and transported from the abattoir to the cell culture laboratory in ice cold sterile transport media (Minimum Essential Medium Eagle with Hanks' salts Sigma M9288, 4.46 mM NaCO_3H , 0.2 mM NaOH) as quick as possible (5 min). Hepatocytes were isolated essentially as published by Conde-Aguilera *et al.* (2012). Viability of isolated hepatocytes from animals was $81.4 \pm 4.7\%$ (trypan blue dye exclusion) and cell yield from each liver preparation was $4.9 \pm 0.5 \times 10^8$ viable hepatocytes ($n = 18$).

Cell culture was described elsewhere (Conde-Aguilera *et al.*, 2012). Insulin (0.173 and 17.3 nM) and glucagon (0.287, 2.87 and 28.7 nM) concentrations are indicated for each assay. Media glucose concentration was 11.1 mM except for gluconeogenesis (GNG) assay. Duplicate flasks were used for each experimental condition.

GNG

Cells were cultured on day 1 for 24 h in serum-free basal medium with low insulin (0.173 nM)/glucagon (28.7 nM) ratio, mimicking fasting state, to deplete glycogen stores and washed twice with warm glucose-free 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)-buffered saline and subsequently cultured for 2 h in glucose free Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM; Sigma D5030) containing

amino acids (5.17 mM), lactate and pyruvate (0.5 mM) and a low insulin (0.173 nM)/glucagon (28.7 nM) ratio. GNG was estimated as glucose released to the media assuming negligible glycogenolysis (Conde-Aguilera *et al.*, 2012). Free glucose in the media was measured using an enzymatic method, Glucose Trinder GOD-POD (Labkit, Chemelex, S.A., Barcelona, Spain).

Glycogen degradation

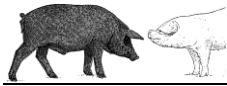
Cells were cultured on day 1 for 24 h in culture medium with high insulin (17.3 nM)/glucagon (0.287 nM) ratio to achieve maximal glycogen content and two flasks harvested to set the starting point for glycogen degradation estimation. The rest of the flasks were washed twice with warm glucose free HEPES-buffered saline and cultured for 3 h in glucose-free DMEM with glucagon (2.87 nM) to ease glycogen degradation and insulin (0.173 nM). Cells were harvested and frozen at -80°C . Glycogen degradation was quantified as the difference in glycogen content of cells with full glycogen load (after 24 h culture with 17.3 nM insulin) and cells where degradation was facilitated (2.87 nM glucagon). Glycogen in cell homogenates was determined as described by Fernández-Figares *et al.* (2004), except that the enzymatic method used was Glucose Trinder.

Triglycerides (TG) content and esterification from fatty acids

Cells were cultured for 24 h in basal medium with high insulin (17.3 nM)/glucagon (0.287 nM) ratio and washed twice with warm HEPES-buffered saline. To study the effect of type of free fatty acid supplementation on TG esterification, cells were subsequently cultured for 96 h in the same media supplemented or not with CLA or LA (0.2 mM) as TG precursors. Lipids were extracted and dissolved in isopropanol. Intracellular TG content was determined using the glycerol determination procedure (Labkit, Chemelex, S.A.). Fatty acid esterification was estimated (Conde-Aguilera *et al.*, 2012) as the difference in TG content of cells cultured in media supplemented with CLA or LA (*de novo* lipogenesis plus esterification) and cells cultured in media without free fatty acids (*de novo* lipogenesis; basal).

Urea synthesis

On day 1, cells were cultured for 24 h in basal medium with high insulin (17.3 nM)/glucagon (0.287 nM) ratio, mimicking postprandial state, washed twice with warm HEPES-buffered saline and cultured in the same medium added with different concentrations of NH_4 (0, 2.5, 5 or 10 mM) for 3 h. As a source of ammonia, NH_4Cl was used. Rates of urea production (μg urea in the media/mg protein per hour) were estimated as the difference in urea concentration in the media between plates with 0 and 2.5, 5 or 10 mM ammonium. Urea was determined by UV/VIS spectrophotometry using an enzymatic procedure in which the urease reaction is coupled to the concurrent amination of α -oxoglutarate and the oxidation of NADH by glutamate. Disappearance of NADH is proportional to urea concentration in the media. The



commercial kit used was Urease-GLDH Kinetic UV (Labkit, Chemelex, S.A.).

Albumin synthesis

Cells were cultured from day 1 for 24 h in bovine serum albumin (BSA) free basal medium with high insulin (17.3 nM)/glucagon (0.287 nM) ratio. Subsequently, flasks were washed twice with warm HEPES-buffered saline and cultured in BSA-free basal medium supplemented either with low insulin (0.173 nM)/glucagon (28.7 nM) or high insulin (17.3 nM)/glucagon (0.287 nM) ratio, mimicking fasting or postprandial state, respectively, and media collected after 24 h. Albumin concentration was measured in the culture media through an ELISA technique using a commercial kit (Pig albumin ELISA quantitation kit; Bethyl, Montgomery, AL, USA) according to the manufacturer protocol.

β -hydroxybutyrate (BHB) synthesis

Cells were cultured from day 1 for 48 h in basal medium with high insulin (17.3 nM)/glucagon (0.287 nM) ratio, mimicking postprandial state, or low insulin (0.173 nM)/glucagon (28.7 nM) ratio, mimicking fasting state. Media was changed every 24 h and collected at 48 h. As ketone production was expected to be low in media from pig hepatocytes, a sensitive micro-method in 96-well plate format (Fernández-Fígares *et al.*, 2004) was used to analyze BHB using a fluorescence microtitre plate reader (Victor X5 2030 Multi-label Reader; Perkin-Elmer, Turku, Finland). Data were expressed as nmol BHB/mg cell protein per 24 h.

IGF-1 synthesis

Cells were cultured in basal medium with high insulin (17.3 nM)/glucagon (0.287 nM) ratio for 48 h and media changed every 24 h following two washes with warm HEPES-buffered saline. After 48 h, media and cells were harvested and frozen at -80°C . Before analysis of IGF-1, media was concentrated 12 \times by means of a rotary evaporator (Speed-Vac SPD131DDA-230; Thermo, Milford, MA, USA). A previously validated (Fernández-Fígares *et al.*, 2007) two-site immunoradiometric assay (cat. no. DSL-5600, Diagnostic Systems Laboratories Inc., Webster, TX, USA) was used to analyze IGF-1. The analytical procedure included an extraction step (acid-ethanol), in which IGF-1 was separated from its binding proteins, for detection of total IGF-1 in culture media. The assay used antibodies against human IGF-1 and human IGF-1 as the standard. The intra and inter-assay CV were 2.5% and 6.7%, respectively.

Protein determination

Protein in cell homogenates was determined by a modified Lowry procedure as described by Conde-Aguilera *et al.* (2012). All data were normalized to protein content.

Statistical analysis

In all, 10 Iberian and 8 Landrace cell preparations from individual pigs constituted an experiment, and treatments within each preparation were replicated in two flasks.

All data from individual flasks were used in the ANOVA and analyzed using a mixed model analysis (SAS Institute 2004, version 9.1.3.). The factors introduced in the model were breed (Iberian or Landrace) for all traits analyzed; in addition, insulin/glucagon ratio was included for albumin and BHB synthesis data; concentration of ammonia in the media (0, 2.5, 5 and 10 mM) was included in the model for urea synthesis. All possible treatment combinations were tested. Results were expressed as least square means \pm s.e.m. of duplicate flasks and the number of individual preparations indicated. Statistical significance was assessed using Bonferroni multiple comparison test to determine differences between treatment groups. The level of significance was set to 5%. In addition, regression analysis was performed of ammonia concentration in the media on urea production using the REG procedure of SAS. Linear and exponential models were used. R^2 was used to evaluate the fit of the models.

Results and discussion

Some considerations were taken into account when designing the present experiment. It was a concern to be able to use piglets of comparable physiological characteristics for both breeds in order to compare their metabolic characteristics at the hepatic level. As there were no available breeders that weaned the piglets of Iberian and Landrace at the same time, it was decided to perform all the isolation from Landrace pigs and continue with Iberian pig isolations, although we would have preferred alternate isolation of hepatocytes of each breed. In addition, the developmental age of the animals of different breed may differ, and a decision must be made whether to use pigs of the same BW or age. The study was made on pigs of 10 to 50 kg BW because developmental age difference at this early state was relatively small. We designed the experiments so that aspects of glucose (GNG and glycogen degradation), protein (albumin synthesis and urea production) and fat (fatty acid esterification and BHB production) metabolism as well as hormone secretion (IGF-1) were evaluated. L-carnitine was routinely added to all culture media to ensure that fatty acid entry into mitochondria was not limited by carnitine availability and all fatty acids were complexed to albumin at concentrations that simulated physiological conditions (Stangl *et al.*, 1999).

GNG and glycogen degradation

It was previously shown that differences related to genotype for glycemia and plasma insulin levels existed when Iberian and Landrace pigs were compared (Fernández-Fígares *et al.*, 2007). In the present study, incubating hepatocytes with glucagon (28.7 nM) for 24 h virtually depleted glycogen stores (data not shown). Although some glycogenolysis cannot be discarded, because of depletion of glycogen stores after pre-culture with glucagon (28.7 nM) for 24 h, media glucose was a consequence, essentially of GNG. We designed our experiment using a low insulin/glucagon ratio to detect differences between breeds in conditions that stimulate GNG. Hepatocytes from Iberian had greater glucose production from



González-Valero, Rodríguez-López, Lachica and Fernández-Figares

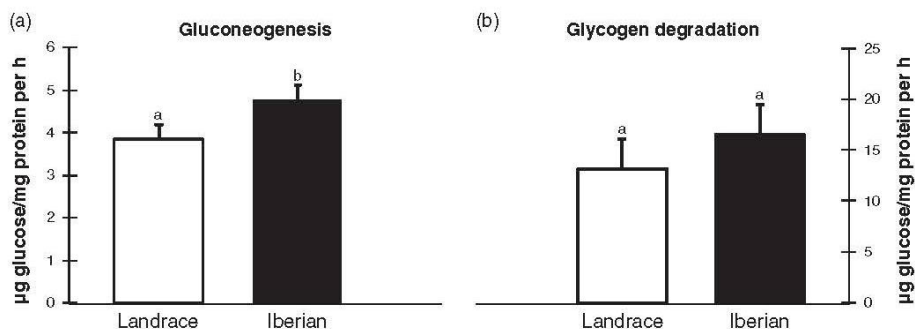


Figure 1 Effect of breed (Landrace or Iberian) on gluconeogenesis (a) and glycogen degradation (b) in porcine hepatocytes. For gluconeogenesis, cells depleted of glycogen were cultured in the presence of amino acids, lactate and pyruvate and a low insulin (0.173 nM)/glucagon (28.7 nM) ratio for 2 h and glucose measured in the media. For glycogen degradation, hepatocytes loaded with glycogen were cultured for 3 h in glucose-free media supplemented with glucagon (2.87 nM) and cells harvested for glycogen determination. Data are least square means and s.e.m. for duplicate cultures from 8 (Landrace) or 10 (Iberian) pigs. Means with different letters differ ($P < 0.05$).

gluconeogenic precursors (24%, $P < 0.05$; Figure 1a) than from Landrace pigs although no difference in glycogen degradation between breeds was found ($P > 0.10$; Figure 1b). In line with our results, greater potential for GNG in Ossabaw compared with Yorkshire pigs has been reported (Kasser *et al.*, 1981). As in the transition from fasted to fed liver glycogen deposition is predominantly a gluconeogenic process in rats (Katz *et al.*, 1986), we could speculate that hepatocytes from Iberian pigs would have greater glycogen synthesis as a result of their increased gluconeogenic capacity compared with Landrace. Unfortunately, we did not measure glycogen synthetic capacity in our experiments. *In vivo*, however, Iberian had lower fasting serum glucose and greater insulin concentration than Landrace growing gilts (Fernández-Figares *et al.*, 2007). Similarly, serum glucose concentrations were generally lower in obese compared with lean pigs (Pond *et al.*, 1980). It has been suggested that seasonal variations in food availability, and therefore nutrient intake, may be related to the development of obesity in native pig breeds (McCusker *et al.*, 1985). Iberian pigs have a high potential for fat accumulation (Nieto *et al.*, 2012) and the ability to store excess fat during feed abundance enables the Iberian pigs survival during periods of scarcity. Low fasting glycemia of Iberian pigs compared with Landrace (Fernández-Figares *et al.*, 2007) could be related to an increased basal and insulin-stimulated glucose transport early in the development of obesity, a common pattern in many animal models of obesity.

TG content and fatty acids esterification

Although pig liver is a minor site of lipogenesis in mature pigs (Gondret *et al.*, 2001), its importance is greater than in adipose tissue in pre-weaned piglets (Fenton *et al.*, 1985). Nonetheless, little attention has been paid to the study of liver lipogenesis in young pigs. In our study, difference in TG content of basal flasks was due essentially to lipogenesis from glucose or gluconeogenic substrates as they had no added free fatty acid in the media. On the other hand, flasks supplemented with free fatty acids, CLA or LA, derive their TG content both from *de novo* lipogenesis and esterification. This way, we estimated esterification by difference assuming that there was no effect of the presence of free fatty acids on

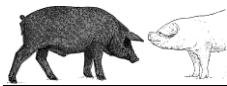
de novo lipogenesis, as the design did not allow to study the effect of each fatty acid on *de novo* lipogenesis. Hepatocytes from Iberian had lower rate of fatty acid esterification (31%, $P = 0.058$; Figure 2b) than hepatocytes from Landrace pigs, and consequently, they tended to have lower TG content (12%, $P = 0.053$; Figure 2a). Addition of fatty acids, CLA or LA to the culture medium increased TG content compared with control (74% for CLA and 55% for LA, $P < 0.001$; Figure 2a). Similarly, the rate of palmitate esterification *in vitro* was much greater than glucose carbon incorporation into total lipids in pigs (Go *et al.*, 2012). It has been reported that CLA decreased fatty acid availability for TG synthesis in rat hepatocytes (Priore *et al.*, 2007) and tended to depress hepatic lipid synthesis from glucose in pigs (Go *et al.*, 2012). According to this, CLA-induced decrease of *de novo* lipogenesis in pigs, not directly measured in our assays, would imply that CLA esterification into TG was underestimated compared with LA in our experiment.

Serum TG content of Iberian and Landrace growing gilts was similar (Fernández-Figares *et al.*, 2007) although a breed \times protein level interaction was found. Furthermore, Pond *et al.* (1980) found lower serum glucose and TG in obese than in lean pigs, which is in line with the present experiment.

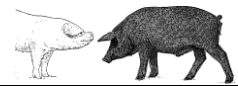
CLA had no effect on hepatocyte TG synthesis in porcine hepatocytes (Conde-Aguilera *et al.*, 2012), although the level of dexamethasone was 10 \times compared with the present experiment and may have masked the stimulatory effect of CLA on TG esterification reported herein. *In vivo*, serum TG of young pigs fed diets supplemented with CLA was increased compared with controls with no difference in liver TG content or histology (Fernández-Figares *et al.*, 2012).

BHB synthesis

No difference in BHB synthesis was found when hepatocytes from Iberian and Landrace pigs were compared ($P > 0.10$; Figure 3a). Nevertheless, glucagon stimulated BHB synthesis (47%, $P < 0.05$; Figure 3a) relative to insulin. No significant interaction was found. As expected, BHB production was low as it is known that ketogenic capacity of liver from newborn



Metabolic differences in hepatocytes of obese and lean pigs



Hepatic metabolism in obese and lean pigs

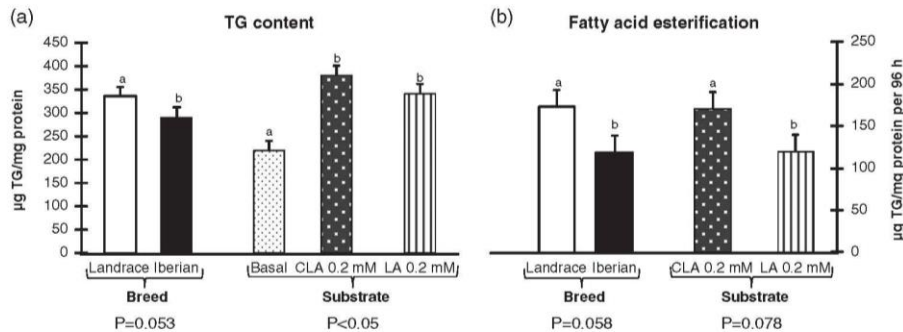


Figure 2 Influence of breed (Landrace or Iberian) and substrate (basal, CLA or linoleic acid (LA)) on triglyceride content (a) and fatty acid estimated esterification (b) in porcine hepatocytes. Hepatocytes were cultured for 96 h in a medium with high insulin (17.3 nM)/glucagon (0.287 nM) ratio supplemented or not (basal) with CLA (0.2 mM) or LA (0.2 mM). Data are least square means and s.e.m. for duplicate cultures from 8 (Landrace) or 10 (Iberian) pigs. Means with different letters differ ($0.1 < P < 0.05$).

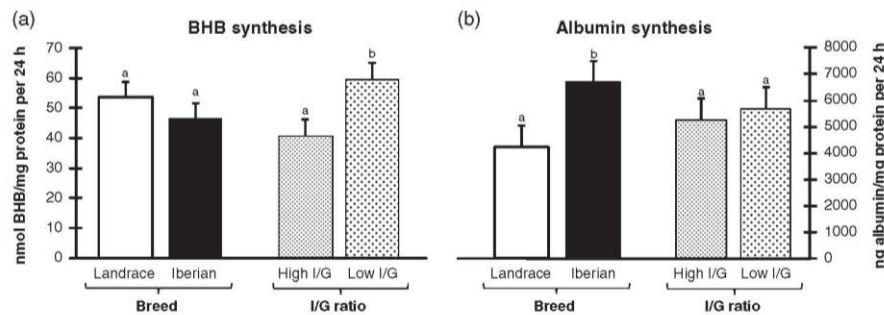


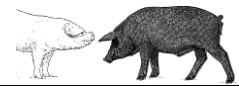
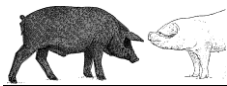
Figure 3 Influence of breed (Landrace or Iberian) and insulin/glucagon (I/G) ratio on β -hydroxybutyrate (BHB; nmol/mg protein per 24 h; a) and albumin ($\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$ protein per 24 h; b) synthesis. For BHB synthesis, cells were cultured for 48 h in a medium with high insulin (17.3 nM)/glucagon (0.287 nM) or low insulin (0.173 nM)/glucagon (28.7 nM) ratio and media collected at the end. For albumin synthesis, hepatocytes were cultured for 24 h in a medium with high I/G ratio, shifted to a bovine serum albumin- free medium with high or low I/G ratio and media collected. No significant interactions were found between factors. Data are least square means and s.e.m. for duplicate cultures from 8 (Landrace) or 10 (Iberian) pigs. Means with different letters differ ($P < 0.05$).

pigs is much lower than in other mammalian species (Duée *et al.*, 1994) and low ketone production persists in the adult pig (Duée *et al.*, 1994). BHB levels in the present study were in the lower range to previously reported values for hepatocytes isolated from 60 kg pigs (Fernández-Figares *et al.*, 2004).

The low rate of β -oxidation capacity has been ascribed to a propensity for fatty acid esterification *v.* oxidation in piglets (Pégorier *et al.*, 1983). As ketone bodies are the result of partial free fatty acid oxidation, no differences in fatty acid oxidation would be expected between pig breeds at the hepatic level. *In vivo*, early studies with starved miniature pigs (Müller *et al.*, 1982) suggested that mild ketosis encountered was modulated by insulin and glucagon. Indeed, similarly to the present experiment, where glucagon stimulated and insulin inhibited BHB production, it has been reported that ketone bodies synthesis in hepatocytes from 60 kg BW pigs are sensitive to long-term regulation by insulin, glucagon and dexamethasone (Fernández-Figares *et al.*, 2004), while short-term glucagon addition has been shown to have no effect on ketogenesis in pig hepatocytes (Pégorier *et al.*, 1982).

IGF-1 synthesis

Nutritional and hormonal factors determine animal growth and growth hormone (GH), by its stimulatory effects on IGF-1 production, is one of the major regulators of growth (Brameld, 1997). As IGF-1 increases protein synthesis (Tomas *et al.*, 1992), part of the reason for the increased growth rate and efficiency in pigs may be because of differences in circulating levels of IGF-1. Serum concentrations of IGF-1 are positively correlated with growth rate in pigs (Buonomo *et al.*, 1987), although some workers found no difference when comparing pig breeds with different growth and body composition characteristics (Louveau *et al.*, 1991). In the present study, synthesis of IGF-1 was decreased (16%) in hepatocytes of Iberian compared with Landrace (647 and 771 pg/mg protein as average, respectively; $P < 0.05$). Previous studies with growing Iberian pigs demonstrated their low genetic potential for growth and lean tissue deposition (Nieto *et al.*, 2012) compared with conventional breeds, which is in line with the lower hepatic IGF-1 synthesis in the present study. Although higher fasting serum level of IGF-1 with no difference in serum GH were encountered in Iberian compared with Landrace gilts, a single blood sampling was made (Fernández-Figares *et al.*, 2007).



González-Valero, Rodríguez-López, Lachica and Fernández-Figares

When Meishan and Large White intact boars were compared, blood IGF-1 concentrations were lower in the former (Weiler *et al.*, 1998). Nevertheless, others found no differences in plasma IGF-1 level (Louveau *et al.*, 1991) when pigs with different growth potential were compared. Although the liver is a primary source of circulating IGF-1, extrapolation of *in vitro* to *in vivo* conditions should be made with great care, as elements such as other hormones, receptors or binding proteins (IGFBP) regulate its activity. Furthermore, while IGF-1 has a central role mediating GH biological actions, there exist GH-independent actions for IGF-1 and IGF-1-independent actions for GH (Butler and Le Roith, 2001). GH and amino acid supply are synergistic stimuli of IGF-1 secretion (Wheelhouse *et al.*, 1999). Compared with Landrace, Iberian pigs have lower protein requirements (Nieto *et al.*, 2012) and capacity of GH release (Rodríguez-López *et al.*, 2013) implying less IGF-1 release stimuli *in vivo*.

It has been reported that leptin can inhibit IGF-1 expression and secretion (Ajuwon *et al.*, 2003) while IGF-1 inhibits leptin receptor expression (Ramsay *et al.*, 2010). This would agree with the higher serum leptin levels (Fernández-Figares *et al.*, 2007) and lower IGF-1 synthesis in the present study in Iberian compared with Landrace pigs.

IGF-1 decreased expression and activity of gluconeogenic enzymes pyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase (Wang *et al.*, 2012) in calf hepatocytes, which would agree with the increased GNG in hepatocytes of Iberian (with lower IGF-1 synthesis) compared with Landrace pigs in our experiments.

Albumin synthesis

Albumin is synthesized in liver and represents from 12% to 18% of the total protein synthesized by the liver in rat hepatocytes (Peavy *et al.*, 1978). Increased albumin synthesis was found in Iberian compared with Landrace hepatocytes (58%, $P < 0.05$; Figure 3b). Furthermore, no effect of insulin/glucagon ratio ($P > 0.10$; Figure 3b) was found on albumin synthesis, independent of breed. *In vivo* liver fractional synthesis rate was similar in Iberian and Landrace pigs fed diets with different protein content (Rivera-Ferre *et al.*, 2005).

As synthesis of proteins for export and constitutive proteins constitute liver protein synthesis, it is possible that the former was affected by genetic background (present study) while total liver protein synthesis was not. Furthermore, there seems to be a compartmentalization where proteins for export are synthesized on the rough endoplasmic reticulum while constitutive proteins are synthesized on polysomes within the cell cytosol (Connell *et al.*, 1997). However, insulin was not involved in the stimulation of protein synthesis in the liver of neonatal pigs (Davis *et al.*, 2001). Furthermore, no difference in albumin synthesis was found in humans with increased plasma insulin (Ballmer *et al.*, 1995) compared with controls.

Urea synthesis

Blood ammonia derives from tissue catabolism and intestine lumen (Huizenga *et al.*, 1996). Most portal ammonia is removed from the blood by the liver through urea synthesis preventing hyperammonemia, which would disrupt the central nervous system. Urea concentration in the media ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) and urea synthetic capacity ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein per hour) was decreased in hepatocytes from Iberian compared with Landrace pigs (32% and 37%, respectively, $P < 0.05$; Figure 4a and b). Also, hepatocytes were sensitive to increasing amount of ammonia (0 to 10 mM) in the media, which induced augmented urea concentration (6.5, 11 and $28 \times$ relative to 0 for 2.5, 5 and 10 mM ammonia, respectively, $P < 0.0001$; Figure 4a) and synthesis (55% and 325% for 5 and 10 mM compared with 2.5 mM ammonia, respectively, $P < 0.0001$; Figure 4b). In the absence of added ammonia, urea synthesis is due to ammonia production from amino acid catabolism. In the present experiment, the basal media contained a total of 8 mM free amino acids and hepatocytes synthesized on average 1.3 μmol urea/mg protein per hour. When ammonia addition was regressed v. urea concentration in the media of Iberian hepatocytes, the following linear model was established: urea concentration ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) = $28.08 + 37.87 \times$ ammonia concentration (mM) models coefficient of correlation was significant ($r = 0.702$). A better alternative was the exponential model (urea concentration ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) = $e^{(3.251 + 0.328 \times \text{ammonia concentration (mM)})}$), where $r = 0.826$.

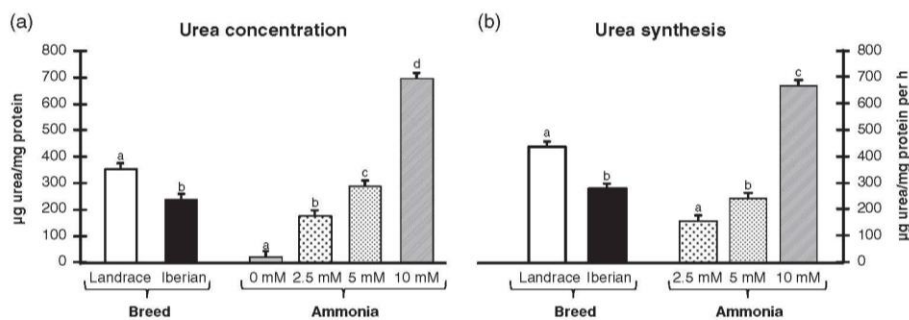
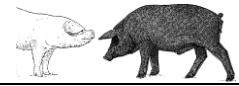
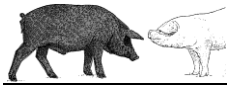


Figure 4 Influence of breed (Landrace or Iberian) and media ammonia concentration (0, 2.5, 5 and 10 mM) on media urea concentration (a) and estimated urea synthesis (b) after 3 h of cultivation. Hepatocytes were cultured for 24 h in medium with high insulin (17.3 nM)/glucagon (0.287 nM) ratio and shifted the same medium with different concentrations of ammonia for 3 h. No significant interactions were found between factors. Data are least square means and s.e.m. for duplicate cultures from 8 (Landrace) or 10 (Iberian) pigs. Means with different letters differ ($P < 0.05$).



Hepatic metabolism in obese and lean pigs

Similarly, for Landrace both the linear (urea concentration ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) = $54.59 + 50.64 \times$ ammonia concentration (mM)) and exponential (urea concentration ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) = $e^{(3.728 + 0.316 \times \text{ammonia concentration (mM)})}$) models coefficient of correlation were significant ($r = 0.777$ and 0.814 , respectively).

GNG from amino acids results in ammonia production, which adds extra ammonia load for the liver to detoxify. In that sense, a greater gluconeogenic capacity of hepatocytes in Iberian (present work) compared with Landrace pigs would imply a greater ammonia load for the liver to detoxify in conditions that favor GNG (e.g. fasting).

In vivo, blood urea N concentration can be inversely related to the efficiency of N utilization (Coma *et al.*, 1995) and is associated with dietary protein intake (Yang *et al.*, 2000). No difference in serum urea was found when Iberian and Landrace gilts fed isonitrogenous diets were compared, although serum urea was diminished when the animals were fed with lower CP diets (Fernández-Figares *et al.*, 2007). In contrast, pigs selected for lean growth efficiency (Fabian *et al.*, 2003) had lower serum urea N concentration compared with control pigs as a consequence of decreased use of amino acids for energy, owing to their greater protein requirement. However, arterial urea concentrations are influenced by several factors such as renal function, fluctuations in the amount of total body water and hydration state. Although it is considered that the liver capacity for urea synthesis exceeds necessities of ammonia detoxification in most physiological situations, it is conceivable that for a very short time early during a meal, pigs may synthesize urea near the potential maximum velocity (Carey *et al.*, 1993), especially in Iberian pigs with lower capacity of urea production.

The present study provides differences in hepatic metabolism between pig genotypes that highlight the importance of considering genetic background when *in vitro* studies are performed.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr L. Lara for statistical advice and Dr T. J. Caperna for critically reading the manuscript. This work was supported by grants AGL2006-5937 from the Ministry of Science and Innovation and AGL2009-08916 from the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain. The assays described are part of the PhD thesis of Lucrecia González-Valero, Official Doctorate Program of Nutrition and Food Sciences of the University of Granada.

References

Ajuwon KM, Kuske JL, Anderson DB, Hancock DL, Houseknecht KL, Adeola O and Spurlock ME 2003. Chronic leptin administration increases serum NEFA in the pig and differentially regulates PPAR expression in adipose tissue. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 14, 576–583.

Ballmer PE, McNurlan MA, Essen P, Anderson SE and Garlick PJ 1995. Albumin synthesis rates measured with [^3H]-ringlabeled phenylalanine are not responsive to short-term intravenous nutrients in healthy humans. *The Journal of Nutrition* 125, 512–519.

Brameld JM 1997. Molecular mechanisms involved in the nutritional and hormonal regulation of growth in pigs. *Proceedings of the Nutrition Society* 56, 607–619.

Buonomo FC, Lauterio TL, Baile CA and Campion DR 1987. Determination of insulin-like growth factor 1 (IGF1) and IGF binding protein levels in swine. *Domestic Animal Endocrinology* 4, 23–31.

Butler AA and Le Roith D 2001. Control of growth by the somatotropic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles 1. *Annual Review of Physiology* 63, 141–164.

Carey GB, Cheung CW, Cohen NS, Brusilow S and Rajjman L 1993. Regulation of urea and citrulline synthesis under physiological conditions. *The Biochemical Journal* 292, 241–247.

Coma J, Zimmerman DR and Carrion D 1995. Relationship of rate of lean tissue growth and other factors to concentration of urea in plasma of pigs. *Journal of Animal Science* 73, 3649–3656.

Conde-Aguilera JA, Lachica M, Nieto R and Fernández-Figares I 2012. Metabolic regulation of fatty acid esterification and effects of CLA on glucose homeostasis in pig hepatocytes. *Animal* 6, 254–261.

Connell A, Calder AG, Anderson SE and Lobley GE 1997. Hepatic protein synthesis in the sheep: effect of intake as monitored by use of stable-isotope-labelled glycine, leucine and phenylalanine. *The British Journal of Nutrition* 77, 255–271.

Davis TA, Fiorotto ML, Beckett PR, Burrin DG, Reeds PJ, Wray-Cahen D and Nguyen HV 2001. Differential effects of insulin on peripheral and visceral tissue protein synthesis in neonatal pigs. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 280, E770–E779.

Duée PH, Pégorier JP, Quant PA, Herbin C, Kohl C and Girard J 1994. Hepatic ketogenesis in newborn pigs is limited by low mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase activity. *The Biochemical Journal* 298, 207–212.

Fabian J, Chiba LI, Kuhlers DL, Frobish LT, Nadarajah K and McElhenney WH 2003. Growth performance, dry matter and nitrogen digestibilities, serum profile, and carcass and meat quality of pigs with distinct genotypes. *Journal of Animal Science* 81, 1142–1149.

Fenton JP, Roehrig KL, Mahan DC and Corley JR 1985. Effect of swine weaning age on body fat and lipogenic activity in liver and adipose tissue. *Journal of Animal Science* 60, 190–199.

Fernández-Figares I, Shannon AE, Wray-Cahen D and Caperna TJ 2004. The role of insulin, glucagon, dexamethasone and leptin in the regulation of ketogenesis and glycogen storage in primary cultures of porcine hepatocytes prepared from growing pigs. *Domestic Animal Endocrinology* 27, 125–140.

Fernández-Figares I, Lachica M, Nieto R, Rivera-Ferre MG and Aguilera J 2007. Serum profile of metabolites and hormones in obese (Iberian) and lean (Landrace) growing gilts fed balanced or lysine deficient diets. *Livestock Science* 110, 73–81.

Fernández-Figares I, Lachica M, Martín A, Nieto R, González-Valero L, Rodríguez-López JM and Aguilera JF 2012. Impact of dietary betaine and CLA on insulin sensitivity, protein and fat metabolism of obese pigs. *Animal* 6, 1058–1067.

Go G, Wu G, Silvey DT, Choi S, Li X and Smith SB 2012. Lipid metabolism in pigs fed supplemental conjugated linoleic acid and/or dietary arginine. *Amino Acids* 43, 1713–1726.

Gondret F, Ferré P and Dugail I 2001. ADD-1/SREBP-1 is a major determinant of tissue differential lipogenic capacity in mammalian and avian species. *Journal of Lipid Research* 42, 106–113.

Huizenga JR, Glips CH and Tangerman A 1996. The contribution of various organs to ammonia formation: a review of factors determining the arterial concentration. *Annals of Clinical Biochemistry* 33, 23–30.

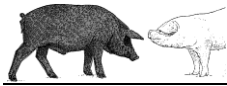
Kasser TR, Martin RJ, Gahagan JH and Wangsness PJ 1981. Fasting plasma hormones and metabolites in feral and domestic newborn pigs. *Journal of Animal Science* 53, 420–426.

Katz J, Kuwajima M, Foster DW and McGarry JD 1986. The glucose paradox: new perspectives on hepatic carbohydrate metabolism. *Trends in Biochemical Sciences* 11, 136–140.

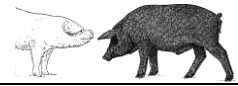
Louveau I, Bonneau M and Salter DN 1991. Age-related changes in plasma porcine growth hormone (GH) profiles and insulin-like growth factor-I (IGF-I) concentrations in Large White and Meishan pigs. *Reproduction Nutrition Development* 31, 205–216.

McCusker RH, Wangsness PJ, Griel LC Jr and Kavanaugh JF 1985. Effects of feeding, fasting and refeeding on growth hormone and insulin in obese pigs. *Physiology and Behavior* 35, 383–388.

Müller MJ, Paschen U and Seitz HJ 1982. Starvation-induced ketone body production in the conscious unrestrained miniature pig. *Journal of Nutrition* 112, 1379–1386.



Metabolic differences in hepatocytes of obese and lean pigs



González-Valero, Rodríguez-López, Lachica and Fernández-Fígares

Nieto R, Lara L, Barea R, García-Valverde R, Aguinaga MA, Conde-Aguilera JA and Aguilera JF 2012. Response analysis of the Iberian pig growing from birth to 150 kg body weight to changes in protein and energy supply. *Journal of Animal Science* 90, 3809–3820.

Peavy DE, Taylor JM and Jefferson LS 1978. Correlation of albumin production rates and albumin mRNA levels in livers of normal, diabetic, and insulin-treated diabetic rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75, 5879–5883.

Pégorier JP, Duée PH, Girard J and Peret J 1982. Development of gluconeogenesis in isolated hepatocytes from fasting or suckling newborn pigs. *The Journal of Nutrition* 112, 1038–1046.

Pégorier JP, Duée PH, Girard J and Peret J 1983. Metabolic fate of non-esterified fatty acids in isolated hepatocytes from newborn and young pigs. Evidence for a limited capacity for oxidation and increased capacity for esterification. *The Biochemical Journal* 212, 93–97.

Pond WG, Yen JT, Lindvall RN and Hill D 1980. Dietary alfalfa meal for genetically-obese and lean growing-pigs: effect on body-weight gain and on carcass and gastrointestinal-tract measurements and blood metabolites. *Journal of Animal Science* 51, 367–373.

Priore P, Giudetti AM, Natali F, Gnoni GV and Geelen MJH 2007. Metabolism and short-term metabolic effects of conjugated linoleic acids in rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1771 (10), 1299–1307.

Ramsay TG, Richards MP, Li CJ and Caperna TJ 2010. IGF-I mediated inhibition of leptin receptor expression in porcine hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 155, 43–48.

Rivera-Ferre MG, Aguilera JF and Nieto R 2005. Muscle fractional protein synthesis is greater in Iberian than in Landrace growing pigs fed adequate or lysine-deficient diets. *The Journal of Nutrition* 135, 469–478.

Rodríguez-López JM, González-Valero L, Lachica M and Fernández-Fígares I 2013. Growth hormone releasing factor and secretion of growth hormone in Iberian and Landrace gilts. In *Energy and protein metabolism and nutrition in sustainable animal production* (ed. JW Oltjen, E Kebreab and H Lapiere), pp. 293–294. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

Stangl GI, Müller H and Kirchgessner M 1999. Conjugated linoleic acid effects on circulating hormones, metabolites and lipoproteins, and its proportion in fasting serum and erythrocyte membranes of swine. *European Journal of Nutrition* 38, 271–277.

Tomas FM, Knowles SE, Owens PC, Chandler CS, Francis GL, Read LC and Ballard FJ 1992. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and especially IGF-I variants are anabolic in dexamethasone-treated rats. *The Biochemical Journal* 282, 91–97.

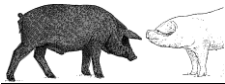
Wang J, Zhu X, Chen C, Li X, Gao Y, Li P, Zhang Y, Long M, Wang Z and Liu G 2012. Effect of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) on the gluconeogenesis in calf hepatocytes cultured in vitro. *Molecular and Cellular Biochemistry* 362, 87–91.

Weiler U, Claus R, Schnoebelen-Combes S and Louveau I 1998. Influence of age and genotype on endocrine parameters and growth performance: a comparative study in wild boars, Meishan and Large White boars. *Livestock Production Science* 54, 21–31.

Wheelhouse NM, Stubbs AK, Lomax MA, MacRae JC and Hazlerigg DG 1999. Growth hormone and amino acid supply interact synergistically to control insulin-like growth factor-I production and gene expression in cultured ovine hepatocytes. *The Journal of Endocrinology* 163, 353–361.

Yang H, Pettigrew JE, Johnston LJ, Shurson GC, Wheaton JE, White ME, Koketsu Y, Sower AF and Rathmacher JA 2000. Effects of dietary lysine intake during lactation on blood metabolites, hormones, and reproductive performance in primiparous sows. *Journal of Animal Science* 78, 1001–1009.

CAPÍTULO 5
DISCUSIÓN GENERAL

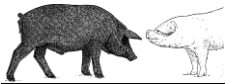


Esta Tesis Doctoral se enmarca en un amplio programa experimental, iniciado hace varios años por el grupo de investigación cuyo objetivo general es mejorar los conocimientos en el área de la nutrición animal, particularmente en los campos del metabolismo de nutrientes y energía del cerdo Ibérico. Los esfuerzos se dirigen a caracterizar fisiológica y metabólicamente al cerdo Ibérico comparándolo con la raza Landrace como ejemplo de una raza mejorada, con el objetivo final de explicar las diferencias en necesidades nutritivas, energéticas y en caracteres productivos entre ambas razas. Estos conocimientos contribuirán no sólo a su nutrición equilibrada sino que además constituirán el soporte para realizar estrategias nutricionales dirigidas a mejorar caracteres productivos en el cerdo Ibérico.

5.1. DIFERENCIAS EN LA APARICIÓN PORTAL DE LISINA Y METIONINA EN IBÉRICO Y LANDRACE

Para determinar si existe un uso preferencial de lisina y/o metionina por las VDP que ayude a explicar la menor capacidad de crecimiento de Ibérico frente a Landrace se estimó la capacidad de absorción y utilización de estos aminoácidos por las VDP en ambas razas alimentadas con dos dietas con niveles de proteína (14,5 vs. 18,76%, MS) óptimos respectivamente para cubrir las necesidades de cada raza.

La ingestión de alimento elevó la concentración arterial y portal de ambos aminoácidos y su ANP postprandial (resultado de multiplicar la diferencia de concentración plasmática de los aminoácidos en porta y arteria por el flujo

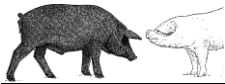


plasmático). Tanto el incremento de las concentraciones arteriales y portales de ambos aminoácidos como su posterior descenso fueron similares a los obtenidos por otros autores (Lenis y col., 1996; Yen y col., 2004a).

Aunque los valores de concentración arterial y portal de lisina al igual que la diferencia entre ambos valores en Ibérico fueron superiores a los de Landrace, este último parámetro se vio compensado con un menor FSP en Ibérico obteniéndose valores de FNP de lisina similares en ambas razas. Tampoco se observaron diferencias ni en la concentración arterial o portal ni en el FNP de metionina al comparar ambas razas. Aunque se observó una tendencia ($P=0,056$) a una mayor concentración de metionina en vena porta en cerdos Ibéricos frente a Landrace, el comportamiento de ambas razas fue diferente según la dieta (interacción raza x nivel de proteína, $P=0,04$). Con la dieta HCP (187 g PB/kg MS), excedentaria en aminoácidos para Ibéricos, la concentración portal de metionina en Ibérico fue superior en comparación con Landrace mientras que con la dieta LCP (145 g PB/kg MS), óptima en aminoácidos para Ibéricos, resultó inferior en comparación con Landrace.

Aunque no hemos encontrado en la literatura estudios que comparen la capacidad de absorción de aminoácidos por las VDP de diferentes razas, los valores obtenidos de FNP para lisina y metionina estuvieron dentro del rango de valores publicados por otros autores al emplear cerdos Large White alimentados con caseína o proteínas de colza (Simoes Nunes y col., 1991), machos cruzados castrados alimentados con dietas de caseína suplementados o no con fibra (Lenis y col., 1996), o lechones cruzados alimentados con proteínas lácteas (Stoll y col., 1998).

El menor FSP medido tras la ingestión de la dieta en la raza Ibérica en comparación a la raza Landrace fue inesperado. Nuestra hipótesis inicial era obtener un mayor FSP en la raza Ibérica, en comparación con las razas de genotipo más magro, debido al mayor peso de las vísceras de Ibérico en relación al total (Rivera-Ferre y col., 2005; Aguinaga y col., 2010), aunque en cerdos de mayor tamaño (50 y 115 kg PV), las diferencias en el tamaño relativo de los órganos no fueron tan evidentes (Barea y col., 2011). Este resultado podría estar relacionado con las



DISCUSIÓN GENERAL

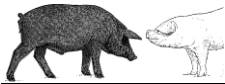


menores necesidades energéticas del cerdo Ibérico respecto al Landrace (Nieto y col., 2002). Los valores de FSP obtenidos en este trabajo son similares a los obtenidos en cerdos de 35-55 kg PV por otros autores (Yen y col., 1989, 2004b; Lenis y col., 1996; Rodríguez-López y col., 2010a,b).

El FSP, las concentraciones de metionina y lisina arterial y portal fueron significativamente superiores tras la ingestión de la dieta alta en proteína (HCP) en comparación con la dieta baja en proteína (LCP). La interacción Raza x Nivel de proteína fue significativa en el caso de concentración de metionina portal. Así, la mayor concentración de metionina portal en dieta HCP ocurrió sólo en el caso de cerdos Ibéricos, donde la dieta HCP es excudentaria en proteína, mientras que para los cerdos Landrace, no hubo diferencias cuando fueron alimentados con dieta HCP, adecuada, o LCP, deficitaria en proteína para esta raza.

El mayor FSP obtenido con la dieta HCP podría ser la respuesta del sistema circulatorio a la mayor actividad gastrointestinal que acompaña al proceso de digestión y absorción de una cantidad de proteína superior. Además, en la digestión de una dieta con un contenido proteico más elevado se produce una mayor secreción y reabsorción de AAE endógenos (Yen y col., 2004a).

Al comparar la ANP de lisina y metionina de la dieta LCP con la HCP se observó que tendía a ser superior ($P=0,076$) para la metionina y fue significativamente más alta para la lisina con esta última dieta. Simoes Nunes y col. (1991) observaron un mayor FNP de todos los aminoácidos, salvo metionina, cuando los cerdos fueron alimentados con una dieta con alto contenido en caseína (24%) frente a otra con un contenido menor (12%). Un mayor FNP de lisina obtenido con la dieta HCP podría estar relacionado con un aumento de la reabsorción de lisina endógena debida a una mayor secreción de proteína endógena. Una alta proporción de la proteína endógena secretada es digerida junto a la proteína de la dieta y absorbida antes del íleon terminal (Nyachoti y col., 1997). Se ha observado que la proteína endógena secretada aumenta sustancialmente al elevarse el contenido proteico de la dieta (Nyachoti y col., 1997) y que ésta contiene elevadas concentraciones de lisina (Boisen y Moughan, 1996). Chen y col. (2009) estimaron



DISCUSIÓN GENERAL

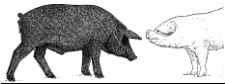


que el 18% de la lisina metabolizada por las VDP es recuperada para la síntesis de proteína de la mucosa intestinal.

Sin embargo, van Goudoever y col. (2000) al comparar dietas con alto y bajo contenido proteico (23% y 9%, respectivamente) observaron que la cantidad de lisina reciclada derivada de la proteólisis o reabsorción de proteína endógena previamente sintetizada y secretada era superior en la dieta con bajo contenido proteico. Además, el nivel total de lisina utilizado por las VDP de los cerdos no se vio afectado por el nivel de ingesta proteica por lo que el FNP fue mayor con la dieta más alta en proteína, sugiriendo que existe una alta demanda obligatoria de lisina por las VDP para el mantenimiento de su integridad y funciones (digestión y absorción de la dieta, producción de mucinas e inmunoglobulinas). La consecuencia es que ante una situación de restricción proteica el uso de algunos AAE por las VDP para el crecimiento y el metabolismo visceral se mantendría a expensas de una pérdida de proteína por parte de los tejidos periféricos (Seve y col., 1985; Ebner y col., 1994). van Goudoever y col. (2000) estudiaron la influencia del nivel de ingesta proteica sobre el origen de la fuente de lisina utilizada por las VDP. Con la dieta HCP la lisina utilizada por las VDP provenía exclusivamente de sangre arterial mientras que tras la ingesta de la dieta LCP suministrada durante un tiempo prolongado, la fuente de lisina pasaba a ser una combinación de la de sangre arterial junto con la de la dieta, sin diferencias significativas en el nivel de lisina total utilizada por las VDP.

En nuestro estudio, cuando se suministró un déficit de proteína en la dieta, caso de los cerdos Landrace alimentados con dieta LCP, sí se produjo un descenso de la concentración de lisina en porta respecto al uso de una dieta adecuada en proteína Sin embargo no se encontraron diferencias en la concentración de metionina en porta respecto al uso de la dieta HCP (óptima).

Una de las funciones de la microbiota entérica es la de suministrar al hospedador nutrientes esenciales como es el caso de ciertas vitaminas (K, B12, biotina, ácido fólico y pantoténico) y aminoácidos tras metabolizar los sustratos o residuos dietéticos no digeribles, secreciones endógenas y descamaciones celulares (Guarner, 2007). Torrallardona y col. (2003) observaron que la síntesis *de novo* de



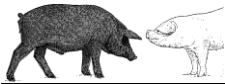
DISCUSIÓN GENERAL



ciertos aminoácidos por la microbiota intestinal representaba una importante contribución neta a la cantidad total de aminoácidos que aparecían en porta. Aguinaga y col. (2010) mediante un ensayo con ^{15}N estimaron la incorporación de lisina procedente de la síntesis microbiana intestinal a los tejidos de lechones Ibéricos y de una raza mejorada durante el periodo de post-destete. Los resultados mostraron que la incorporación de lisina marcada fue superior en los cerdos mejorados (LandracexLarge White), basándose en un enriquecimiento sustancialmente mayor del hígado en los lechones LandracexLarge White que en los Ibéricos, resultado que contradecía su hipótesis inicial, llegando a la conclusión de que el déficit proteico de la dieta acentuó la absorción de lisina de origen microbiano en los lechones de raza convencional, ya que sus necesidades proteicas son mayores. Hecho que podría extrapolarse al caso de la metionina, e incluso podría ser superior a la absorción de lisina de origen microbiano, explicando en parte la ausencia de diferencias en las concentraciones portales de metionina cuando se suministró una dieta deficitaria en proteína respecto a la dieta con un contenido proteico óptimo para cerdos Landrace.

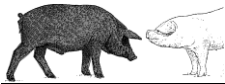
Además Riedijk y col. (2007) hallaron que el tracto gastrointestinal de los lechones consumía aproximadamente el 20% de la metionina de la dieta y que ésta era mayoritariamente transmetilada a homocisteína y mediante transulfuración convertida en cisteína con una dieta que proporcionaba un aporte suficiente de aminoácidos. Sin embargo, en condiciones de déficit de aminoácidos azufrados, el metabolismo de la metionina se regula de manera que la prioridad es conservar la síntesis de proteína respecto a la transmetilación de tal manera que el *pool* de metionina es preservado mediante el aumento de la remetilación de homocisteína y la supresión de la transulfuración (Bauchart-Theveret y col., 2009). Según estos autores el destino metabólico de la metionina está regulado por la cantidad de aminoácidos azufrados presentes en la dieta.

En conclusión, no existen diferencias en la capacidad de absorción y utilización de lisina y metionina por las VDP ligadas al genotipo, aunque sí se observó que estaban influenciadas por el nivel de proteína de la dieta, incrementándose el flujo neto de lisina y en menor grado, el de metionina al consumir una dieta con mayor contenido de proteína.

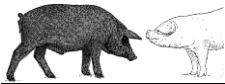


5.2. CONTRIBUCIÓN A LA PRODUCCIÓN DE CALOR TOTAL DE LAS VÍSCERAS QUE DRENAN AL SISTEMA PORTA EN LA RAZA IBÉRICA Y LANDRACE

Con el fin de evaluar el impacto de las VDP en el consumo de energía del animal completo en las razas Ibéricas y Landrace se midió el gasto energético de las VDP dando a los animales una dieta con un contenido en PB de 14,5% (MS), óptimo para cubrir las necesidades del cerdo Ibérico aunque deficiente para cubrir las del Landrace. Nuestra hipótesis inicial era que las vísceras en el Ibérico, por su mayor peso relativo (Rivera-Ferre y col., 2005; Aguinaga y col., 2010), tendrían una mayor contribución al gasto energético total en comparación con las razas mejoradas, explicando así en parte su menor eficiencia energética para el crecimiento. Sin embargo, obtuvimos un resultado inesperado pues el flujo sanguíneo en la raza Ibérica resultó ser menor que en Landrace. Los valores de FSP preprandial tanto para la raza Landrace como Ibérica de entre 20 y 30 kg PV (965 y 654 ml/min, respectivamente) se situaron dentro del rango inferior de los obtenidos por otros autores (Yen y Killefer, 1987; Yen y col., 2004; Hooda y col., 2009). Mientras que los valores postprandiales (1133 y 746 ml/min para Landrace e Ibérico, respectivamente) fueron menores que los valores medios encontrados en la literatura (Ten have y col., 1996; Yen y col., 2004). De los datos publicados en la bibliografía se puede deducir que los valores más altos de FSP (en torno a 2000 ml/min) se registraban, salvo casos puntuales, en cerdos con pesos superiores a los 50 kg, lo que confirma la relación alométrica existente entre el FSP y el peso del animal. Los valores de FSP de la raza Ibérica (654 y 746 preprandial y postprandial, respectivamente) resultaron equiparables a los descritos para cerdos cruzados de similares pesos usando sondas ultrasónicas (Bach Knudsen y col., 2000) o ácido PAH (Bruins y col., 2000). Sin embargo, la mayoría de los valores encontrados en la literatura se encontraban por encima de los obtenidos para el cerdo Ibérico. Si se expresa el FSP relativo al peso corporal, los valores preprandiales (Yen y Killefer, 1987; Yen y col., 2004; Hooda y col., 2009) y postprandiales (Yen y Killefer, 1987; Rérat y Vaissade; 1993; van der Meulen y col., 1997) de Ibérico se situaron en el intervalo inferior de los datos de la literatura mientras que los de Landrace fueron similares.



Hay que ser cautos al comparar los resultados obtenidos para el FSP con los de la literatura ya que las diferencias podrían deberse a cambios en las condiciones experimentales por lo que es importante que éstas sean lo más parecidas posibles (Ten Have y col., 1996) y que los animales estén habituados al contacto y la manipulación del operador. Se ha visto que el flujo sanguíneo se ve afectado tanto por el comportamiento del animal en el momento del muestreo como por la cantidad y composición de la dieta consumida (Ellis y col., 1995). Tanto las cerdas Ibéricas como las Landrace alimentadas con una dieta con un contenido proteico más alto y una ingesta similar a la de este experimento presentaron valores de FSP más altos que los del presente estudio (970 y 1357 ml/min, respectivamente en Ibérico y Landrace; Rodríguez-López, 2010a). Como era de esperar y de acuerdo con los resultados en la literatura científica (Fara, 1984; Yen y Killefer, 1987; Rérat y Vaissade, 1993), se produjo una hiperemia (incremento del flujo) postprandial, la cual duró todo el periodo de muestreo con un máximo a las 0,5-1 horas y un descenso gradual hasta alcanzar una meseta a las 2-3 horas. Probablemente la hiperemia postprandial en este estudio fue de menor magnitud por la baja ingesta previa al muestreo. Algunos de los mecanismos responsables del aumento de flujo postprandial son un reflejo local causado por los alimentos en el lumen, la liberación de hormonas intestinales vasoactivas y el incremento del metabolismo intestinal (Granger y col., 1980; Jensen y col., 1995). En otros estudios, la ración diaria completa era ofrecida y posteriormente se midió la producción de calor durante un corto período de tiempo, lo que aumentaba considerablemente el FSP comparado con el estado basal. Como la ingesta tiene un alto impacto en la producción de calor se decidió alimentar al animal con una cantidad proporcional al periodo de medida (6 horas) por lo que los animales consumieron sólo el 25% de la ración diaria (<10 g dieta/kg PV), lo cual permitiría extrapolar con fines comparativos los resultados a 24 horas sin incurrir en la sobreestimación debida al incremento en la producción de calor que se produciría si toda la ración se hubiera dado al inicio del periodo de medida. El nivel de ingesta también tiene un efecto similar en el flujo sanguíneo de las VDP en rumiantes (Lomax y Baird, 1983; Huntington, 1984; Lapierre y col., 2000). Así, al comparar el flujo sanguíneo de los tejidos espláncnicos de corderos alimentados *ad libitum* y a nivel de mantenimiento, el flujo fue mayor en los primeros (Burrin y col., 1989). En el presente experimento se restringió la ingesta para que



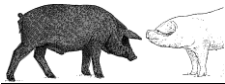
DISCUSIÓN GENERAL



ambas razas consumieran la misma cantidad de alimento. La mayor ingesta voluntaria de alimento característica de la raza Ibérica en comparación a la Landrace (Nieto y col., 2001; BSAS, 2003) dió lugar a que las cerdas Landrace estuvieran comparativamente más restringidas (71 frente al 90% de *ad libitum*).

La mayor concentración de hemoglobina en sangre y por tanto de O_2 de la raza Ibérica podría compensar el menor flujo sanguíneo pre y postprandial a través de las VDP en comparación con Landrace. Sin embargo, no habiendo diferencias en consumo de oxígeno preprandial entre razas, tras la comida, dicho consumo de oxígeno es mayor en Landrace que en Ibérico. En general, los valores de concentración de hemoglobina para las dos razas estudiadas (de 5,8 a 6,5 mmol/l) son un poco más elevados a los encontrados en la bibliografía, con valores de 5,1 y 5,2 mmol/l en cerdos Landrace (Thein y col., 2003) y cruzados (Bruins y col., 2000), respectivamente. La mayor concentración de hemoglobina observada en la sangre de Ibérico podría estar relacionada con su carácter menos “doméstico” en comparación a razas mejoradas, puesto que su aptitud para el ejercicio físico favorece la acumulación de pigmentos hemínicos (pigmentos con el grupo hemo en su estructura) como adaptación fisiológica para conseguir un mayor metabolismo oxidativo (Rey y López-Bote, 2000; Galián Jiménez, 2007), lo que estaría de acuerdo a su vez con la mayor cantidad y diámetro de las fibras musculares tipo I (oxidativas) detectadas en el músculo *Longissimus lumborum* de Ibéricos, en comparación a cerdos Landrace (Serra y col., 1998). El cerdo Ibérico está conformado fisiológicamente para resistir altas temperaturas en verano y recorrer grandes distancias en busca de alimento (Toro y col., 2000). Esta adaptación fisiológica al movimiento para el pastoreo a través de la dehesa derivó en un perfil atlético (pelo y piel oscura, morro puntiagudo, y fuertes y proporcionalmente largas patas) y, probablemente, en un mayor nivel de hemoglobina en sangre, lo que incrementaría la eficiencia de utilización de O_2 , lo que quizás reduzca el FSP.

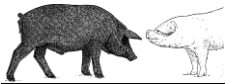
Las diferencias de concentración de O_2 arterio-portal en Ibérico fueron a su vez superiores a las obtenidas para Landrace. Sin embargo, en ambos casos se situaron por debajo de los valores pre (2-2,4 mmol/l) y postprandiales (2,2-2,8 mmol/l) observados en otros trabajos (Yen y col., 1989; Yen y Nienaber, 1992, 1993; Yen y col., 2004). Esto puede deberse a la baja ingesta (25% de la ración diaria) ofrecida a



los animales durante el periodo de muestreo. En cuanto al valor del hematocrito, los resultados obtenidos en Ibérico y Landrace fueron muy similares a los obtenidos en la literatura (Yen y col., 1991a; Reverter y col., 2000; Gudmundsson y col., 2001; Thein y col., 2003).

El consumo de O_2 de las VDP tras la ingestión de la dieta fue un 26% menor en la raza Ibérica con respecto a Landrace (1,35 y 1,82 mmol/min, respectivamente), sin diferencias para los valores preprandiales. De manera similar, Rodríguez-López y col. (2010a) obtuvieron un consumo de O_2 postprandial por las VDP un 21% menor en la raza Ibérica en relación a Landrace (1,5 y 1,9 mmol/min, respectivamente) al ingerir una dieta con un contenido proteico del 18,7% (MS). Un mayor consumo de oxígeno de las VDP al ingerir un nivel de proteína superior, fue observado anteriormente por Jørgensen y Zhao (1997) al medir el consumo de O_2 en la mucosa duodenal de ratas alimentadas con dietas de diferente contenido proteico. Numerosos estudios realizados en cerdos han indicado un aumento del tamaño de estos órganos con la ingesta de dietas con un contenido elevado en proteína (Noblet y col., 1987; Rao y McCracken., 1990) que podría implicar un aumento de las necesidades energéticas para el mantenimiento (Koong y col., 1985).

La producción de calor de las VDP fue un 28,5% menor en Ibérico con respecto a Landrace, a pesar del mayor peso relativo de las vísceras de cerdos Ibéricos de similares pesos a los empleados en la presente Tesis Doctoral obtenidos por Rivera-Ferre y col. (2005). Aunque en cerdos de mayor tamaño (50 y 115 kg PV) las diferencias en el tamaño relativo de los órganos no fueron tan patentes, sí se observó que la *Tunica muscularis* duodenal e ileal es más estrecha en Ibérico comparado con Landrace (Barea y col., 2011). El aumento de las capas musculares intestinales está relacionado con una mayor resistencia al tránsito del alimento por el intestino (Redlich y col., 1997), lo cual incrementaría el tiempo que el alimento permanece en él (Laplace y col., 1994) y, consecuentemente, el consumo de O_2 de este tejido. Este hecho junto con la menor longitud de las vellosidades y relación villi/cripta en cerdos Ibéricos con respecto a razas mejoradas (Barea y col., 2011) podría explicar en parte el menor consumo de O_2 por las VDP.



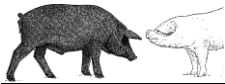
DISCUSIÓN GENERAL



La raza Meishan presenta similitudes con la Ibérica al ser ambas no mejoradas, de crecimiento lento (van Milgen y col., 1998; Yen y col., 2004), con un elevado peso relativo de las vísceras con respecto al total (Fevrier y col., 1988; Yen y col., 2004), y con tendencia a la obesidad y baja capacidad para la deposición proteica. Al igual que en la raza Ibérica, la retención de nitrógeno por los cerdos Meishan es menos eficiente que en cerdos de razas mejoradas (Fevrier y col., 1988; Kemp y col., 1991; Yen y col., 2004). Esta menor retención de nitrógeno de los cerdos Meishan se refleja por ejemplo en un 45% menos de músculo (Yen y col., 1991b) y un 59% menos de deposición proteica diaria (Hansen y col., 1997) que en el caso de razas mejoradas, mientras que presentaban mayores depósitos grasos (Yen y col., 1991b). Teniendo en cuenta las similitudes entre la raza Ibérica y la Meishan cabría esperar resultados parecidos en cuanto al flujo sanguíneo y/o consumo de O_2 por las VDP. Sin embargo, en un estudio empleando cerdos Meishan y cerdos cruzados Duroc×White composite se obtuvo un mayor FSP pre y postprandial y un mayor consumo de O_2 por las VDP previo a la ingestión de alimento para los cerdos Meishan en comparación a los mejorados, sin que se produjesen diferencias significativas en el consumo de O_2 de las VDP tras la ingestión de la dieta (Yen y col., 2004). Estos resultados ponen de manifiesto que la masa de las VDP probablemente no sea el único factor involucrado en el consumo de O_2 de las VDP en el caso de cerdos Meishan.

En general, la producción de calor de las VDP tanto de la raza Landrace (93 kJ/kg^{0,75} y día) como Ibérica (74 kJ/kg^{0,75} y día) son menores que los valores obtenidos para otras razas como la Large White (163-172 kJ/kg^{0,75} y día) en machos castrados de 59 kg PV (Rérat y Vaissade, 1993), aunque estas diferencias podrían tener su explicación en diferencias asociadas al tipo de dieta, nivel de ingesta o en el peso de los animales considerados.

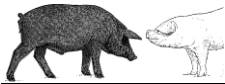
Es interesante la menor producción de calor de las VDP en Ibérico cuando la producción de calor total observada fue mayor en comparación al Landrace. Aunque se ha relacionado el mayor peso de los órganos con una mayor producción de calor total (Koong y col., 1982, 1983; Ferrell y col., 1986; Yen y col., 1991b) al comparar la raza Meishan con cerdos cruzados Duroc×White composite, no se encontraron diferencias significativas respecto a la producción de calor total (501 y 529 kJ/kg^{0,75} y



día, para Meishan y DurocxWhite, respectivamente; Yen y col., 2004). En cambio, la producción de calor en ayunas y en reposo entre los cerdos Meishan ($481 \text{ kJ/kg}^{0,75}$ y día) fue menor que la de los cerdos de razas magras como Large White ($626 \text{ kJ/kg}^{0,75}$ y día) o Piétrain ($563 \text{ kJ/kg}^{0,75}$ y día), entre 22 y 27 kg PV (van Milgen y col., 1998). Por tanto, existen diferencias metabólicas importantes entre cerdos Meishan e Ibéricos. Desgraciadamente la información acerca de las diferencias en la producción de calor total entre cerdos magros y obesos es escasa.

La producción de calor total de las cerdas Landrace en nuestros experimentos ($762 \text{ kJ/kg}^{0,75}$ y día) estuvo dentro de los valores encontrados en la literatura en cerdos de distintas razas y pesos (Schrama y col., 1996; Henken y col., 1991; Yen y col., 1991a; Jørgensen y col., 1996; Brown-Brandl y col., 2001; Chwalibog y col., 2004); mientras que la producción de calor total de la raza Ibérica fue superior ($925 \text{ kJ/kg}^{0,75}$ y día). Estos valores resultaron incluso superiores a los encontrados en cerdos Ibéricos castrados, aunque de un peso algo superior a los utilizados en nuestro caso (Lachica y Aguilera, 2000), quizás por el descenso proporcional que se produce en la producción de calor total al incrementarse el PV del animal (van Milgen y col., 1998; Barea y col., 2010).

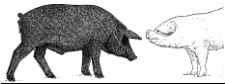
Se obtuvieron en nuestros experimentos valores similares de cocientes de producción de calor de las VDP/total a los descrito por Rodríguez-López y col. (2010b) en cerdas restringidas al mismo nivel pero alimentadas con dietas con un mayor contenido proteico (18,7% en MS) donde la contribución de las VDP de las cerdas Ibéricas supuso el 9,5% de la producción de calor total mientras que en las Landrace el valor alcanzó el 13,4%. Sin embargo, contribución de las VDP a la producción de calor total en ambas razas fue considerablemente inferior al 30 y 48% observado para DurocxWhite composite y Meishan, respectivamente (Yen y col., 2004) o del 20 al 25% del consumo de O_2 total en cerdos magros cruzados (Yen y col., 1989; Yen y Nienaber, 1992; Yen, 1997). Los bajos valores obtenidos para Ibérico y Landrace podrían deberse a la baja ingesta energética ofrecida para realizar las mediciones, ya que los animales consumieron el 25% de la ración diaria. Así, el aporte de la producción de calor en ayunas, ENm, contribuye proporcionalmente más a la producción de calor total cuando la ingesta es superior que en nuestro caso. Los valores de RQ tanto en Ibérico como en Landrace (0,75 y



0,79, respectivamente) indican que los animales estaban probablemente por debajo de mantenimiento.

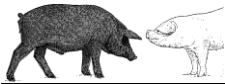
Es evidente que la composición corporal tiene un efecto en la producción de calor en ayuno del animal tal y como reflejan numerosos trabajos en la literatura. Utilizando cerdos seleccionados genéticamente a lo largo de varias generaciones para obtener canales magras o grasas, es posible eliminar el factor raza como causa de variación y estudiar de qué manera la composición corporal afecta al metabolismo energético del animal. Así, Tess y col. (1984a) obtuvieron diferencias de producción de calor entre genotipos no atribuibles a la composición corporal sino más bien al metabolismo proteico, mientras que el metabolismo de las grasas contribuiría en menor medida. Se ha sugerido una posible relación entre la producción de calor en ayunas y la tasa de deposición de proteína, independientemente de la composición corporal de los animales (Tess y col., 1984b). En general, los animales obesos y de crecimiento lento presentan una menor producción de calor en ayunas que los más magros y de crecimiento rápido (Sundstøl y col., 1979; Koong y col., 1983). Con otra perspectiva, van Milgen y col. (1998) invirtieron la relación causa-efecto aseverando que los animales alimentados *ad libitum* y con alta producción de calor en ayunas (necesidades de mantenimiento) permanecen magros (como en el caso de las razas mejoradas), mientras que aquellos con igual capacidad de ingesta y menor producción de calor en ayunas llegaban a ser más grasos.

Aunque la existencia de una relación positiva entre la tasa de deposición de proteína y la producción de calor está aceptada, es difícil determinar qué proceso es causa o consecuencia del otro. De hecho, según indicaron Yen y Nienaber (1992), la producción de calor asociada con la deposición de proteína en animales no rumiantes es aproximadamente el doble de la de deposición de grasa. Ferrell (1988) en una revisión bibliográfica concluía que la eficiencia energética para la deposición proteica (40-50% en rumiantes y 10-40% en monogástricos) es menor que la de la deposición de grasa (60-80%), lo que se explica en parte por el elevado coste energético asociado a la síntesis y a la renovación proteica (van Milgen y Noblet, 2003). Sin embargo, los resultados obtenidos en la comparación Ibérico-Landrace parecen opuestos a estas afirmaciones, puesto que la producción de calor tras la



ingestión de la dieta fue siempre superior en la raza más grasa y de crecimiento más lento (Ibérico) que en la más magra y de crecimiento más rápido (Landrace). La mayor renovación proteica muscular en el cerdo Ibérico en comparación con razas mejoradas (Rivera-Ferre y col., 2005), podría explicar en parte la mayor producción de calor encontrada para esta raza en la presente Tesis Doctoral. Estos autores observaron una mayor tasa de síntesis proteica fraccional y, sobre todo, una elevada tasa fraccional de degradación proteica en músculo (>50% en comparación a Landrace), siendo responsable esta última de la degradación de más del 75% de la proteína muscular sintetizada en Ibérico, frente al, aproximadamente, 60% que tendría lugar en Landrace. Estos resultados estarían en concordancia con la mayor capacidad de las razas mejoradas para la deposición proteica global frente a la raza Ibérica (Rivera-Ferre y col., 2006). Sin embargo, la menor renovación proteica a nivel del organismo completo (Rivera-Ferre y col., 2006) y el menor consumo de oxígeno y producción de calor de las VDP obtenidos en la presente Tesis Doctoral, a pesar del mayor peso relativo de estas vísceras (Rivera-Ferre y col., 2005) en el cerdo Ibérico respecto al Landrace, actuarían en el sentido de una menor producción de calor en el primero.

Es probable que la raza Ibérica, como consecuencia del origen común con el jabalí (*Sus scrofa*; Alves y col., 2003), presente una mayor actividad física espontánea y nivel de alerta, lo que daría como resultado una mayor producción de calor en comparación a las razas mejoradas, las cuales comparten un origen asiático (Giuffra y col., 2000). De hecho, numerosos trabajos describen una relación negativa entre el grado de domesticación y el gasto energético total (Robert y col., 1987; Gustafsson y col., 1999). El menor RQ obtenido en Ibérico frente a Landrace podría ser un reflejo de su mayor renovación proteica muscular (Rivera-Ferre y col., 2005), y una oxidación preferente de los lípidos respecto a Landrace, entre otras cosas por estar más restringidos los Ibéricos a igualdad de ingesta.

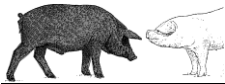


5.3. DIFERENCIAS EN EL METABOLISMO HEPÁTICO DE CERDOS OBESOS Y MAGROS

El hígado puede considerarse como el centro del metabolismo intermediario en el organismo. Retira la glucosa de la circulación si está en exceso, tras una comida rica en hidratos de carbono, por ejemplo, sintetizando glucógeno, o mediante glucolisis o síntesis *de novo* de lípidos. Libera glucosa a la circulación cuando es necesario, entre comidas, degradando glucógeno o mediante GNG. Es el único órgano capaz de producir cuerpos cetónicos y tiene un papel esencial en la síntesis de hormonas como la IGF-I. El hígado detoxifica el amonio y el nitrógeno aminoacídico sintetizando urea y glutamina. Los principales mecanismos de producción de energía en el hígado son la β -oxidación de AG y la degradación de aminoácidos. En fin, el hígado es clave en la integración del metabolismo de hidratos de carbono, lípidos y aminoácidos.

Se decidió estudiar algunas de estas rutas metabólicas que a nuestro parecer podrían determinar las diferencias metabólicas encontradas *in vivo* en genotipos con muy distinta eficiencia como son el cerdo Ibérico y el Landrace. Para ello se utilizó el cultivo primario de hepatocitos: células hepáticas procedentes del cerdo donante son cultivadas *in vitro* durante un tiempo determinado. Ya se ha mencionado anteriormente que una ventaja evidente del uso del cultivo de hepatocitos es que se pueden controlar muy bien las condiciones experimentales y adicionalmente se disminuye el número de animales necesarios para realizar un experimento en comparación con uno realizado *in vivo*.

En el diseño del presente experimento se buscó la utilización de lechones de Ibérico y Landrace dentro de un intervalo de pesos parecido para que las posibles diferencias metabólicas se debieran a su genotipo, no a una diferencia de edad. Al no disponer de ganaderos que destetasen los lechones de Ibérico y Landrace al mismo tiempo, se decidió llevar a cabo el aislamiento primero en cerdos Landrace y a continuación en cerdos Ibéricos, aunque hubiéramos sido preferible realizar aislamientos alternativos de una y otra raza. En el caso de los cerdos Ibéricos, las parideras ocurren cada 3 meses, con dos ciclos reproductivos por cerda y año en las granjas comerciales. El estudio se realizó en cerdos de 9-50 kg PV, que es el peso que ganaron los animales entre el primer y el último aislamiento. Se realizaron 8 y 10



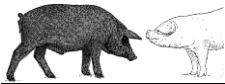
aislamientos para Landrace e Ibéricos, respectivamente, con 5 días de duración para cada experimento. En cerdos tan jóvenes, dentro de este intervalo de peso, las diferencias fisiológicas entre Ibéricos y Landrace no son tan acentuadas como entre cerdos de mayor peso. Se sabe que la viabilidad de los hepatocitos disminuye conforme aumenta la edad del animal, existiendo muchos investigadores que usan exclusivamente fetos o neonatos para el cultivo primario de hepatocitos porcinos. En este experimento se pudo comprobar que la diferencia en viabilidad de los hepatocitos entre cerdos de 9-15 y 16-50 kg PV no era significativamente distinta en ninguna de las razas estudiadas. Aunque muchos estudios realizados con cultivo primario de hepatocitos consideran que 3-5 aislamientos representan un número suficiente de cerdos, se prefirió utilizar un número considerablemente mayor, 8-10 cerdos, para dar mayor robustez a las conclusiones.

Hemos diseñado los experimentos con el objetivo de evaluar en el hepatocito aspectos bioquímicos del metabolismo glucídico (GNG y degradación de glucógeno), proteico (síntesis de albúmina y producción de urea) y lipídico (esterificación de AG y producción de β -hidroxibutirato) así como la secreción de la hormona IGF-I .

En el presente experimento, se añadió carnitina de manera rutinaria al medio para permitir la entrada de AG a la mitocondria (Agius y col., 1986). Además, los AG se acomplejaron a la albúmina para simular condiciones fisiológicas (Calder y col., 1990).

GLUCONEOGÉNESIS Y DEGRADACIÓN DE GLUCÓGENO

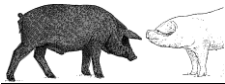
En la estimación de la GNG los hepatocitos se pre-incubaron en glucagón para provocar el agotamiento de las reservas hepáticas de glucógeno; aunque no se puede descartar totalmente algo de glucogenólisis, se asumió que la glucosa procedente de ésta fue inapreciable debido al agotamiento de las reservas celulares de glucógeno logrado mediante la pre-incubación con glucagón. Por lo tanto, la glucosa libre medida en un medio de cultivo, libre de glucosa, se utilizó como estimación de la capacidad de GNG del hepatocito. El experimento se diseñó usando una relación insulina/glucagón baja (simulando una situación de ayuno) para



detectar diferencias entre razas en condiciones que estimulan la GNG. No se detectaron diferencias en GNG debido a la suplementación del medio con lactato, piruvato o alanina como precursores de glucosa y, en consecuencia, los datos se combinaron para el análisis estadístico posterior. Los hepatocitos de Ibérico tuvieron una mayor producción de glucosa a partir de precursores de la GNG (24%) en comparación con Landrace. Por otro lado, no se encontraron diferencias entre razas en glucogenólisis medida en células preincubadas con un medio rico en insulina, lo que facilitó el llenado de los depósitos de glucógeno, y cultivadas posteriormente en un medio con una relación insulina/glucagón baja, que estimuló la degradación de glucógeno.

De manera similar a nuestro experimento, se observó un mayor potencial para la GNG en cerdos Ossabaw (descendientes de cerdos Ibéricos llevados por los exploradores españoles en el siglo XVI a la isla de Ossabaw, EE.UU) en comparación con los cerdos Yorkshire (Martin y Herbein, 1976; Kasser y col., 1981).

La idea de que la glucosa que llega al hígado tras una comida es el sustrato principal para la síntesis de glucógeno y lípidos se puede encontrar en la mayoría de los libros de texto (Katz y col., 1986). Sin embargo, hay evidencias que indican que tanto en animales como en humanos sólo una pequeña fracción de la misma es inicialmente metabolizada en el hígado (McGarry y col., 1987) y que los precursores gluconeogénicos son mejores precursores que la glucosa (Katz y col., 1984) para la síntesis del glucógeno hepático. Además, se ha visto que la inhibición de la GNG por la insulina puede estar mediada a través del desvío hacia otras vías, como la oxidación y la formación de glucógeno, de los compuestos de 3 carbonos (Yki-Jarvinen y col., 1989), en lugar de a través de una reducción de la afluencia de estos sustratos en el hígado. Por lo tanto, la insulina puede inhibir el flujo de la glucosa procedente de la GNG al plasma, dirigiendo esta glucosa recién formada (glucosa-6-fosfato) hacia la síntesis de glucógeno (Giaccari y col., 1992). Nosotros no medimos la capacidad de síntesis de glucógeno en nuestros experimentos aunque un mayor potencial para la GNG podría dar lugar a una mayor capacidad de síntesis de glucógeno en el cerdo Ibérico. En cualquier caso, si se consideraran las reservas totales de glucógeno del hígado, como dicho órgano es más pesado en el Ibérico en relación al peso corporal que en los Landrace (Rivera-Ferre y col., 2005; Barea y



col., 2011), la glucogenólisis podría durar más tiempo en el primero con un ayuno prolongado.

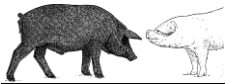
In vivo, sin embargo, los Ibéricos tenían una glucemia menor en ayunas en comparación con Landrace (Fernández-Fígares y col., 2007) y de manera similar, las concentraciones séricas de glucosa eran generalmente más bajas en cerdos obesos en comparación con mejorados (Pond y col., 1980; Wangsness y col., 1981).

La menor glucemia en ayunas de cerdos Ibéricos en comparación con Landrace (Fernández-Fígares y col., 2007) a pesar de su mayor capacidad de GNG, puede estar relacionada con un patrón común en muchos modelos animales de obesidad donde se observa un aumento de la entrada de glucosa a la célula tanto basal como estimulada por la insulina en fases tempranas del desarrollo de la obesidad (Proietto y col., 1994).

CONTENIDO DE TRIGLICÉRIDOS Y ESTERIFICACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Aunque el hígado es un sitio con una importancia menor para la lipogénesis en los cerdos adultos (Gondret y col., 2001), su importancia en lechones antes del destete es mayor que la del tejido adiposo (Fenton y col., 1985). Sin embargo, se ha prestado poca atención al estudio de la lipogénesis hepática en cerdos jóvenes.

Se observó una tendencia a una menor tasa de esterificación de AG en Ibérico (31%; $P=0,058$) en comparación con Landrace y, en consecuencia, el contenido de TG tendió a ser menor (12%; $P=0,053$). La adición de los AG (ácido linoleico o CLA) al medio de cultivo, aumentó significativamente el contenido de TG en comparación con el control (74 y 55%, respectivamente para el CLA y ácido linoleico). De forma análoga, la tasa de esterificación de palmítico fue mucho mayor que la incorporación del carbono procedente de la glucosa en lípidos (lipogénesis *de novo*) en cerdos (Go y col., 2012). Además, el CLA disminuyó la disponibilidad de AG para la síntesis de TG (Priore y col., 2007) en hepatocitos de rata mientras que en cerdos se ha observado que el CLA tiende a disminuir la síntesis lipídica a partir de glucosa en hígado (Go y col., 2012). Una disminución de la lipogénesis *de novo* inducida por el



DISCUSIÓN GENERAL



CLA en cerdos (Go y col., 2012), implicaría que la esterificación del CLA a TG habría sido subestimada en comparación con el ácido linoleico en nuestro experimento.

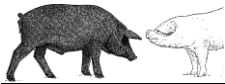
Aunque se ha observado anteriormente una estimulación de la síntesis de TG al aumentar el nivel de AG en el medio en hepatocitos porcinos en ausencia de glucagón (Conde-Aguilera y col., 2012), en presencia del mismo dicha estimulación fue mucho menor (Conde-Aguilera y col., 2012), probablemente como consecuencia del aumento de la oxidación de los AG. Hemos utilizado en nuestros experimentos un nivel de glucagón que no parece haber alterado la estimulación por los AG libres de la esterificación.

A pesar de que Conde-Aguilera y col. (2012) no encontraron un efecto significativo del CLA en la síntesis de TG en hepatocitos, el nivel de dexametasona fue 10 veces superior comparado con el presente experimento y pudo haber enmascarado el efecto estimulador del CLA sobre la esterificación de los AG encontrado en esta Tesis.

In vivo se ha visto que los TG plasmáticos aumentaron en cerdos alimentados con dietas suplementadas con CLA en comparación con los que lo ingirieron una dieta control, aunque no se observaron diferencias en el contenido en TG hepáticos ni diferencias histológicas en los hígados (Fernández-Fígares y col., 2012).

En cuanto al efecto de la raza, en nuestro estudio se observó una menor tasa de esterificación de AG en Ibérico en comparación con Landrace y, consecuentemente, menor contenido de TG en las células. Por el contrario, *in vivo* no se encontraron diferencias en los niveles de TG plasmáticos al comparar cerdos Ibéricos y Landrace (Fernández-Fígares y col., 2007) aunque sí hubo una interacción raza x nivel de proteína. Desafortunadamente no hemos encontrado información en la bibliografía que compare la capacidad de lipogénesis hepática en cerdos de raza Ibérica con razas mejoradas aunque Pond y col. (1980) encontraron niveles plasmáticos de glucosa y TG más bajos en cerdos obesos en comparación con cerdos magros.

Como se ha mencionado anteriormente, el cerdo Ibérico, debido a la variabilidad estacional en la disponibilidad de alimentos, debió desarrollar

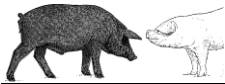


mecanismos metabólicos que le permitieran afrontar momentos de escasez de recursos energéticos. El almacenamiento de la energía sobrante tendría que hacerse con rapidez, además, por la amenaza de los depredadores. Este mecanismo podría quizás explicarse por una “sensibilidad diferencial a la acción de la insulina” según el tejido. Según esta hipótesis que formuló Neel en 1962, existiría una resistencia a la acción de la insulina en el músculo y una elevada sensibilidad en el tejido adiposo, lo que explicaría la ganancia rápida de grasa durante las épocas de abundancia de alimento proporcionando ventajas de supervivencia y reproducción en épocas de escasez. Este mecanismo podría estar detrás de los niveles séricos más bajos de glucosa y TG observados en los cerdos obesos en comparación con los cerdos magros. Además, una mayor capacidad para sintetizar glucógeno en los Ibéricos durante el periodo postprandial, gracias a su mayor capacidad gluconeogénica, podría significar que una menor cantidad de glucosa sería destinada a la síntesis *de novo* de AG por lo que explicaría el menor contenido de TG encontrado en Ibérico

SÍNTESIS DE β -HIDROXIBUTIRATO

Estudios realizados con hepatocitos aislados de lechones sugirieron que el acetato, en lugar de los cuerpos cetónicos, representa el principal producto (60-70%) resultante de la oxidación de los AG (Lin y col., 1996; Adams y col., 1997), lo que indicaría que la oxidación de AG en los lechones recién nacidos difiere respecto a otras especies (Lin y col., 2010). Además, el acetato es metabolizado con preferencia respecto a los cuerpos cetónicos en hígado, cerebro y colonocitos (Darcy y col., 1996; Steele y col., 1984), sugiriendo su importancia como fuente energética.

De hecho la enzima hepática CPT-I (cataliza el primer paso en la entrada de AG de cadena larga en la matriz mitocondrial) tiene una estructura molecular atípica con una expresión limitada en cerdos en comparación con otras especies de mamíferos (Nicot y col., 2001, 2002). La CPT-I de cerdo es una quimera natural de los isotipos muscular y hepático, mostrando una afinidad para la carnitina característica de los isotipos de hígado pero una inhibición para malonil-CoA

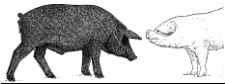


característica de los isotipos musculares. Además de esta estructura singular de la CPT-I, la actividad mitocondrial de la HMG-CoA sintasa, enzima clave que regula la cetogénesis, es extremadamente baja en los lechones lactantes, lo que da lugar a una cetogénesis reducida (Duée y col., 1994; Barrero y col., 2001).

En nuestro experimento, como era de esperar, la producción de β -hidroxibutirato fue baja ya que se sabe que la baja capacidad cetogénica del hígado en cerdos recién nacidos persiste en el cerdo adulto (Duée y col., 1994). Los niveles observados se situaron en un rango inferior a los obtenidos previamente en hepatocitos de cerdos de 60 kg PV (Fernández-Fígares y col., 2004), y notablemente más baja que la cetogénesis en preparaciones hepáticas de ratas maduras (Duée y col., 1994), bovino (Cadórniga-Valiño y col., 1997) y hepatocitos humanos (Vons y col., 1991). No se encontraron diferencias en la síntesis de β -hidroxibutirato cuando los hepatocitos procedentes de cerdos Ibéricos y Landrace fueron comparados. Sin embargo, el glucagón estimuló la síntesis de β -hidroxibutirato en relación a la insulina.

El aumento de la cetogénesis *in vitro* mediado por glucagón ha sido consistentemente confirmado en hepatocitos de ratas (Witters y Trasko, 1979) y humanos (Vons y col., 1991), pero no en hepatocitos bovinos (Cadórniga-Valiño y col., 1997). Mientras que la insulina antagoniza los efectos cetogénicos del glucagón en hepatocitos de ratas (Witters y Trasko, 1979), no tiene efecto en hepatocitos bovinos (Cadórniga-Valiño y col., 1997).

In vivo, estudios pioneros con cerdos neonatales en ayunas (Pegorier y col., 1981; Müller y col., 1982) sugerían que la leve cetosis encontrada estaba modulada por insulina y glucagón. De hecho, de manera similar a lo que ocurrió en el experimento, donde el glucagón estimula y la insulina inhibe la producción de β -hidroxibutirato, se ha observado que la síntesis de cuerpos cetónicos en hepatocitos de cerdos de 60 kg PV es sensible a la regulación a largo plazo por la insulina, el glucagón y la dexametasona (Fernández-Fígares y col., 2004), mientras que a corto plazo la adición de glucagón ha demostrado no tener ningún efecto sobre la cetogénesis en hepatocitos de cerdo (Pegorier y col., 1982).



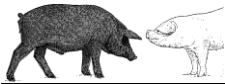
SÍNTESIS DE ALBÚMINA

La síntesis de urea o albúmina son algunas de las funciones específicas que se evalúan rutinariamente para determinar la funcionalidad del hepatocito tras la conservación de las células por congelación en hígados bioartificiales o en la evaluación de viabilidad a largo plazo de cultivos celulares, sean suspensiones o cultivos en monocapa.

En nuestro estudio se encontró una mayor síntesis de albúmina en Ibérico en comparación con Landrace (58%) pero no se observó ningún efecto de la relación insulina/glucagón en la síntesis de albúmina independientemente de la raza.

In vivo, los cerdos criollos de Guatemala (originalmente de tronco Ibérico) tenían niveles de albúmina sérica superiores a los de los cerdos Duroc alimentados con dietas con distintos niveles de proteína (Gómez-Brenes y col., 1974). Sin embargo, estudios recientes de nuestro grupo demostraron que la tasa fraccional de síntesis proteica hepática fue similar en los cerdos Landrace e Ibéricos alimentados con dietas con diferente contenido proteico (Rivera-Ferre y col., 2005). Es posible que mientras la síntesis de proteína de exportación se vea afectada por la herencia genética (presente estudio) no ocurra lo mismo con la síntesis de proteína total del hígado. Se ha descrito en este sentido, que la mayor concentración de proteína en la dieta incrementa la síntesis de proteínas constitutivas hepáticas pero no afecta a la síntesis de albúmina (Chevalier y col., 2010), indicando una regulación independiente de la síntesis de ambos tipos de proteínas. Además, parece haber una compartimentación de forma que las proteínas de exportación se sintetizan en el retículo endoplásmico rugoso mientras que las proteínas constitutivas se sintetizan en polisomas en el citosol de la célula (Connell y col., 1997).

La síntesis de proteína en el hígado se puede modular por cambios en la ingesta de alimentos en animales en crecimiento y adultos (Burrin y col., 1992, 1997; Mosoni y col., 1996). Se ha sugerido, en estudios en ratas diabéticas y en hepatocitos de rata y bovinos, que la insulina estimula la síntesis de proteína hepática (Jefferson y col., 1983; Hsu y col., 1992; Kimball y col., 1995; Strang y col., 1998). Sin embargo, en cerdos de entre 7 y 26 días de edad, la insulina no alteró, contrariamente a lo que ocurría en músculo, la síntesis de proteína hepática (Davis y



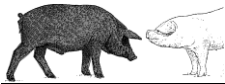
col., 2001; Suryawan y col., 2009) y tampoco se encontraron diferencias en la síntesis de albúmina en humanos con niveles de insulina plasmáticos aumentados (Ballmer y col., 1995). Se ha observado que en el caso de la tasa de secreción de albúmina en cultivos primarios de hepatocitos, las diferencias entre especies son mucho menores al comparar hepatocitos humanos y porcinos mientras que aumentan en el caso de las ratas (Langsch y col., 2009).

El trabajo realizado en la presente tesis Doctoral usando cultivo primario de hepatocitos de razas con diferente perfil metabólico es el primero en estudiar el efecto de la relación insulina/glucagón en la síntesis de albúmina en hepatocitos de cerdo, y coincide con los anteriores realizados en otras especies en relación a la falta de efecto de la insulina en dicha síntesis. También por primera vez, se ha demostrado la existencia de diferencias en capacidad de síntesis de albúmina entre razas con perfil magro y obeso. Las consecuencias *in vivo* de dichas diferencias pueden reflejar diferencias por ejemplo en actividad antioxidante, capacidad anticoagulante, mantenimiento de la presión oncótica o el transporte de metabolitos y drogas, es decir, todas aquellas funciones en que la albúmina está involucrada.

SÍNTESIS DE UREA

Respecto al efecto de la raza se observó que la capacidad de síntesis de urea fue mayor en los hepatocitos de cerdos Landrace que en los Ibéricos (86%, $P < 0,05$).

La producción de glucosa a partir de aminoácidos (GNG) da como resultado la producción de amonio, lo que supone una carga de amonio extra para el hígado. En este sentido, una mayor capacidad de GNG en hepatocitos de Ibérico en comparación con los cerdos Landrace implicaría una mayor cantidad de amonio para detoxificar en el hígado en condiciones que favorecen la GNG (ayuno, por ejemplo). Sin embargo, la concentración de urea en el medio ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína) y la capacidad de síntesis de urea ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína y hora) fue menor en los hepatocitos de Ibérico en comparación con los de Landrace por lo que una menor capacidad de síntesis de urea en los cerdos Ibéricos implicaría que una dieta

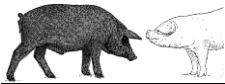


hiperproteica significaría una mayor carga metabólica en Ibérico en comparación con cerdos Landrace.

In vivo, la concentración de N ureico en sangre se relaciona de manera inversamente proporcional a la eficiencia de utilización de N o crecimiento magro (Coma y col., 1995), y su reducción se asocia generalmente con un aumento en la eficiencia de utilización de N (Berschauer y col., 1983). En cerdos seleccionados para aumentar la eficiencia en crecimiento magro (Fabian y col., 2003) o mínimo espesor de la grasa dorsal (Mersmann y col., 1984), se observó una menor concentración de urea en suero en comparación con los cerdos control como consecuencia de un menor uso de aminoácidos con fines energéticos debido a su mayor necesidad de proteína. Además, la concentración de urea sérica está asociada a la ingesta de proteínas de la dieta (Yang y col., 2000; Mejia-Guadarrama y col., 2002). Aunque no se encontraron diferencias al comparar los valores de urea en el suero de Ibérico y Landrace alimentados con dietas isonitrogenadas, los valores de urea disminuyeron cuando los animales fueron alimentados con dietas más bajas en PB (Fernández-Fígares y col., 2007). Aún cuando la capacidad del hígado para la síntesis de urea sobrepasa las necesidades de retirada de amonio en la mayoría de situaciones fisiológicas, es posible que durante un corto periodo de tiempo, al principio de una comida hiperproteica, los cerdos puedan sintetizar urea a una velocidad próxima a su máximo potencial (Carey y col., 1993), lo que podría ser importante en los cerdos Ibéricos con menor capacidad de producción de urea.

SÍNTESIS DE IGF-I

Debido a que la IGF-I estimula la captación de aminoácidos y glucosa y aumenta la síntesis de proteína (Dimitriadis y col., 1992; Tomas y col., 1992) una mayor tasa y eficiencia en el crecimiento de los cerdos puede deberse a diferencias en los niveles circulantes de IGF-I. En estudios anteriores en cerdos se ha observado una correlación positiva entre tasa de crecimiento e IGF-I (Buonomo y col., 1987). Cuando se compararon cerdos machos sin castrar con diferente potencial para el crecimiento, como los Meishan y Large White, las concentraciones en sangre de IGF-I fueron menores en los primeros (Weiler y col., 1998), con un



DISCUSIÓN GENERAL

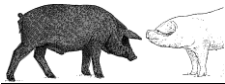


crecimiento más lento. Sin embargo, otros autores no encontraron diferencias ni en los niveles de IGF-I plasmáticos (Louveau y col., 1991; Farmer y col., 2000) ni en la expresión de IGF-I en hígado cuando se compararon cerdos con características diferentes en composición corporal y crecimiento (Brameld y col., 1997).

En los experimentos desarrollados en esta Tesis, la síntesis de IGF-I en los hepatocitos de Ibérico fue menor en comparación con Landrace. Estudios *in vivo* anteriores realizados en nuestro laboratorio con cerdos Ibéricos en crecimiento, demostraron su bajo potencial genético para el crecimiento y la deposición de tejido magro en comparación con las razas convencionales (Nieto y col., 2012), lo que estaría en consonancia con la menor síntesis hepática de IGF-I encontrada en el presente estudio. Curiosamente, en ayuno se encontró una mayor concentración sérica de IGF-I sin diferencias en la GH al comparar Ibérico frente a Landrace (Fernández-Fígares y col., 2007), si bien sólo se tomó una única muestra de sangre lo que pudo haber enmascarado las diferencias entre razas.

Aunque el hígado es una fuente primaria de IGF-I circulante (Zapf y Froesch, 1986), la extrapolación de los resultados de *in vitro* a *in vivo* debe hacerse con precaución, ya que hay elementos como otras hormonas, receptores o proteínas de unión de la IGF-I (IGFBP) que regulan su actividad *in vivo* (Brameld, 1997). Además, aunque la IGF-I tiene un papel central mediando las acciones biológicas de GH, existen acciones de IGF-I y de GH que son independientes entre sí (Butler y Le Roith, 2001).

Los niveles de GH y de IGF-I están influenciados principalmente por factores nutricionales y hormonales (Brameld, 1997). La secreción de la GH está bajo el control de factores hipotalámicos como la hormona liberadora de la somatotropina, la somatostatina, la hormona inhibidora de la liberación de la somatotropina y la grelina (con una intensa actividad estimulante sobre la GH). La secreción está regulada mediante un sistema de retroalimentación negativa. La GH aumenta las concentraciones de IGF-I circulantes, y una concentración de IGF-I elevada inhibe la secreción de GH a nivel de la hipófisis y estimula la secreción de somatostatina por el hipotálamo que inhibe a su vez la secreción de GH.

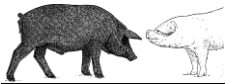


DISCUSIÓN GENERAL



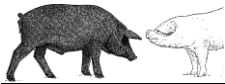
La frecuencia de la secreción pulsátil de la GH y, por tanto la concentración de IGF-I, se ve afectada por factores asociados a los ritmos biológicos tales como el sueño y la vigilia, las horas de luz y oscuridad, las horas de ingesta y reposo, el manejo al que son sometidos los animales y la calidad de la nutrición. El suministro de aminoácidos y la GH son estímulos sinérgicos de la secreción de IGF-I (Wheelhouse y col., 1999). En comparación con la raza Landrace, los cerdos Ibéricos tienen menores necesidades de proteína (Nieto y col., 2012) y capacidad de liberación de GH (Rodríguez-López y col., 2013) lo que implicaría un menor estímulo para la liberación de IGF-I *in vivo*.

Además, se ha observado en hepatocitos porcinos que la leptina puede inhibir la expresión y la secreción de IGF-I (Ajuwon y col., 2003) y, a su vez, la IGF-I inhibe la expresión del receptor de leptina (Ramsay y col., 2010). Esto concuerda con el nivel sérico de leptina más elevado (Fernández- Fígares y col., 2007) y la menor síntesis de IGF-I en los cerdos Ibéricos en comparación con Landrace obtenida en este experimento. Recientemente se ha visto que la IGF-I disminuye la expresión y la actividad de las enzimas gluconeogénicas piruvato carboxilasa y fosfoenolpiruvato carboxiquinasa en hepatocitos de ternera (Wang y col., 2012), lo que estaría en consonancia con una mayor GNG en hepatocitos de Ibérico en comparación con Landrace. Además, se ha documentado que niveles altos de insulina libre e IGF-I están relacionados con la diabetes tipo 1 y la obesidad en humanos (Frystyk y col., 1999). Aunque el cerdo Ibérico se puede considerar una raza obesa, en el presente experimento la síntesis de IGF-I en los hepatocitos de cerdo Ibérico fue menor que en Landrace, lo que puede indicar que la aparición de la obesidad en los cerdos Ibéricos probablemente tiene lugar en una edad más avanzada. De manera que si se utilizaran hepatocitos de cerdos Ibéricos de mayor edad, no podemos descartar la posibilidad de un aumento de la síntesis de IGF-I en comparación con hepatocitos de cerdos magros.



5.4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

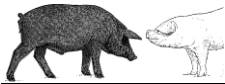
- Adams, S. H., Lin, X., Yu, X. X., Odle, J., Drackley, J. K. 1997. Hepatic fatty acid metabolism in pigs and rats: major differences in endproducts, O₂ uptake, and beta-oxidation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 272:1641-1646.
- Agius, L., Chowdhury, M. H., Davis, S. N., Alberti, K. G. M. M. 1986. Regulation of ketogenesis, gluconeogenesis, and glycogen synthesis by insulin and proinsulin in rat hepatocyte monolayer cultures. *Diabetes*, 35:1286-1293.
- Aguinaga, M. A., Conde-Aguilera, J. A., Ruiz-Guerrero, V., Navarro, A. I., Aguilera, J. F., Nieto, R. 2010. Incorporation of lysine from microbial origin into tissue protein of Iberian and Landrace x Large White piglets. *Livestock Science*, 133:104-106.
- Ajuwon, K. M., Kuske, J. L., Anderson, D. B., Hancock, D. L., Houseknecht, K. L., Adeola, O., Spurlock, M. E. 2003. Chronic leptin administration increases serum NEFA in the pig and differentially regulates PPAR expression in adipose tissue. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 14:576-583.
- Alves, E., Ovilo, C., Rodriguez, M. C., Silio, L. 2003. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogenetic relationships among Iberian pigs and other domestic and wild pig populations. *Animal Genetics*, 34:319-324.
- Bach Knudsen, K. E., Jørgensen, H., Canibe, N. 2000. Quantification of the absorption of nutrients derived from carbohydrate assimilation: model experiment with catheterised pigs fed on wheat or oat-based rolls. *British Journal of Nutrition*, 84:449-458.
- Ballmer, P. E., McNurlan, M. A., Essen, P., Anderson, S. E., Garlick, P. J. 1995. Albumin synthesis rates measured with [2H5ring] phenylalanine are not responsive to short-term intravenous nutrients in healthy humans. *The Journal of Nutrition*, 125:512.
- Barea, R., Dubois, S., Gilbert, H., Sellier, P., van Milgen, J., Noblet, J. 2010. Energy utilization in pigs selected for high and low residual feed intake. *Journal of Animal Science*, 88:2062-2072.
- Barea, R., Nieto, R., Vitari, F., Domeneghini, C., Aguilera, J. F. 2011. Effects of pig genotype (Iberian v. Landrace x Large White) on nutrient digestibility, relative organ weight and small intestine structure at two stages of growth. *Animal*, 5:547-557.
- Barrero, M. J., Alho, C. S., Ortiz, J. A., Hegardt, F. G., Haro, D., Marrero, P. F. 2001. Low activity of mitochondrial HMG-CoA synthase in liver of starved piglets is due to low levels of protein despite high mRNA levels. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 385:364-371.



DISCUSIÓN GENERAL



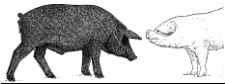
- Bauchart-Thevret, C., Stoll, B., Burrin, D. G. 2009. Intestinal metabolism of sulfur amino acids. *Nutrition research reviews*, 22:175-187.
- Berschauer, F., Close, W. H., Stephens, D. B. 1983. The influence of protein: energy value of the ration and level of feed intake on the energy and nitrogen metabolism of the growing pig. *British Journal of Nutrition*, 49:271-283.
- Boisen, S., Moughan, P. J. 1996. Dietary influences on endogenous ileal protein and amino acid loss in the pig—a review. *Acta Agriculturae Scandinavica A-Animal Sciences*, 46:154-164.
- Brameld, J. M. 1997. Molecular mechanisms involved in the nutritional and hormonal regulation of growth in pigs. *Proceedings of the Nutrition Society*, 56:607-619.
- Brown-Brandl, T. M., Eigenberg, R. A., Nienaber, J. A., Kachman, S. D. 2001. Thermoregulatory profile of a newer genetic line of pigs. *Livestock Production Science*, 71:253-260.
- Bruins, M. J., Soeters, P. B., Deutz, N. E. P. 2000. Endotoxemia affects organ protein metabolism differently during prolonged feeding in pigs. *Journal of Nutrition*, 130:3003-3013.
- BSAS, British Society of Animal Science. 2003. Nutrient requirement standards for pigs. BSAS, Penicuik, United Kingdom.
- Buonomo, F. C., Lauterio, T. J., Baile, C. A., Campion, D. R. 1987. Determination of insulin-like growth factor 1 (IGF1) and IGF binding protein levels in swine. *Domestic Animal Endocrinology*, 4:23-31.
- Burrin, D. G., Davis, T. A., Ebner, S., Schoknecht, P. A., Fiorotto, M. L., Reeds, P. J. 1997. Colostrum enhances the nutritional stimulation of vital organ protein synthesis in neonatal pigs. *The Journal of Nutrition*, 127:1284-1289.
- Burrin, D. G., Davis, T. A., Fiorotto, M. L., Reeds, P. J. 1992. Hepatic protein synthesis in suckling rats: effects of stage of development and fasting. *Pediatric Research*, 31:247-252.
- Burrin, D. G., Ferrell, C. L., Eisemann, J. H., Britton, R. A., Nienaber, J. A. 1989. Effect of level of nutrition on splanchnic blood flow and oxygen consumption in sheep. *British Journal of Nutrition*, 62:23-34.
- Butler, A. A., Roith, D. L. 2001. Control of Growth by the Somatotropic Axis: Growth Hormone and the Insulin-Like Growth Factors Have Related and Independent Roles 1. *Annual Review of Physiology*, 63:141-164.



DISCUSIÓN GENERAL



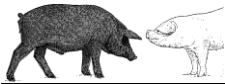
- Cadorniga-Valiño, C., Grummer, R. R., Armentano, L. E., Donkin, S. S., Bertics, S. J. 1997. Effects of fatty acids and hormones on fatty acid metabolism and gluconeogenesis in bovine hepatocytes. *Journal of Dairy Science*, 80:646-656.
- Calder, P. C., Bond, J. A., Harvey, D. J., Gordon, S., Newsholme, E. A. 1990. Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. *Biochemical Journal*, 269:807-814.
- Carey, G. B., Cheung, C. W., Cohen, N. S., Brusilow, S., Rajjman, L. 1993. Regulation of urea and citrulline synthesis under physiological conditions. *Biochemical Journal*, 292:241-247.
- Chen, L., Li, P., Wang, J., Li, X., Gao, H., Yin, Y., Wu, G. 2009. Catabolism of nutritionally essential amino acids in developing porcine enterocytes. *Amino acids*, 37:143-152.
- Chevalier, L., Bos, C., Azzout-Marniche, D., Dardevet, D., Tomé, D., Gaudichon, C. 2010. Dietary protein regulates hepatic constitutive protein anabolism in rats in a dose-dependent manner and independently of energy nutrient composition. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 299:1720-1730.
- Chwalibog, A., Tauson, A. H., Thorbek, G. 2004. Energy metabolism and substrate oxidation in pigs during feeding, starvation and re-feeding. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 88:101-112.
- Coma, J., Zimmerman, D. R., Carrion, D. 1995. Relationship of rate of lean tissue growth and other factors to concentration of urea in plasma of pigs. *Journal of Animal Science*, 73:3649-3656.
- Conde-Aguilera, J. A., Lachica, M., Nieto, R., Fernández-Figares, I. 2012. Metabolic regulation of fatty acid esterification and effects of conjugated linoleic acid on glucose homeostasis in pig hepatocytes. *Animal*, 6:254-261.
- Connell, A., Calder, A. G., Anderson, S. E. 1997. Hepatic protein synthesis in the sheep: effect of intake as by use of stable-isotope-labelled glycine, leucine and phenylalanine. *British Journal of Nutrition*, 77:255-271.
- Darcy-Vrillon, B., Cherbuy, C., Morel, M. T., Durand, M., Duée, P. H. 1996. Short chain fatty acid and glucose metabolism in isolated pig colonocytes: modulation by NH₄⁺. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 156:145-151.
- Davis, T. A., Fiorotto, M. L., Beckett, P. R., Burrin, D. G., Reeds, P. J., Wray-Cahen, D., Nguyen, H. V. 2001. Differential effects of insulin on peripheral and visceral tissue protein synthesis in neonatal pigs. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 280:E770-E779.



DISCUSIÓN GENERAL



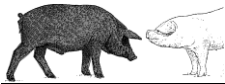
- Dimitriadis G, Parry-Billings, M, Bevan S, Dunger D, Piva T, Krause U, Wegener G Newsholme, E. A. 1992. Effects of insulin-like growth factor I on the rates of glucose transport and utilization in rat skeletal muscle in vitro. *The Biochemical Journal*, 285:269–274.
- Duée, P. H., Pégorier, J. P., Quant, P. A., Herbin, C., Kohl, C., Girard, J. 1994. Hepatic ketogenesis in newborn pigs is limited by low mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase activity. *Biochemical Journal*, 298:207–212.
- Ebner, S., Schoknecht, P., Reeds, P., Burrin, D. 1994. Growth and metabolism of gastrointestinal and skeletal muscle tissues in protein-malnourished neonatal pigs. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 266:1736-1743.
- Ellis, P. R., Roberts, F. G., Low, A. G., Morgan, L. M. 1995. The effect of high-molecular-weight guar gum on net apparent glucose absorption and net apparent insulin and gastric inhibitory polypeptide production in the growing pig: relationship to rheological changes in jejunal digesta. *British Journal of Nutrition*, 74:539-556.
- Fabian, J., Chiba, L. I., Kuhlers, D. L., Frobish, L. T., Nadarajah, K., McElhenney, W. H. 2003. Growth performance, dry matter and nitrogen digestibilities, serum profile, and carcass and meat quality of pigs with distinct genotypes. *Journal of Animal Science*, 81:1142-1149.
- Fara, J. W. 1984. Postprandial mesenteric hyperemia. *Physiology of the Intestinal Circulation*, 99-106.
- Farmer, C., Palin, M. F., Sorensen, M. T. 2000. Mammary gland development and hormone levels in pregnant Upton-Meishan and Large White gilts. *Domestic animal endocrinology*, 18;241.
- Fenton, J. P., Roehrig, K. L., Mahan, D. C., Corley, J. R. 1985. Effect of swine weaning age on body fat and lipogenic activity in liver and adipose tissue. *Journal of Animal Science*, 60:190-199.
- Fernández-Figares, I., Lachica, M., Martín, A., Nieto, R., González-Valero, L., Rodríguez-López, J. M., Aguilera, J. F. 2012. Impact of dietary betaine and conjugated linoleic acid on insulin sensitivity, protein and fat metabolism of obese pigs. *Animal: an International Journal of Animal Bioscience*, 6:1058–1067.
- Fernandez-Figares, I., Lachica, M., Nieto, R., Rivera-Ferre, M. G., Aguilera, J. F. 2007. Serum profile of metabolites and hormones in obese Iberian and lean Landrace growing gilts fed balanced or lysine deficient diets. *Livestock Science*, 110:73-81.
- Fernández-Figares, I., Shannon, A. E., Wray-Cahen, D., Caperna, T. J. 2004. The role of insulin, glucagon, dexamethasone, and leptin in the regulation of ketogenesis and glycogen storage in primary cultures of porcine hepatocytes prepared from 60 kg pigs. *Domestic Animal Endocrinology*, 272, 125-140.



DISCUSIÓN GENERAL



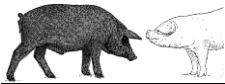
- Ferrell, C. L. 1988. Contribution of visceral organs to animal energy expenditures. *Journal of Animal Science*, 66:23-34.
- Ferrell, C. L., Koong, L. J., Nienaber, J. A. 1986. Effect of previous nutrition on body composition and maintenance energy costs of growing lambs. *British Journal of Nutrition*, 56:595-605.
- Fevrier, C., Bourdon, D., Aumaitre, A., Peinau, J., Lebreton, Y., Jaguelin, Y., Meziere, N., Blanchard, A. 1988. Digestive capacity of the Chinese pig – Effect of dietary fibre on digestibility and intestinal and pancreatic enzymes. Pages 172-179 in *Proc. of IV Int. Seminar of Digestive Physiology in Pigs*, Jablona, Poland.
- Frystyk, J., Skjaerbaek, C., Vestbo, E., Fisker, S., Ørskov, H. 1999. Circulating levels of free insulin-like growth factors in obese subjects: the impact of type 2 diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 15:314-322.
- Galián Jiménez, M. 2007. Características de la canal y calidad de la carne, composición mineral y lipídica del cerdo Chato Murciano y su cruce con Ibérico. Efecto del sistema de manejo. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia, España.
- Giaccari, A., Rossetti, L. 1992. Predominant role of gluconeogenesis in the hepatic glycogen repletion of diabetic rats. *Journal of Clinical Investigation*, 89:36.
- Giuffra, E., Kijas, J. M. H., Amarger, V., Carlborg, Ö., Jeon J. T., Andersson, L. 2000. The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics*, 154:1785-1791.
- Go, G., Wu, G., Silvey, D. T., Choi, S., Li, X., Smith, S. B. 2012. Lipid metabolism in pigs fed supplemental conjugated linoleic acid and/or dietary arginine. *Amino acids*, 43:1713-1726.
- Gomez-Brenes, R. A., Jarquin, R., Gonzalez, J. M., Bressani, R. 1974. Comparación del cerdo criollo y Duroc Jersey en cuanto a crecimiento y utilización del alimento. Turrialba.
- Gondret, F., Ferré, P., Dugail, I. 2001. ADD-1/SREBP-1 is a major determinant of tissue differential lipogenic capacity in mammalian and avian species. *Journal of Lipid Research*, 42:106.
- Granger, D. N., Richardson, P. D. I., Kviety, P. R., Mortillaro, N. A. 1980. Intestinal blood flow. *Gastroenterology*, 78:837-863.
- Guarner, F. 2007. Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutrición Hospitalaria*, 22:4-19.



DISCUSIÓN GENERAL



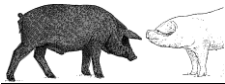
- Gudmundsson, F. F., Gislason, H. G., Dicko, A., Horn, A., Viste, A., Grong, K., Svanes, K. 2001. Effects of prolonged increased intra-abdominal pressure on gastrointestinal blood flow in pigs. *Surgical Endoscopy*, 15:854-860.
- Gustafsson, M., Jensen, P., de Jonge, F. H., Schuurman, T. 1999. Domestication effects on foraging strategies in pigs *Sus scrofa*. *Applied Animal Behaviour Science*, 62:305-317.
- Hansen, J. A., Yen, J. T., Nelssen, J. L., Nienaber, J. A., Goodband, R. D., Wheeler, T. L. 1997. Effects of somatotropin and salbutamol in three genotypes of finishing barrows: growth, carcass, and calorimeter criteria. *Journal of Animal Science*, 75:1798-1809.
- Henken, A. M., van der Hel, W., Brandsma, H. A., Verstegen, M. W. 1991. Difference in energy metabolism and protein retention of limit-fed growing pigs of several breeds. *Journal of Animal Science*, 69:1443-1453.
- Hooda, S., Matte, J. J., Wilkinson, C. W., Zijlstra, R. T. 2009. Technical note: An improved surgical model for the long-term studies of kinetics and quantification of nutrient absorption in swine. *Journal of Animal Science*, 87:2013-2019.
- Hsu, C. J., Kimball, S. R., Antonetti, D. A., Jefferson, L. S. 1992. Effects of insulin on total RNA, poly A+ RNA, and mRNA in primary cultures of rat hepatocytes. *The American Journal of Physiology*, 263:1106-1112.
- Huntington, G. 1984. Relationship of portal blood flow to metabolizable energy intake of cattle. *Canadian Journal of Animal Science*, 64:16-17.
- Jefferson, L. S., Liao, W. S., Peavy, D. E., Miller, T. B., Appel, M. C., Taylor, J. M. 1983. Diabetes-induced alterations in liver protein synthesis. Changes in the relative abundance of mRNAs for albumin and other plasma proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 258:1369-1375.
- Jensen, M. D., Johnson, C. M., Cryer, P. E., Murray, M. J. 1995. Thermogenesis after a mixed meal: role of leg and splanchnic tissues in men and women. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 268:433-438.
- Jones, J. I., Clemmons, D. R. 1995. Insulin-Like Growth Factors and Their Binding Proteins: Biological Actions*. *Endocrine Reviews*, 16:3-34.
- Jørgensen, H., Zhao, X. Q., Eggum, B. O. 1996. The influence of dietary fibre and environmental temperature on the development of the gastrointestinal tract, digestibility, degree of fermentation in the hind-gut and energy metabolism in pigs. *British Journal of Nutrition*, 75:365-378.



DISCUSIÓN GENERAL



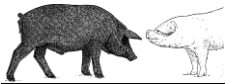
- Jørgensen, H., Zhao, X. Q. 1997. Influence of environmental temperature on in vivo energy expenditure and in vitro ouabain-sensitive respiration in duodenal mucosa and liver in rats fed different levels of dietary fibre or protein. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 36:278-284.
- Kasser, T. R., Martin, R. J., Gahagan, J. H., Wangsness, P. J. 1981. Fasting plasma hormones and metabolites in feral and domestic newborn pigs. *Journal of Animal Science*, 53:420-426.
- Katz, J., Kuwajima, M., Foster, D. W., Denis McGarry, J. 1986. The glucose paradox: new perspectives on hepatic carbohydrate metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 11:136-140.
- Katz, J., McGarry, J. D. 1984. The glucose paradox. Is glucose a substrate for liver metabolism?. *Journal of Clinical Investigation*, 74:1901.
- Kemp, B., den Hartog, L. A., Klok, J. J., Zandstra, T. 1991. The digestibility of nutrients, energy and nitrogen in the Meishan and Dutch Landrace pig. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 65:263-266.
- Kimball, S. R., Horetsky, R. L., Jefferson, L. S. 1995. Hormonal regulation of albumin gene expression in primary cultures of rat hepatocytes. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 268:E6-E14.
- Koong, L. J., Ferrell, C. L., Nienaber, J. A. 1985. Assessment of interrelationships among levels of intake and production, organ size and fasting heat production in growing animals. *The Journal of Nutrition*, 115:1383-1390.
- Koong, L. J., Nienaber, J. A., Pekas, J. C., Yen, J. T. 1982. Effects of plane of nutrition on organ size and fasting heat production in pigs. *The Journal of Nutrition*, 112:1638-1642.
- Koong, L. J., Nienaber, J. A., Mersmann, H. J. 1983. Effects of plane of nutrition on organ size and fasting heat production in genetically obese and lean pigs. *The Journal of Nutrition*, 113:1626-1631.
- Lachica, M., Aguilera, J. F. 2000. Estimation of the energy costs of locomotion in the Iberian pig (*Sus mediterraneus*). *British Journal of Nutrition*, 83:35-41.
- Langsch, A., Giri, S., Acikgöz, A., Jasmund, I., Frericks, B., Bader, A. 2009. Interspecies difference in liver-specific functions and biotransformation of testosterone of primary rat, porcine and human hepatocyte in an organotypical sandwich culture. *Toxicology Letters*, 188:173-179.
- Lapierre, H., Bernier, J. F., Dubreuil, P., Reynolds, C. K., Farmer, C., Ouellet, D. R., Lobley, G. E. 2000. The effect of feed intake level on splanchnic metabolism in growing beef steers. *Journal of Animal Science*, 78:1084-1099.



DISCUSIÓN GENERAL



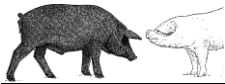
- Laplace, J. P., Souffrant, W. B., Hennig, U., Chabeauti, E.,Fevrier, C. 1994. Measurement of precaecal dietary protein and plant cell wall digestion in pigs; comparison of four surgical procedures for ileorectal anastomosis. *Livestock Production Science*, 40:313-328.
- Lenis, N. P., Bikker, P., van der Meulen, J., Van Diepen, J. T., Bakker, J. G., Jongbloed, A. W. 1996. Effect of dietary neutral detergent fiber on ileal digestibility and portal flux of nitrogen and amino acids and on nitrogen utilization in growing pigs. *Journal of Animal Science*, 74:2687-2699.
- Lin, X., Adams, S. H., Odle, J. 1996. Acetate represents a major product of heptanoate and octanoate beta-oxidation in hepatocytes isolated from neonatal piglets. *Biochemical Journal*, 318: 235–240
- Lin, X., Shim, K., Odle, J. 2010. Carnitine palmitoyltransferase I control of acetogenesis, the major pathway of fatty acid β -oxidation in liver of neonatal swine. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 298:1435-1443.
- Lomax, M. A., Baird, G. D. 1983. Blood flow and nutrient exchange across the liver and gut of the dairy cow. *British Journal of Nutrition*, 49:481-496.
- Louveau, I., Bonneau, M., Salter, D. N. 1991. Age-related changes in plasma porcine growth hormone GH profiles and insulin-like growth factor-I IGF-I concentrations in Large White and Meishan pigs. *Reproduction Nutrition Development*, 31:205-216.
- Martin, R. J., Herbein, J. H. 1976. A comparison of the enzyme levels and the in vitro utilization of various substrates for lipogenesis in pair-fed lean and obese pigs. *Experimental Biology and Medicine*, 151: 231-235.
- McGarry, J. D., Kuwajima, M., Newgard, C. B., Foster, D. W., Katz, J. 1987. From dietary glucose to liver glycogen: the full circle round. *Annual Review of Nutrition*, 7:51-7.
- Mejia-Guadarrama, C. A., Pasquier, A., Dourmad, J. Y., Prunier, A., Quesnel, H. 2002. Protein lysine restriction in primiparous lactating sows: Effects on metabolic state, somatotropic axis, and reproductive performance after weaning. *Journal of Animal Science*, 80:3286-3300.
- Mersmann, H. J., Pond, W. G., Yen, J. T. 1984. Use of carbohydrate and fat as energy source by obese and lean swine. *Journal of Animal Science*, 58:894-902.
- Mosoni, L., Malmezat, T., Valluy, M. C., Houlier, M. L., Mirand, P. P. 1996. Muscle and liver protein synthesis adapt efficiently to food deprivation and refeeding in 12-month-old rats. *The Journal of Nutrition*, 126:516-522.



DISCUSIÓN GENERAL



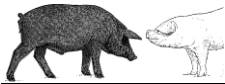
- Müller, M. J., Paschen, U., Seitz, H. J. 1982. Starvation-induced ketone body production in the conscious unrestrained miniature pig. *The Journal of Nutrition*, 112:1379.
- Neel, J. V. 1962. Diabetes mellitus: a “thrifty” genotype rendered detrimental by “progress”? *American Journal of Human Genetics*, 14:353.
- Nicot, C., Hegardt, F. G., Woldegiorgis, G., Haro, D., Marrero, P. F. 2001. Pig liver carnitine palmitoyltransferase I, with low Km for carnitine and high sensitivity to malonyl-CoA inhibition, is a natural chimera of rat liver and muscle enzymes. *Biochemistry*, 40:2260.
- Nicot, C., Relat, J., Woldegiorgis, G., Haro, D., Marrero, P. F. 2002. Pig liver carnitine palmitoyltransferase chimera studies show that both the N-and C-terminal regions of the enzyme are important for the unusual high malonyl-CoA sensitivity. *Journal of Biological Chemistry*, 277:10044-10049.
- Nieto, R., Lara, L., Barea, R., García-Valverde, R., Aguinaga, M. A., Conde-Aguilera, J. A., Aguilera, J. F. 2012. Response analysis of the Iberian pig growing from birth to 150 kg body weight to changes in protein and energy supply. *Journal of Animal Science*, 90:3809-3820.
- Nieto, R., Lara, L., Barea, R., García-Valverde, R., Aguinaga, M. A., Conde-Aguilera, J. A., Aguilera, J. F. 2012. Response analysis of the Iberian pig growing from birth to 150 kg body weight to changes in protein and energy supply. *Journal of Animal Science*, 9011, 3809-3820.
- Nieto, R., Lara, L., García, M. A., Gómez, F., Zalvide, M., Cruz, M., Aguilera, J. F. 2001. Evaluation of an integrated feeding system in the Iberian pig. Study of food consumption and productive parameters. *Sólo Cerdo Ibérico*, 6:57-69.
- Nieto, R., Miranda, A., García, M. A., Aguilera, J. F. 2002. The effect of dietary protein content and feeding level on the rate of protein deposition and energy utilization in growing Iberian pigs from 15 to 50kg body weight. *British Journal of Nutrition*, 88:39-49.
- Noblet, J., Henry, Y., Dubois, S. 1987. Effect of protein and lysine levels in the diet on body gain composition and energy utilization in growing pigs. *Journal of Animal Science*, 65:717-726.
- Nyachoti, C. M., Lange, C. D., McBride, B. W., Schulze, H. 1997. Significance of endogenous gut nitrogen losses in the nutrition of growing pigs: A review. *Canadian Journal of Animal Science*, 77:149-163.
- Pégorier, J. P., Duée, P. H., Assan, R., Peret, J., Girard, J. 1981. Changes in circulating fuels, pancreatic hormones and liver glycogen concentration in fasting or suckling newborn pigs. *Journal of Developmental Physiology*, 3:203-217.



DISCUSIÓN GENERAL



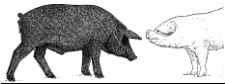
- Pégorier, J. P., Duee, P. H., Girard, J., Peret, J. 1982. Development of gluconeogenesis in isolated hepatocytes from fasting or suckling newborn pigs. *The Journal of Nutrition*, 112:1038-1046.
- Pond, W. G., Yen, J. T., Lindvall, R. N., Hill, D. 1980. Dietary alfalfa meal for genetically obese and lean growing pigs: effect on body weight gain and on carcass and gastrointestinal tract measurements and blood metabolites. *Journal of Animal Science*, 51:367-373.
- Priore, P., Giudetti, A. M., Natali, F., Gnoni, G. V., Geelen, M. J. 2007. Metabolism and short-term metabolic effects of conjugated linoleic acids in rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771:1299.
- Proietto, J., Thorburn, A. W. 1994. 2 Animal models of obesity—theories of aetiology. *Baillière's Clinical Endocrinology and Metabolism*, 8:509-525.
- Ramsay, T. G., Richards, M. P., Li, C. J., Caperna, T. J. 2010. IGF-I mediated inhibition of leptin receptor expression in porcine hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 155:43-48.
- Rao, D. S., McCracken, K. J. 1990. Effect of protein intake on energy and nitrogen balance and chemical composition of gain in growing boars of high genetic potential. *Animal Production*, 51:389-397.
- Redlich, J., Souffrant, W. B., Laplace, J. P., Hennig, U., Berg, R., Mouwen, J. M. 1997. Morphometry of the small intestine in pigs with ileo-rectal anastomosis. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 61:21-27
- Rérat, A., Vaissade, P. 1993. Relations entre la prise alimentaire et la consommation d'oxygène des organes drainés par la veine porte chez le porc éveillé. *Reproduction Nutrition Development*, 33:235-251.
- Reverter, M., Lundh, T., Gonda, H. L., Lindberg, J. E. 2000. Portal net appearance of amino acids in growing pigs fed a barley-based diet with inclusion of three different forage meals. *British Journal of Nutrition*, 84:483-494.
- Rey, A.I. y López-Bote, C. 2000. *Journal of Animal Physiology Animal Nutrition*. Citado por López Bote C., Fructuoso G. y Mateos, G. G. 2000. Sistemas de producción porcina y calidad de la carne. El cerdo Ibérico. XVI Curso de Especialización FEDNA. Avances en Nutrición y Alimentación Animal. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.
- Riedijk, M. A., Stoll, B., Chacko, S., Schierbeek, H., Sunehag, A. L., van Goudoever, J. B., Burrin, D. G. 2007. Methionine transmethylation and transsulfuration in the piglet gastrointestinal tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104:3408-3413.



DISCUSIÓN GENERAL



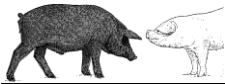
- Rivera-Ferre, M. G., Aguilera, J. F., Nieto, R. 2005. Muscle fractional protein synthesis is higher in Iberian than in Landrace growing pigs fed adequate or lysine-deficient diets. *The Journal of Nutrition*, 135:469-478.
- Rivera-Ferre, M. G., Aguilera, J. F., Nieto, R. 2006. Differences in whole-body protein turnover between Iberian and Landrace pigs fed adequate or lysine-deficient diets. *Journal of Animal Science*, 84:3346-3355.
- Robert, S., Dancosse, J., Dallaire, A. 1987. Some observations on the role of environment and genetics in behaviour of wild and domestic forms of *Sus scrofa* (European wild boars and domestic pigs). *Applied Animal Behaviour Science*, 17:253-262.
- Rodríguez-López JM, González-Valero L, Lachica M and Fernández-Fígares I 2010b. Heat production of portal drain viscera (PDV) relative to the total in Iberian vs. Landrace gilts. In *Proceedings of the 7th International Symposium on Mediterranean Pig* (ed E de Pedro), p. 52. University of Córdoba, Córdoba, Spain.
- Rodríguez-López JM, González-Valero L, Lachica M and Fernández-Fígares I 2013. Growth hormone releasing factor and secretion of growth hormone in Iberian and Landrace gilts. In *Energy and protein metabolism and nutrition in sustainable animal production* eds. J.W. Oltjen, E. Kebreab and H. Lapierre, EAA P publication. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands. 134:293-294
- Rodríguez-López, J. M., Lachica, M., González-Valero, L., Fernández-Fígares, I. 2010a. Energy expenditure of splanchnic tissues in Iberian and Landrace growing gilts. *Livestock Science*, 133:61-63.
- Schrama, J. W., Verstegen, M. W., Verboeket, P. H., Schutte, J. B., Haaksma, J. 1996. Energy metabolism in relation to physical activity in growing pigs as affected by type of dietary carbohydrate. *Journal of Animal Science*, 74:2220-2225.
- Serra, X., Gil, F., Pérez-Enciso, M., Oliver, M. A., Vázquez, J. M., Gispert, M., Noguera, J. L. 1998. A comparison of carcass, meat quality and histochemical characteristics of Iberian Guadyerbas line and Landrace pigs. *Livestock Production Science*, 56:215-223.
- Seve, B., Reeds, P. J., Fuller, M. F., Cadenhead, A., Hay, S. M. 1985. Protein synthesis and retention in some tissues of the young pig as influenced by dietary protein intake after early-weaning. Possible connection to the energy metabolism. *Reproduction, Nutrition, Development*, 26:849-861.
- Simoes-Nunes, C., Galibois, I., Rérat, A., Savoie, L., Vaugelade, P. 1991. Hepatic and portal-drained viscera balances of amino acids, insulin, glucagon and gastrin in the pig after ingestion of casein or rapeseed proteins. *Reproduction Nutrition Development*, 31:217-231
- Steele, N. C., Rosebrough, R. W., McMurtry, J. P. 1984. Fetal hepatic and neural substrate utilization as affected by induced nutritional ketosis in swine. *Journal of Animal Science*, 58:1388-1395.



DISCUSIÓN GENERAL



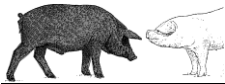
- Stoll, B., Henry, J., Reeds, P. J., Yu, H., Jahoor, F., Burrin, D. G. 1998. Catabolism dominates the first-pass intestinal metabolism of dietary essential amino acids in milk protein-fed piglets. *The Journal of Nutrition*, 128:606-614
- Strang, B. D., Bertics, S. J., Grummer, R. R., Armentano, L. E. 1998. Relationship of triglyceride accumulation to insulin clearance and hormonal responsiveness in bovine hepatocytes. *Journal of Dairy Science*, 81:740-747.
- Summerskill, W. H., Wolpert, E. 1970. Ammonia metabolism in the gut. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 23:633-639.
- Sundstøl, F., Standal, N., Vangen, O. 1979. Energy metabolism in lines of pigs selected for thickness of backfat and rate of gain. *Acta Agriculturae Scandinavica*, 29:337-345.
- Suryawan, A., O'Connor, P. M., Bush, J. A., Nguyen, H. V., Davis, T. A. 2009. Differential regulation of protein synthesis by amino acids and insulin in peripheral and visceral tissues of neonatal pigs. *Amino acids*, 37:97-104.
- Ten Have, G. A., Bost, M. C., Suyk-Wierds, J. C., van den Bogard, A. E., Deutz, N. E. 1996. Simultaneous measurement of metabolic flux in portally-drained viscera, liver, spleen, kidney and hindquarter in the conscious pig. *Laboratory Animals*, 30:347-358.
- Tess, M. W., Dickerson, G. E., Nienaber, J. A., Ferrell, C. L. 1984b. The effects of body composition on fasting heat production in pigs. *Journal of Animal Science*, 58:99-110.
- Tess, M. W., Dickerson, G. E., Nienaber, J. A., Yen, J. T., Ferrell, C. L. 1984a. Energy costs of protein and fat deposition in pigs fed ad libitum. *Journal of Animal Science*, 58:111-122.
- Thein, E., Becker, M., Anetzberger, H., Hammer, C., Messmer, K. 2003. Direct assessment and distribution of regional portal blood flow in the pig by means of fluorescent microspheres. *Journal of Applied Physiology*, 95:1808-1816.
- Tomas, F. M., Knowles, S. E., Owens, P. C., Chandler, C. S., Francis, G. L., Read, L. C., Ballard, F. J. 1992. Insulin-like growth factor-I IGF-I and especially IGF-I variants are anabolic in dexamethasone-treated rats. *The Biochemical Journal*, 282:91-97.
- Toro, M. A., Rodríguez, J., Silio, L., Rodríguez, C. 2000. Genealogical analysis of a closed herd of black hairless Iberian pigs. *Conservation Biology*, 14:1843-1851.



DISCUSIÓN GENERAL



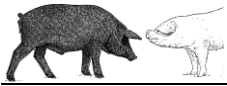
- Torrallardona, D., Harris, C. I., Fuller, M. F. 2003. Pigs' gastrointestinal microflora provide them with essential amino acids. *The Journal of Nutrition*, 133:1127-1131.
- van der Meulen, J., Bakker, G. C., Bakker, J. G., De Visser, H., Jongbloed, A. W., Everts, H. 1997. Effect of resistant starch on net portal-drained viscera flux of glucose, volatile fatty acids, urea, and ammonia in growing pigs. *Journal of Animal Science*, 75:2697-2704.
- van Goudoever, J. B., Stoll, B., Henry, J. F., Burrin, D. G., Reeds, P. J. 2000. Adaptive regulation of intestinal lysine metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97:11620-11625.
- van Milgen, J., Bernier, J. F., Lecozler, Y., Dubois, S., Noblet, J. 1998. Major determinants of fasting heat production and energetic cost of activity in growing pigs of different body weight and breed/castration combination. *British Journal of Nutrition*, 79:509-517.
- van Milgen, J., Noblet, J. 2003. Partitioning of energy intake to heat, protein, and fat in growing pigs. *Journal of Animal Science*, 81:86-93.
- Vons, C., Pégorier, J. P., Girard, J., Kohl, C., Ivanov, M. A., Franco, D. 1991. Regulation of fatty-acid metabolism by pancreatic hormones in cultured human hepatocytes. *Hepatology*, 13:1126-1130.
- Wang J, Zhu X, Chen C, Li X, Gao Y, Li P, Zhang Y, Long M, Wang Z Liu, G. 2012. Effect of insulin-like growth factor-1 IGF-I on the gluconeogenesis in calf hepatocytes cultured in vitro. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 362:87-91.
- Wangsness, P. J., Acker, W. A., Burdette, J. H., Krabill, L. F., Vasilatos, R. 1981. Effect of fasting on hormones and metabolites in plasma of fast-growing, lean and slow-growing obese pigs. *Journal of Animal Science*, 52:69.
- Weiler, U., Claus, R., Schnoebelen-Combes, S., Louveau, I. 1998. Influence of age and genotype on endocrine parameters and growth performance: a comparative study in Wild boars, Meishan and Large White boars. *Livestock Production Science*, 54:21-31.
- Wheelhouse, N. M., Stubbs, A. K., Lomax, M. A., MacRae, J. C., Hazlerigg, D. G. 1999. Growth hormone and amino acid supply interact synergistically to control insulin-like growth factor-I production and gene expression in cultured ovine hepatocytes. *Journal of Endocrinology*, 163:353-361.
- Witters, L. A., Trasko, C. S. 1979. Regulation of hepatic free fatty acid metabolism by glucagon and insulin. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 237:G23-G29.



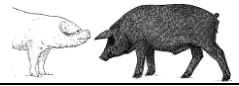
DISCUSIÓN GENERAL



- Yang, H., Pettigrew, J.E., Johnston, L.J., Shurson, G.C., Wheaton, J.E., White, M.E., Koketsu, Y., Sower, A.F., Rathmacher, J. A. 2000. Effects of dietary lysine intake during lactation on blood metabolites, hormones, and reproductive performance in primiparous sows. *Journal of Animal Science*, 78:1001-1009.
- Yen, J. T. 1997. Oxygen consumption and energy flux of porcine splanchnic tissues. In *Digestive physiology in pigs: proceedings of the VIth International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*.
- Yen, J. T., Kerr, B. J., Easter, R. A., Parkhurst, A. M. 2004a. Difference in rates of net portal absorption between crystalline and protein-bound lysine and threonine in growing pigs fed once daily. *Journal of Animal Science*, 82:1079-1090.
- Yen, J. T., Nienaber, J. A., Hill, D. A., Pond, W. G. 1989. Oxygen consumption by portal vein-drained organs and by whole animal in conscious growing swine. *Experimental Biology and Medicine*, 190:393-398.
- Yen, J. T., Varel, V. H., Nienaber, J. A. 2004b. Metabolic and microbial responses in western crossbred and Meishan growing pigs fed a high-fiber diet. *Journal of Animal Science*, 82:1740-1755.
- Yen, J. T., Killefer, J. 1987. A method for chronically quantifying net absorption of nutrients and gut metabolites into hepatic portal vein in conscious swine. *Journal of Animal Science*, 64:923-934.
- Yen, J. T., Nienaber, J. A. 1992. Influence of carbadox on fasting oxygen consumption by portal vein-drained organs and by the whole animal in growing pigs. *Journal of Animal Science*, 70:478-483.
- Yen, J. T., Nienaber, J. A. 1993. Effects of high-copper feeding on portal ammonia absorption and on oxygen consumption by portal vein-drained organs and by the whole animal in growing pigs. *Journal of Animal Science*, 71:2157-2163.
- Yki-Jarvinen, H., Helve, E., Sane, T., Nurjhan, N., Taskinen, M. R. 1989. Insulin inhibition of overnight glucose production and gluconeogenesis from lactate in NIDDM. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 256:732-739.
- Zapf, J., Froesch, E. R. 1986. Insulin-like growth factors/somatomedins: structure, secretion, biological actions and physiological role. *Hormone Research in Paediatrics*, 24:121-130.

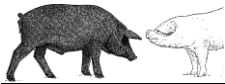


DISCUSIÓN GENERAL



CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS



6.1. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral permiten establecer las siguientes conclusiones:

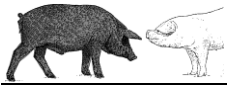
1/ Los cerdos Ibéricos tienen menor FSP y producción de calor de las VDP que los Landrace. Así mismo, su producción de calor total postprandial fue mayor, lo que indica que son animales energéticamente más ineficientes. En consecuencia, la contribución a la producción de calor total de las VDP fue menor. De esto se desprende que la producción de calor de las VDP no sería una de las causas de la ineficiencia energética de los cerdos Ibéricos respecto a los Landrace, contrariamente a nuestra hipótesis inicial.

2/ En las VDP no hubo diferencia en la absorción neta de lisina y metionina entre cerdos Ibéricos y Landrace. Ésta, se incrementó al hacerlo el contenido de PB de la dieta.

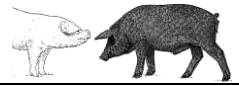
3/ Los hepatocitos de cerdos Ibéricos tienen mayor capacidad de GNG que los de Landrace, sin haber diferencias en degradación de glucógeno ni síntesis de β -hidroxibutirato. Sin embargo, el contenido de TG y la esterificación de AG fue menor en el Ibérico que en Landrace. También fueron menores la síntesis de urea y de IGF-I, lo que concuerda con su menor capacidad de crecimiento *in vivo*. En ambos genotipos, la esterificación de CLA fue mayor que la del ácido linoleico, lo que indica diferencias en las tasas de esterificación según la naturaleza del AG. El Ibérico presentó una mayor síntesis de albúmina, lo que puede tener implicaciones en el control de la presión oncótica, la capacidad antioxidante y anticoagulante, y en el transporte de metabolitos y drogas. De lo mencionado en esta conclusión se desprende la importancia de la herencia genética en los estudios hepáticos *in vitro*.

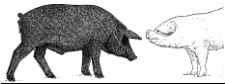
Conclusión general

Las diferencias metabólicas observadas a nivel de las VDP e hígado observadas en la presente Tesis contribuyen a explicar la divergencias en metabolismo proteico y energético en cerdos Ibéricos y Landrace puestas de manifiesto en estudios anteriores.



CONCLUSIONES





6.2. CONCLUSIONS

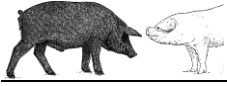
1/ Young Iberian have decreased portal blood flow and portal-drained viscera heat production (PDVHP) compared to Landrace pigs. Furthermore, whole body heat production was greater in Iberian compared to Landrace indicating a lower efficiency of energy utilization. As a consequence, relative contribution of portal-drained viscera to whole body heat production was decreased in Iberian compared to Landrace pigs, contrary to our hypothesis.

2/ No differences in methionine and lysine net portal absorption was found when Iberian and Landrace pigs were compared. On the other hand, net portal absorption of methionine and lysine was increased as dietary crude protein increased.

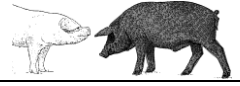
3/ Hepatocytes from Iberian have a greater capacity of gluconeogenesis than those from Landrace pigs, and no difference in glycogen degradation and β -hydroxybutyrate synthesis. Nevertheless triglyceride content, fatty acid esterification, urea and IGF-I synthesis was decreased in hepatocytes from Iberian compared to Landrace pigs in accordance with a low growth rate *in vivo* of Iberian pigs. Esterification of CLA was greater than esterification from linoleic acid in both breeds. Albumin synthesis was increased in Iberian compared to Landrace pig hepatocytes, which may have an impact in the control of oncotic pressure, antioxidant capacity and drug and metabolite transport.

General conclusion

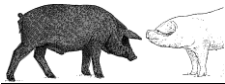
The metabolic differences observed in liver and portal-drained viscera in the present Thesis contribute to explain divergences in protein and energy metabolism in Iberian and Landrace pigs previously reported.



CONCLUSIONS



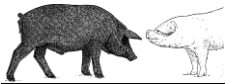
CAPÍTULO 7
RESUMEN/SUMMARY



7.1. RESUMEN

Existen importantes diferencias en actividad metabólica, utilización energética y capacidad de deposición de proteína y grasa cuando se compara al cerdo Ibérico con razas mejoradas. El cerdo Ibérico se caracteriza por presentar un perfil lipogénico, baja capacidad de deposición de proteína y un ritmo de crecimiento lento (Nieto et al., 2002; Barea et al., 2007). Sin embargo, los factores que determinan estos procesos siguen sin conocerse. A estas diferencias deben contribuir peculiaridades ligadas al genotipo, responsables de la actividad metabólica de los distintos tejidos y órganos y en particular, de los tejidos esplácnicos (tracto gastrointestinal, grasa mesentérica, páncreas, bazo e hígado). Si consideramos la ruta vascular que siguen los nutrientes ingeridos por el animal, los tejidos esplácnicos juegan un papel esencial en la distribución de nutrientes a los tejidos periféricos. En términos de metabolismo global, estos tejidos viscerales tienen una influencia desproporcionada respecto a sus masas y bajo ciertas circunstancias, sus elevadas tasas metabólicas pueden comprometer la disponibilidad neta de nutrientes en los tejidos periféricos de interés económico.

El primer experimento fue diseñado con el objetivo de evaluar la capacidad del tracto gastrointestinal para la absorción y el uso de aminoácidos. El objetivo fue analizar las diferencias entre los cerdos Ibéricos y Landrace en crecimiento en la ANP de lisina y metionina tras la ingestión de dietas con diferentes concentraciones de proteína (14,5 vs. 18,7% PB; dietas LCP y HCP respectivamente). Diferencias en la capacidad de absorción o uso de aminoácidos en el tracto gastrointestinal implicaría también diferencias en la cantidad de nutrientes disponibles para los

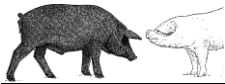


RESUMEN



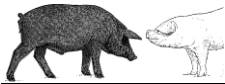
tejidos periféricos. Nuestra hipótesis inicial era que las diferencias en la ANP de lisina y metionina podrían explicar en parte la menor tasa de crecimiento en cerdos Ibéricos en comparación con las razas modernas. Para determinar la ANP de lisina y metionina, 12 cerdas, 6 Ibéricas y 6 Landrace (28 kg PV) fueron cateterizadas en arteria carótida, vena porta y vena ileal. Después de la recuperación de la cirugía, con el fin de medir el FSP se infundieron 15 ml de ácido PAH (2% peso/volumen) a través del catéter situado en la vena ileal, seguido de una infusión continua de 0,8 ml/min de ácido PAH. Las muestras de sangre de vena porta y arteria carótida fueron tomadas de forma simultánea -5 min, y 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 5 y 6 horas tras la ingestión del 0,25 de la ración diaria total de la dieta LCP (145 g PB/kg MS y 14.25 MJ de energía metabolizable (EM)/kg MS). Inmediatamente después de la toma de muestras, se midió la hemoglobina total y la sangre se centrifugó para la determinación del hematocrito y la obtención de plasma. El experimento se repitió tras 1 semana de adaptación a una dieta con elevado contenido proteico, dieta HCP (187 g PB/kg MS y 14,25 MJ de energía metabolizable (ME)/kg MS). La ANP de lisina fue mayor ($P < 0.05$) cuando los cerdos consumieron la dieta HCP que con la dieta LCP (23 vs. 15 mol/min); no se observó efecto de la raza. La ANP de metionina tendió a ser mayor ($P = 0,076$) para los cerdos alimentados con la dieta HCP que con la LCP (4.4 vs. 3,6 mol/min); tampoco se observó efecto de la raza. En conclusión, no existen diferencias en la aparición portal de lisina y metionina entre los cerdos Ibéricos y Landrace alimentados con dietas isoenergéticas de cebada (*Hordeum vulgare*)-soja (*Glycine max*) con baja y alta concentración en proteína.

El segundo experimento fue diseñado para determinar la contribución a la producción total de calor de las VDP en cerdas Ibéricas y Landrace en crecimiento. En este estudio se planteó la hipótesis de que una mayor producción de calor de las VDP en relación con la producción de calor total podría explicar en parte la baja eficiencia energética de la raza Ibérica en comparación con razas modernas. Para determinar la producción de calor de las VDP, la concentración de O_2 se midió en las muestras de sangre obtenidas de las cerdas multicateterizadas como se describió anteriormente. La producción de calor total se determinó a partir del consumo de O_2 y la producción de CO_2 , durante 6 horas tras la ingestión de un 0,25 de la ración diaria total de la misma dieta (187 g PB/kg MS y 14.25 MJ de energía metabolizable



(EM)/kg MS), usando cámaras respirometría. En comparación con Landrace, las cerdas Ibéricas tuvieron menor producción de calor de las VDP postprandial (3,25 vs. 4,17 $\text{kJ h}^{-1} \text{kg}^{-0.75}$; $P<0,05$), relación de producción de calor de las VDP/producción de calor total (9,6 vs. 13,5%), y una producción de calor total superior (33,7 vs. 30,8 $\text{kJ h}^{-1} \text{kg}^{-0.75}$). A pesar de la baja eficiencia y tasa de crecimiento energético del Ibérico en comparación con las razas modernas, su producción de calor de las VDP fue menor en las condiciones del presente estudio.

El objetivo del tercer experimento fue la determinación de diferencias en la actividad metabólica entre hepatocitos primarios aislados de cerdos Landrace e Ibéricos con el fin de explicar las diferencias encontradas *in vivo* en el perfil metabólico. Los hepatocitos se aislaron de cerdos Ibéricos ($n=10$) y Landrace ($n=8$) de pesos similares ($24,5\pm 12,1$ y $32,9\pm 6,1$ kg PV, respectivamente), mediante perfusión de colagenasa. Los hepatocitos se cultivaron durante 1 día en un medio que contenía suero bovino fetal y posteriormente éste fue sustituido por un medio libre de suero. Los hepatocitos se mantuvieron en William's E suplementado con β -mercaptoetanol (0,1 mM), glutamina (2 mM), antibióticos (gentamicina, penicilina, estreptomycin y anfotericina B), sulfóxido de dimetilo (1 g/ml), dexametasona (10⁻⁸ M), insulina (0,173 y 17,3 nM) y glucagón (0,287, 2,87 y 28,7 nM) durante 24-48 h. Fueron determinadas la GNG, la degradación del glucógeno, la síntesis de TG, la síntesis de β -hidroxibutirato, la síntesis de IGF-1, la albúmina y la síntesis de urea. Los cerdos Ibéricos tenían mayor capacidad de GNG que Landrace (24%, $P<0,05$), aunque no se encontraron diferencias en la degradación del glucógeno ($P>0,10$). Tanto el contenido de TG como la esterificación tendían a ser más bajos en los hepatocitos de Ibérico en comparación con los cerdos Landrace (12 y 31%, respectivamente, y $0,10<P<0,05$). Además, la adición de AG libres (CLA o ácido linoleico 0,2 mM) aumentó el contenido de TG (64%, $P<0,001$), aunque no se encontraron diferencias entre los AG. Cuando se compararon los AG libres, una tendencia hacia el aumento de esterificación (41%, $P=0,078$) se encontró para CLA. Aunque el glucagón estimula y la insulina inhibe la síntesis de β -hidroxibutirato, no se encontraron diferencias entre las razas ($P>0,10$). La síntesis de IGF-1 disminuyó en hepatocitos de Ibérico en comparación con los cerdos Landrace (16%, $P<0,05$). Por el contrario, la velocidad de la síntesis de albúmina fue mayor en Ibérico en

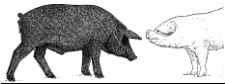


RESUMEN



comparación con los cerdos Landrace (58%, $P<0,05$). Por último, la capacidad de síntesis de urea fue inferior en los hepatocitos de Ibérico en comparación con los cerdos Landrace (86%, $P<0,05$). En conclusión, la herencia genética determina importantes diferencias en rutas del metabolismo energético y proteico encontradas en cultivos primarios de hepatocitos de cerdos magros y obesos.

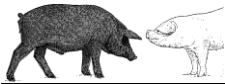
Los estudios que forman la presente Tesis proporcionan información única acerca de las diferencias metabólicas a nivel de los órganos que drenan al sistema porta e hígado entre cerdos Ibéricos y Landrace. Estos resultados representan una contribución a la caracterización fisiológica y metabólica del cerdo Ibérico para mejorar el uso de los recursos y en última instancia la eficiencia de la producción.



7.2. SUMMARY

There are important differences in terms of metabolic activity, energy utilization and capacity for protein and lipid deposition when Iberian and modern pigs are compared. It has been reported that the Iberian pigs have a lipogenic profile, lower protein deposition and growth rate compared to Landrace (Nieto et al., 2002; Barea et al., 2007). However, the factors that determine these processes remain unknown. The observed differences might be explained by genotypic differences related to the metabolic activity of different tissues, particularly the splanchnic tissues (gastrointestinal tract, mesenteric/omental fat, pancreas, spleen and liver). Considering the vascular route followed by ingested nutrients, the splanchnic tissues play an essential role in nutrient distribution to peripheral tissues. In terms of whole-body metabolism, visceral tissues have a disproportionate influence with respect to their masses and under certain circumstances their high metabolic rate may compromise nutrient availability to the tissues of economic interest.

The first experiment was designed with the aim of evaluating the gastrointestinal tract capacity of AA absorption and use. The objective was to analyze differences between Iberian and Landrace growing pigs on net portal appearance of lysine and methionine after feeding diets with low and high crude protein concentration (14,5 vs. 18,7% DM; LCP and HCP diets respectively). Differential capacity of AA absorption or use by the gastrointestinal tract would imply diverging amount of nutrients available to the peripheral tissues. We hypothesized that differences in net portal appearance of lysine and methionine might partially

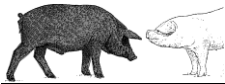


SUMMARY



explain the lower growth rate reported in Iberian pigs compared to modern breeds. To determine net portal appearance of lysine and methionine, 12 gilts, 6 Iberian and 6 Landrace purebred (28 kg BW), were fitted with three indwelling catheters: in carotid artery, portal vein and ileal vein. After surgery recovery a priming dose of para-aminohippuric acid (PAH, 2% w/v) was injected into the ileal vein 45 min prior to continuous infusion (0.8 ml/min), for measuring portal vein blood flow (PBF). The portal vein and carotid artery blood were sampled simultaneously -5 min, and 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5 and 6 hours after feeding 0.25 of total daily ration of LCP diet (145 g CP/kg dry matter (DM) and 14.25 MJ metabolizable energy (ME)/kg DM). Immediately after sampling, total haemoglobin was measured and blood centrifuged for packed cell volume determination and plasma collection. The experiment was repeated after a 1 week adaptation to a high CP diet (HCP) (187 g CP/kg DM) and 14.25 MJ metabolizable energy (ME)/kg DM). Net portal appearance of lysine was greater ($P<0.05$) when pigs consumed the HCP than LCP diet (23 vs. 15 $\mu\text{mol}/\text{min}$); breeds did not differ. Net portal appearance of methionine tended to be higher ($P=0.076$) for pigs fed HCP than LCP diet (4.4 vs. 3.6 $\mu\text{mol}/\text{min}$); breeds did not differ. In conclusion, differences in portal appearance of lysine and methionine did not exist between Iberian and Landrace pigs fed barley (*Hordeum vulgare*)–soybean (*Glycine max*) isoenergetic diets with low and high protein concentration.

The second experiment was designed to determine the relative contribution PDVHP to total heat production (THP) in Iberian and Landrace growing gilts. In this study it was hypothesized that a greater PDVHP relative to THP could partially explain the low energy efficiency of Iberian compared to modern breeds. To determine the PDVHP, O_2 concentration was measured in the blood samples obtained from the multicatheterized gilts as described previously. THP was determined from O_2 consumption and CO_2 production, for 6 hours after feeding 0.25 of total daily ration of the same diet (187 g CP/kg dry matter (DM) and 14.25 MJ metabolizable energy (ME)/kg DM) used in the first experiment, using respirometry chambers. Compared to Landrace, Iberian gilts had lower postprandial PDVHP (3.25 vs. 4.17 $\text{kJ h}^{-1} \text{kg}^{-0.75}$; $P<0.05$) and PDVHP/THP ratio (9.6 vs. 13.5%), and higher THP (33.7 vs. 30.8 $\text{kJ h}^{-1} \text{kg}^{-0.75}$). In spite of the low energetic efficiency and growth



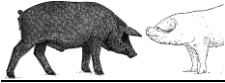
SUMMARY



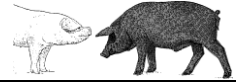
rate of Iberian compared to modern breeds, their PDV energy expenditure was lower under the conditions of the present study.

The objective of the third experiment was to determine differences in metabolic activity in hepatocytes isolated from pure Iberian and Landrace pigs that help to explain the divergent metabolic profile found *in vivo*. Hepatocytes were isolated from pure Iberian (n=10) and Landrace (n=8) pigs of similar BW (24.5 ± 12.1 and 32.9 ± 6.1 kg BW, respectively), by collagenase perfusion. Monolayers were established in medium containing fetal bovine serum for 1 day and switched to serum-free medium. Hepatocytes were maintained in William's E supplemented with β -mercaptoethanol (0.1 mM), glutamine (2 mM), antibiotics (gentamicin, penicillin, streptomycin and amphotericin B), dimethyl sulfoxide (1 μ g/ml), dexamethasone (10^{-8} M), insulin (0.173 and 17.3 nM) and glucagon (0.287, 2.87 and 28.7 nM) for 24-48 hours. GNG, glycogen degradation, triglycerides synthesis, β -hydroxybutyrate synthesis, IGF-1 synthesis, albumin and urea synthesis were determined. Iberian pigs had greater capacity of GNG than Landrace (24%, $P<0.05$), although no difference in glycogen degradation was found ($P>0.10$). Triglyceride content and esterification tended to be lower in hepatocytes from Iberian compared to Landrace pigs (12 and 31%, respectively; $0.10<P<0.05$). Furthermore, addition of free fatty acids (CLA or linoleic acid, 0.2 mM) increased triglyceride content (64%, $P<0.001$) although no difference between fatty acids was found. When free fatty acids were compared, a trend towards increased esterification (41%, $P=0.078$) was found for CLA. Although glucagon stimulated and insulin inhibited β -hydroxybutyrate synthesis, no difference between breeds was found ($P>0.10$). IGF-1 synthesis was diminished in hepatocytes from Iberian compared to Landrace pigs (16%, $P<0.05$). On the contrary, rate of albumin synthesis was greater in Iberian compared to Landrace pigs (58%, $P<0.05$). Finally, the capacity of urea synthesis was lower in hepatocytes of Iberian compared to Landrace pigs (86%, $P<0.05$). In conclusion, the genetic background accounts for important differences in protein and energy metabolism pathways found in primary culture of hepatocytes from lean and obese pigs.

The studies that form the present Thesis provide unique information about the metabolic differences at the level of PDV and liver of Iberian and Landrace pigs. These results represent a contribution to the physiologic and metabolic



SUMMARY



characterization of the Iberian pig to improve the use of resources and ultimately the production efficiency.

