

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

**Influencia del genotipo, sexo fetal y suplementación materna
con hidroxitirosol sobre el desarrollo prenatal del cerdo
ibérico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Consolación García Contreras

Directores

Cristina Óvilo Martín
Antonio González de Bulnes
Ana Isabel Rey Muñoz

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID



Instituto Nacional de Investigación
y Tecnología Agraria y Alimentaria

**INFLUENCIA DEL GENOTIPO, SEXO
FETAL Y SUPLEMENTACIÓN MATERNA
CON HIDROXITIROSOLO SOBRE EL
DESARROLLO PRENATAL DEL CERDO
IBÉRICO**

Tesis Doctoral presentada por

CONSOLACIÓN GARCÍA CONTRERAS

Realizada bajo la dirección de los doctores

CRISTINA ÓVILO MARTÍN

ANTONIO GONZÁLEZ DE BULNES LÓPEZ

ANA ISABEL REY MUÑOZ

MADRID, 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID



Instituto Nacional de Investigación
y Tecnología Agraria y Alimentaria

**INFLUENCIA DEL GENOTIPO, SEXO
FETAL Y SUPLEMENTACIÓN MATERNA
CON HIDROXITIROSOLO SOBRE EL
DESARROLLO PRENATAL DEL CERDO
IBÉRICO**

CONSOLACIÓN GARCÍA CONTRERAS

MADRID, 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID



Instituto Nacional de Investigación
y Tecnología Agraria y Alimentaria

**INFLUENCIA DEL GENOTIPO, SEXO
FETAL Y SUPLEMENTACIÓN MATERNA
CON HIDROXITIROSOLO SOBRE EL
DESARROLLO PRENATAL DEL CERDO
IBÉRICO**

Tesis Doctoral presentada por

CONSOLACIÓN GARCÍA CONTRERAS

Realizada bajo la dirección de los doctores

CRISTINA ÓVILO MARTÍN

ANTONIO GONZÁLEZ DE BULNES LÓPEZ

ANA ISABEL REY MUÑOZ

MADRID, 2019

La doctora Cristina Óvilo Martín, investigadora del Departamento de Mejora Genética Animal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, el doctor Antonio González de Bulnes, investigador del Departamento de Reproducción Animal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, y la doctora Ana Isabel Rey Muñoz, profesora titular del departamento de Producción y Nutrición Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que la tesis doctoral titulada "INFLUENCIA DEL GENOTIPO, SEXO FETAL Y SUPLEMENTACIÓN MATERNA CON HIDROXITIROSOLO SOBRE EL DESARROLLO PRENATAL DEL CERDO IBÉRICO" presentada por Consolación García Contreras para optar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo su dirección, cumple las condiciones exigidas para obtener dicho título y autorizan su presentación para que sea juzgada por la comisión correspondiente.

Y para que así conste, firman en Madrid, a 29 de octubre de 2019

Cristina
Óvilo Martín

Antonio
González de Bulnes

Ana Isabel
Rey Muñoz

El trabajo experimental que ha dado lugar a esta memoria ha sido realizado en los Departamentos de Mejora Genérica Animal y Reproducción Animal del Instituto Nacional de Investigación Agraria y Alimentaria, y en el Departamento de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, financiado mediante los siguientes proyectos de investigación:

- ❖ **AGL2013-48121-C3 del Ministerio de Economía y Competitividad. Cofinanciado por el FEDER.**
- ❖ **Ayudas para contratos predoctorales para la formación de doctores BES-2014-070464 del Ministerio de Economía y Competitividad.**
- ❖ **AGL2016-79321-C2-2R del Ministerio de Economía y Competitividad. Cofinanciado por el FEDER.**

A mi hijo, a mi marido y familia

A mi director y directoras

“Para recordar quien eres necesitas olvidar lo que

otros te dijeron que eres”

AGRADECIMIENTOS

Pues ha llegado el momento, puedo ponerme a escribir la última parte de mi Tesis Doctoral, quizás la más interesante para algunos y a la vez tan complicada. Es complicada por el hecho de que no quieres dejar a nadie atrás, ya que todas y cada una de las personas que se han cruzado en mi camino durante estos años han aportado algo de conocimiento o de humanidad. Vamos a empezar por partes y así, quizá, no me olvide de nadie.

En primer lugar tengo que agradecer el gran esfuerzo, la cantidad de horas dedicadas a este trabajo y la paciencia infinita que han tenido conmigo mis directoras de tesis Cristina Óvilo Martín y Ana Isabel Rey Muñoz y mi director Antonio González de Bulnes López.

Gracias Cristina por esa llamada de teléfono “in extremis” para preguntarme si seguía interesada en realizar la tesis en vuestro grupo, por esperarme para la entrevista casi una hora porque me había perdido y había acabado en Aravaca. Reconozco el esfuerzo y horas de dedicación que requiere la tutela y dirección de una Tesis Doctoral, y más aun con personas como yo que, a veces, son despistadas o demasiado entusiastas. Todas tus correcciones siempre han ido enfocadas a enriquecer mi trabajo, aunque al principio, cuesta verlo y entenderlo. Creo que he crecido mucho como persona desde el día que empecé hasta hoy mismo, y es gracias al trabajo duro y al esfuerzo por ambas partes.

A ti Ana, por abrirme las puertas de tu laboratorio y porque a pesar de no haber coincidido lo suficiente a lo largo de estos años, las veces que he necesitado tu ayuda me la has brindado. Tus conocimientos en la primera parte de esta tesis fueron fundamentales para entender la complejidad de la puesta a punto de las técnicas de laboratorio y de la interpretación correcta de los resultados.

Antonio, creo que no voy a poder expresar todo lo que te mereces. Más que director, compañero de trabajo, amigo, confidente, mi paño de lágrimas y también mi compañero de risas. No sé qué habría sido de mí sin tu ayuda, a pesar de que en la primera entrevista me asustaste mucho y me planteé si sería capaz de poder con todo esto. Gracias por las innumerables oportunidades de trabajo y de mejorar como persona que me has dado, tus consejos, tus correcciones, también tus cabezonerías...todo tiene cabida, y todo hace de ti una persona única. Sabes que para mí eres más que mi director, y puedo escribir en nombre de mi familia al completo (incluida mi madre) que siempre tendrás un sitio en nuestra casa, esté donde esté. Dejando atrás lo personal, espero que volvamos a coincidir laboralmente algún día porque creo que eres brillante, te desvives por tu trabajo y siempre intentas mejorar. Te deseo todo lo mejor y que no cambies nunca, vales mucho como persona y como investigador, y que nadie te haga pensar lo contrario.

A mis “directoras en la sombra” Susana Ástiz y Beatriz Isabel. A ti Susana, mi amiga y compañera. Gracias por tu paciencia, por escuchar siempre mis penas y alegrías, por brindarme esa confianza desde el primer día, por no

dejar de enseñarme algo nuevo siempre que hemos estado juntas. Porque me has enseñado que se puede hacer este trabajo tan complicado siendo feliz, desviviéndote por el siempre con una sonrisa y con amabilidad con todo el que te rodea. Trabajar contigo ha sido todo un lujo y espero que volvamos a coincidir. De igual modo, las puertas de mi casa siempre estarán abiertas para ti y tu familia. No cambies, sigue luchando por lo que realmente quieres y no dejes que nadie te doblegue, aunque todo esto ya lo sabes y lo aplicas a diario jejeje. A Bea, otra pieza clave en todo este proceso de realización profesional y personal. Sabes que has sido imprescindible para que esto haya salido adelante. Por tu entrega, por tu enseñanza infinita, por escucharme siempre que te he necesitado. Indudablemente valiosa y buena profesional, y aun mejor persona. Imprescindible en la aportación de conocimientos e ideas nuevas enriquecedoras. Has sido un auténtico ejemplo a seguir para mí, porque estos últimos años no han sido fáciles para ninguna, y has sido un ejemplo de entereza, esfuerzo y tesón. Igual, Dale fuerte a la vida, como ya lo haces.

A Marta Vázquez Gómez, amiga y compañera de tesis. Gracias por tu personalidad entusiasta y alocada, gracias a ella hemos echado muchas risas juntas. Gracias por tu ayuda en todo este camino, por las horas en el departamento de nutrición y por acompañarme siempre en los muestreos. Juntas siempre ha sido más fácil.

A Jose Luis Pesantez, por toda la ayuda desinteresada que me has ofrecido durante este tiempo y por tu forma de ser. Sigue luchando por lo que quieres, conseguirás todo lo que te propongas.

A Ana Heras Molina, te quedas solita, pero siempre podrás llamarme para lo que necesites. Gracias también por toda tu ayuda, por estar siempre dispuesta a colaborar, incluso antes de comenzar tu periodo de tesis. Te deseo todo lo mejor en este recorrido, y no te quepa la menor duda que vas a poder con todo!!!

A Teresa Encinas, mujer amable, cariñosa, entregada y de las mejores docentes que se han cruzado en mi camino. Por todo tu apoyo, tus mil sonrisas, por ser tan entusiasta y abrazar la vida como lo haces.

A Esteban Porrini, por tu amabilidad y profesionalidad en todo lo que hace. Gracias por darme la oportunidad de trabajar a tu lado.

A Rosa Nieto, Manuel Lachica, Ignacio Fernández Figares, Isabel Seiquer, Luis Lara, Zaira Pardo. Sólo dos meses trabajando juntos y me habéis aportado tanto que no sé por dónde empezar. Gracias por acogerme como lo hicisteis, por abrirme las puertas de vuestro laboratorio. A ti Manolo, por dejarme “acribillarte” a preguntas en quirófano. A Luis por sus clases de estadística. A Ignacio por contestar todas mis dudas. A Rosa por su comprensión, tranquilidad y enseñarme todo lo que necesitaba, por motivarme a volver a mi tierra. A Zaira, por esos días midiendo energía y pesando muestras interminables, por tu humildad y amabilidad.

A Ole Madsen y Martien Groenen, ahí sí que hubo paciencia. Una chica que apenas hablaba inglés y sin idea de Linux, y aun así estuvisteis a mi lado durante mis cuatro meses de estancia. De nuevo gracias, tanto por la ayuda laboral como personal, porque la amabilidad era de obligado cumplimiento para vosotros y me lo hicisteis ver.

A Rita, Yolanda, Fabian, Adrián, Mari Luz, Laura, Victoria, Isa, Jose, gracias por vuestra ayuda, vuestra disposición y paciencia, cada uno de vosotros ha aportado valores y conocimientos muy necesarios para realizar este trabajo. Por los viajes juntos, por aceptarme desde el principio tal y como soy.

Al resto de personas del departamento de Mejora Genética Animal: Silvia, Eli, Alejandro, Óscar, María Muñoz, María Saura, Jesus, Clara, Malena, Almudena, Maria Jesús, Beatriz, Teresa. Me llevo muy buen recuerdo de todos y cada uno de vosotros, siempre he recibido amabilidad y cariño por vuestra parte y espero que volvamos a coincidir. A los "viejóvenes" os debo una quedada, a ver si ahora que he terminado conseguís que me mueva a Madrid jijiji.

A mi marido, Juan, mi Vargas. Gracias cariño por tu gran apoyo desde el día uno que comencé esta aventura. Tengo claro que sin tu apoyo y ayuda no habría podido con esto, y es que soy afortunada de tener un hombre como tu a mi lado. Eres un gran marido y mejor padre. En esta última cuesta tú eres tan partícipe como yo de este logro, así que gracias, gracias por todo.

A mis padres, las personas más generosas de la Tierra, que me han dado todo lo que han tenido y me han permitido volar y alcanzar mis sueños. Sé que no fue fácil cuando os dije que me venía a Madrid, no era fácil dejar ir a vuestra niña pequeña, y menos aun cuando os dije que ibais a ser abuelos y no podríais ver a vuestro nieto a diario. Aun así, me brindasteis todo vuestro apoyo y siempre que os he necesitado habéis estado ahí. Mi madre, que ha viajado tanto por mi culpa y con la que, a pesar de pelearme tanto, no puedo dejar de llamarla a diario para contarle que tal me ha ido el día. Os prometo que vamos a volver y que vais a poder disfrutar de vuestro nieto. Os quiero.

A mis suegros, Lola y Juan, piezas clave también en esto, ya que han tenido que viajar mucho para poder cuidar de su nieto cuando tenía que viajar o simplemente estaba hasta arriba de trabajo. Gracias por todo, vuestro nieto os adora y creo que ese es la mejor recompensa que podéis tener.

A mis hermanos, Ángel y Jesús, que a pesar de no ser muy habladores sé que siempre voy a poder contar con vosotros. Me habéis dado el mejor regalo que se le puede dar a una hermana, me habéis hecho tita. Al igual que les digo a papá y a mamá, os prometo que vamos a volver y así poder disfrutar todos juntos de la familia tan bonita que tenemos.



Índice

- Índice de figuras23
- Índice de tablas27
- Abreviaturas31
- Resumen/Summary.....37
- 1. Introducción47
 - 1.1. Origen, distribución geográfica y sistemas de producción del cerdo ibérico.....49
 - 1.2. Situación actual de la producción y perspectivas de futuro.....52
 - 1.3. Peculiaridades fisiológicas de la raza ibérica54
 - 1.3.1. Perfil hormonal y metabólico55
 - 1.3.2. Crecimiento y deposición del tejido adiposo56
 - 1.3.2.1. *Tipos de depósitos grasos*57
 - 1.3.2.2. *Adipogénesis*58
 - 1.3.2.3. *Regulación génica de la adipogénesis*60
 - 1.3.2.4. *Lipogénesis, lipólisis y β -oxidación*62
 - 1.3.2.5. Importancia de la grasa intramuscular y el perfil de ácidos grasos.....65
 - 1.3.2.6. Importancia de la cantidad y el tipo de fibra muscular.....68
 - 1.3.3. Aspectos reproductivos y factores limitantes del desarrollo prenatal.....69
 - 1.3.3.1. *Tasa de ovulación*.....70
 - 1.3.3.2. *Mortalidad embrionaria y fetal*.....71
 - 1.3.3.3. *Capacidad uterina*.....72

1.3.3.4.	<i>Eficiencia placentaria</i>	73
1.3.4.	Programación prenatal y sus consecuencias en la vida adulta.....	75
1.3.5.	<i>Sexo fetal</i>	77
1.4.	Vías de mejora del desarrollo prenatal: Estrategias nutricionales y terapias antioxidantes	78
1.4.1.	<i>Estrategias nutricionales y terapias antioxidantes</i>	78
1.4.1.1.	<i>Suplementación materna con aminoácidos</i>	79
1.4.1.2.	Suplementación materna con vitaminas	81
1.4.1.3.	Suplementación materna con polifenoles	83
1.5.	Genómica funcional como herramienta para el estudio de la fisiología y el desarrollo prenatal de la raza ibérica	91
2.	<i>Justificación y objetivos</i>	99
3.	<i>Diseño experimental</i>	105
3.1.	Diseño experimental I: Ontogeny of Sex-Related Differences in Foetal Developmental Features, Lipid Availability and Fatty Acid Composition	107
3.2.	Diseño experimental II: Impact of Genotype, Body Weight and Sex on the Prenatal Muscle Transcriptome of Iberian Pig.....	109
3.3.	Diseño experimental III: Polyphenols and IUGR Pregnancies: Effects of Maternal Hydroxytyrosol Supplementation on Placental Gene Expression and Fetal Antioxidant Status, DNA-Methylation and Phenotype, y Polyphenols and IUGR Pregnancies: Effects of Maternal Hydroxytyrosol Supplementation on Hepatic Fat Accretion and Energy and Fatty Acids Profile of Fetal Tissues.....	112
4.	<i>Resultados</i>	115
4.1.	Experimento I	117
4.2.	Experimento II	151

4.3. Experimento III201

4.4. Experimento IV225

5. **Discusión general**251

5.1. Factores con efecto sobre el desarrollo prenatal, homeostasis, peroxidación lipídica, composición de ácidos grasos y transcriptoma muscular del cerdo ibérico254

 5.1.1. Metabolismo materno e interacción con el periodo gestacional 254

 5.1.2. Sexo fetal257

 5.1.3. Genotipo fetal259

5.2. Efecto de la suplementación materna con hidroxitirosol sobre el desarrollo prenatal del cerdo ibérico265

6. **Conclusiones/Conclusions**271

7. **Bibliografía** 277

8. **Anexo I: Material suplementario del experimento II**305

9. **Anexo II: Otras publicaciones relacionadas con esta tesis doctoral**309

 9.2. Publicaciones indexadas311

 9.3. Publicaciones no indexadas314

 9.4. Capítulos de libros315

 9.5. Comunicaciones a congresos315

Índice de figuras

Figuras de la introducción

Figura 1. Distribución geográfica de la dehesa en la península Ibérica. (Fuente: Fehedesa)	50
Figura 2. Censo comunitario de la producción de porcino hasta junio de 2019. (Fuente: Eurostat)	53
Figura 3. Restos de cerdos encontrados bajo la lava en la ciudad de Pompeya tras la erupción del Vesubio	54
Figura 4. Diferenciación e interacción entre los diferentes adipocitos en mamíferos. (Fuente: Sánchez et al. 2016)	60
Figura 5. Representación esquemática de los diferentes estadios celulares y los principales factores de transcripción involucrados durante la adipogénesis.....	61
Figura 6. Representación esquemática del proceso de lipogénesis de <i>novo</i> a partir de glucosa. (Fuente: Herman et al. 2012)	63
Figura 7. Representación gráfica de la β -oxidación	65
Figura .8. Representación esquemática de la pérdida embrionaria/fetal durante la gestación de cercas múltiparas (Fuente: Foxcroft et al. 2006)	72
Figura 9. Regulación aminoacídica de la síntesis proteica en placenta porcina (Fuente: Wu et al. 2010)	81
Figura 10. Hidrolización de la oleuropeína y síntesis de HT	86
Figura 11. Cambios en la ganancia diaria media (Kg/día \pm S.E.M.) de los lechones durante el período de lactación. (Fuente: Vazquez-Gomez et al. 2017)	90
Figura 12. Resumen del flujo de trabajo en el análisis de <i>microarrays</i> de expresión (Fuente: Staal et al. 2003; Ranz & Machado 2006)	93
Figura 13. Representación gráfica de un experimento típico de RNA-seq (Fuente: Martin and Wang 2011)	95

Figuras del diseño experimental

Figura 3.1. Diseño experimental I	108
Figura 3.2. Diseño experimental II	109
Figura 3.3. Flujo de trabajo seguido para obtener la expresión diferencial génica entre grupos y su interpretación funcional	111
Figura 3.4. Diseño experimental III	112

Figuras del Experimento I

Graphical Abstract	120
---------------------------------	-----

Figure 1. Metabolic profiles of sows, from which foetuses were harvested on Gestational Day (GD) 70 or 90. Mean fasting values (mg/dL) (\pm SEM) of glucose, fructosamine, total cholesterol, high-density and low-density lipoprotein-cholesterol (HDL-c and LDL-c, respectively) and triglycerides in maternal plasma on the day of harvest

Figure 2. Mean ratios (\pm SEM) of head-to-body weight (**A**); head-to-carcass weight (**B**); and brain-to-body weight and brain-to-carcass weight (**C**) in female foetuses (black bars) and male foetuses (white bars) on Gestational Day (GD) 90. Asterisks indicate significant differences between males and females. * $p < 0.05$

Figure 3. Influence of foetal sex on foetal development under conditions of normal growth or severe IUGR: mean ratios (\pm mean square error) of brain-to-body weight and brain-to-carcass weight on Gestational Day (GD) 70 (**A**); ratios of brain-to-body weight, brain-to-carcass weight and liver-to-body weight on GD 90 (**B**); and ratio of spleen-to-body weight on GD 90 (**C**). Bars indicate, from left to right, female and male foetuses with severe IUGR, then female and male foetuses showing normal growth. Asterisks indicate the p value associated with differences between the foetal sexes and between foetuses showing IUGR or normal growth. * $p < 0.05$

Figure 4. Ratios of MDA to cholesterol, LDL-c and triglycerides of foetuses on Gestational Day (GD) 70 and 90: Mean ratios (\pm SEM) of: MDA to cholesterol (**A**); MDA to LDL-c (**B**); and MDA to triglycerides (**C**) on GD 70 (black bars) or 90 (white

bars). Asterisks indicate significant differences between GD 70 and 90. * $p < 0.05$
127

Figuras del Experimento II

Figure 1. Venn diagram showing the total number of differentially expressed (DE) genes in all comparisons164

Figure 2: Top canonical pathways ($p < 0.005$) identified by functional analysis of DE genes in crossbred fetuses (orange bars) and Iberian fetuses (blue bars167

Figure 3. Enrichment of the PPAR signaling pathway in muscle from Iberian fetuses169

Figure 4. Functional network of *Metabolic Disease, Cellular Movement, as well as Skeletal and Muscular System Development and Function* identified by analysis170

Figure 5. Top-scoring network of regulatory effects in crossbred fetuses of DE genes in Iberian and crossbred fetuses171

Figure 6: Top-scoring regulator effects network activated in crossbred LBW fetuses176

Figure 7: Top-scoring network of regulator effects activated in Iberian HBW fetuses178

Figuras del Experimento III

Graphical Abstract204

Figure 1. Relative gene expression of antioxidant, vascularization and fetal growth candidate genes in placenta of Iberian fetus from sows supplemented with hydroxytyrosol (HTX) and controls (C)207

Figure 2. This image shows an apparent narrowing of the ductus arteriosus. DAo: Descending Aorta; DA: Ductus arteriosus; PA: Pulmonary Artery210

Figure 3. The image shows gray scale normal appearance of the ductus arteriosus. DAo: Descending Aorta; DA: Ductus arteriosus; PA: Pulmonary Artery216

Figuras de la Discusión General

Figura 14. Efecto del perfil metabólico materno sobre desarrollo fetal (elaboración a partir de los resultados obtenidos en la presente Memoria de Tesis Doctoral).....	255
Figura 15. Esquema representativo de la función de la leptina a nivel hipotalámico	262
Figura 16. Representación de la actividad del AMPK y la posible resistencia al AMPK debido a la leptina (Fuente: Kahn et al. 2005)	263
Figura 17. Hidroxitirosol y sus principales funciones biológicas	266

Índice de tablas

Tablas de la introducción

Tabla 1. Censo de ganado porcino ibérico en España de los últimos tres años divididos por Comunidad Autónoma (Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación; MAPA)53

Tabla 2. Características diferenciales de la canal entre el cerdo ibérico y los cerdos blancos (fuente: Mayoral et al. 1999).....62

Tabla 3. Órganos fetales afectados por retraso en el crecimiento intrauterino74

Tabla 4. Efectos del HT sobre la protección de enfermedades cardiovasculares. (Fuente: Bulotta et al. 2014)88

Tabla 5. Efecto de la suplementación de la dieta materna con hydroxytyrosol sobre el peso al nacimiento. (Fuente: Vazquez-Gomez et al. 2017)89

Tabla 6. Resumen de los procesos y empresas desarrolladoras de sistemas de secuenciación NGS. (Fuente: Levy and Myers 2016)94

Tabla 7. Estudios enfocados en las diferencias de expresión génica relacionada con el desarrollo muscular durante el desarrollo prenatal en cerdo.....97

Tablas del Experimento I

Table 1. Effect of age and sex on absolute weights and body measurements of male and female foetuses at Gestational Day (GD) 70 and 90. Mean values for morphometric measurements and absolute body and main organs weights at GD 70 and 90 in female (F) and male (M) fetuses123

Table 2. Effects of gestational time and sex on foetal adiposity. Mean values (%) for fat content in the *longissimus dorsi* muscle (LD) and liver at Gestational Day (GD) 70 and 90 in female (F) and male (M) fetuses124

Table 3. Effect of age and sex on foetal metabolism. Mean values for parameters of lipids and glucose metabolism at Gestational Day (GD) 70 and 90 in female (F) and male (M) fetuses126

Table 4. Effects of age and sex on foetal neutral fatty-acid composition of <i>longissimus dorsi</i> muscle. Mean values for neutral lipids in the <i>longissimus dorsi</i> muscle at Gestational Day (GD) 70 and 90 in female (F) and male (M) fetuses	129
Table 5. Effects of age and sex on foetal polar fatty-acid composition of <i>longissimus dorsi</i> muscle. Mean values for polar lipids in the <i>longissimus dorsi</i> muscle at Gestational Day (GD) 70 and 90 in female (F) and male (M) fetuses	131
Table 6. Effects of age and sex on foetal neutral fatty-acid composition of liver. Mean values for neutral lipids in the liver at Gestational Day (GD) 70 and 90 in female (F) and male (M) fetuses	135
Table 7. Effects of age and sex on foetal polar fatty-acid composition of liver. Mean values (%) for polar lipids in the liver at Gestational Day (GD) 70 and 90 in female (F) and male (M) fetuses	137
Table 8. Fatty acid composition (g/100 g total fatty acids) of the experimental diet	142
Table 9. Detailed information (total number and percentage) on sex distribution (total, male and female fetuses) in the pregnancies studied in the current trial	144

Tablas del Experimento II

Table 1. Effect of genotype, body weight and sex on developmental and metabolic features of purebred Iberian and crossbred Iberian x Large White pig fetuses	161
Table 2. Top potential upstream regulators of transcriptional differences between crossbred LBW and HBW fetuses	174
Table 3. Top potential upstream regulators of transcriptional differences between Iberian LBW and HBW fetuses	181

Tablas del Experimento III

Table 1. Maternal features at day of sampling (Day 100 of pregnancy). Mean values (\pm SEM) in treated (Hydroxytyrosol; Group HTX) and control sows (Group C).
--

TEAC accounts for Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, HDL-c for high-density lipoproteins cholesterol and LDL-c for low-density lipoproteins cholesterol)206

Table 2. Fetal antioxidant status at day of sampling (Day 100 of pregnancy). Mean values (\pm SEM) and differences for sexes in treated (Hydroxytyrosol; Group HTX) and control fetuses (Group C). TEAC accounts for Trolox Equivalent Antioxidant Capacity208

Table 3. Fetal development at day of sampling (Day 100 of pregnancy). Mean values (\pm SEM) and differences for sexes in treated (Hydroxytyrosol; Group HTX) and control fetuses (Group C). CRL accounts for Crown-rump Length, ONL for Occipito-Nasal Length, BPD for Biparietal Diameter, TC for Thoracic Circumference and AC for Abdominal Circumference209

Table 4. Fetal muscle fibers at day of sampling (Day 100 of pregnancy). Mean values (\pm SEM) and differences for sexes for the number of secondary fibers (F2) and the area of the muscle fiber in treated (Hydroxytyrosol; Group HTX) and control fetuses (Group C)211

Table 5. Fetal metabolic status at day of sampling (Day 100 of pregnancy). Mean values (\pm SEM) and differences for sexes in treated (Hydroxytyrosol; Group HTX) and control fetuses (Group C). HDL-c for high-density lipoproteins cholesterol and LDL-c for low-density lipoproteins cholesterol)211

Table 6. Primer design for qPCR and PCR efficiencies219

Tablas del Experimento IV

Table 1. Fatty acid composition (g/100 g total fatty acids) of the experimental diet230

Table 2. Effects and differences between sexes, of maternal hydroxytyrosol supplementation on the fatty acid profile of the fetal liver. Mean values (\pm SEM) of neutral lipids in female (F) and male (M) fetuses of the treated (HTX) and the control group (C)233

Table 3. Effects and differences between sexes, of maternal hydroxytyrosol supplementation on the fatty acid profile of the fetal liver. Mean values (\pm SEM) of polar lipids in female (F) and male (M) fetuses of the treated (HTX) and the control group (C)235

Table 4. Effects and differences between sexes, of maternal hydroxytyrosol supplementation on the fatty acid profile of the fetal *longissimus dorsi* muscle. Mean values (\pm SEM) of neutral lipids in female (F) and male (M) fetuses of the treated (HTX) and the control group (C)238

Table 5. Effects and differences between sexes, of maternal hydroxytyrosol supplementation on the fatty acid profile of the fetal *longissimus dorsi* muscle. Mean values (\pm SEM) of polar lipids in female (F) and male (M) fetuses of the treated (HTX) and the control group (C)240

Arg. *L-arginina*

ARNm. ARN mensajero

ASXL2. Additional sex combs-like protein

ATP. Adenosin Trifosfato

B2M. *Beta-2-Microglobulin (Beta-2-microglobulina)*

BAX. Regulador de apoptosis X asociado a BCL2

BCL2. Regulador de la apoptosis del linfoma 2 de células B

BMP-7. *Bone Morphogenetic Protein 7*

BPN. Bajo Peso al Nacimiento

C. Células

CAT. *Catalase (Catalasa)*

CEBPA. CCAAT/enhancer binding protein alpha (*Proteínas de unión a CCAAT/enhancer*)

CEBPB. CCAAT/enhancer binding protein beta (*Proteínas de unión a CCAAT/enhancer*)

CEH. Célula Estrellada Hepática

CFD. *Complement Factor D o Adipsin (Adipsina)*

ChREBP. Carbohydrate-responsive element-binding protein (elemento de respuesta a carbohidratos)

CPT1. *Carnitine-palmitoyl-transferase 1 (Carnitina pamotoil transferasa 1)*

C/EBP. *CCAAT-enhancer binding protein*

DE. Diferencialmente Expresados

DGAT. *Diacylglycerol O-acyltransferase (Diacilglicerol aciltransferasa)*

DLK1. *Delta-like 1 homolog (drosophila) (Homólogo de la proteína similar a delta)*

DOHaD. *Developmental Origins of Health and Disease (Origen del desarrollo de la salud y la enfermedad)*

ED. Expresión Diferencial

EFSA. Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

EGR2. *Early Growth Response 2 (Respuesta de crecimiento temprano 2)*

ELOVL6. Long-chain fatty-acyl elongase 6 (Elongasa 6 de ácidos grasos de cadena larga)

ER. Retículo endoplasmático

FABP. Fatty acid binding protein (Proteína de unión a ácidos grasos)

FAS. Fatty acid Synthase (Ácido Graso Sintasa)

FASN. Fatty acid synthase (Sintasa de ácidos grasos)

FGF. *Fibroblastic Grow Factor*

FLN. Fracción de Lípidos Neutros

FLP. Fracción de Lípidos Polares

FOS. Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit

FPKM. Fragments Per Kilobase of Exon Model Per Million Reads Mapped

FRAP. Ferric Reducing Antioxidant Power (Poder Reductor Del Hierro)

GDPH. Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa

GH. Hormona de Crecimiento

GIM. Grasa Intramuscular

GLUT4. Glucose transporter type 4 (Transportador de glucose tipo 4)

GAPDH. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (Deshidrogenasa de gliceraldehído-3-fosfato)

GWAS. Genome-Wide Associations Studies

HDL. High Density Lipoprotein (Lipoproteína de Alta Densidad)

HIF1A. Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha (Hipoxia Inducible Factor 1 Subunidad Alfa)

HO-1. Haem oxigenasa

HPLC. High Performance Liquid Chromatography (cromatografía líquida de alta eficacia)

HT. Hidroxitirosol

ICAM. Molécula de adhesión intercelular

IGF-I. Insulin Like Growth Factor 1 (Factor de Crecimiento Asociado a Insulina)

iNOS. NOS inducible

INSR. *Insulin Receptor (Receptor de Insulina)*

IPA. *Ingenuity Pathway Analysis*

IRS. *Insulin Receptor Substrate*

IUGR. *Intrauterine Growth Restriction (Crecimiento Intrauterino Retardado)*

KLF5. *Kruppel-like factor 5 (Factor similar a kruppel 5)*

LDL. *Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de Baja Densidad)*

LEP. Leptina

LEPR. Receptor de Leptina

Leu. L-leucina

LIPE. *Lipase E, Hormone Sensitive Type (Lipasa Sensible a Hormonas)*

lncRNA. ARNs largos no codificantes

LXR. *Liver x receptor (Receptor hepático x)*

MDA. *Malondialdehyde (Malondialdehído)*

ME. *Malic enzyme (Enzima málico)*

MC4R. *Melanocortin receptor 4 (Receptor de melanocortina 4)*

mTOR. *Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase (Ruta de la Rapamicina)*

MUFA. Ácidos Grasos Monoinsaturados

NASH. *Nonalcoholic Steatohepatitis (Esteatosis Hepática no Alcohólica)*

NADPH. *Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato*

NAFLD. *Enfermedad del hígado graso no alcohólico*

NAMPT. *Nicotinamide Phosphoribosyltransferase o Visfatin (Visfatina)*

NGS. *Next Generation Sequencing*

NOS2. *Nitric Oxide Synthase 2 (Óxido nítrico sintasa 2)*

NPY. *Neuropeptide Y (Neuropéptido Y)*

Nrf2. *Factor nuclear (derivado de eritroides 2)*

ODC. *Ornitina descarboxilasa*

P13K/Akt. Vía fosfoinositida-3-quinasa;

PEPCK. Phosphoenolpyruvate carboxykinase

PGC1. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1

PLIN. Perilipin (Perilipina)

Pn. Productividad numérica: número de lechones destetados por cerda y año.

POMC. Proopiomelanocortin (Proopiomelanocortina)

PPAR. Peroxisome Activated Receptors

PPARγ. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma

PRDM16. PR Domain Contain 16

Pro. L-prolina

PUFA. Ácidos Grasos Polinsaturados

QTL. Quantitative Trait Locus

RARA. Retinoic Acid Receptor Alpha (Receptor de ácido retinoico alfa)

RBP4. Retinol Binding Protein 4 (proteína de unión al retinol 4)

ROS. Reactive Oxygen Species (Especies Reactivas de Oxígeno)

RT-PCR. Real Time PCR (PCR a Tiempo Real)

RXRG. Retinoid x receptor (Receptor retinoide x)

SCD1. Stearoyl-CoA desaturase-1 (Estearoil CoA desaturasa-1)

SFA. Ácidos Grasos Saturados

SGSC. Swine Genome Sequencing Consortium

SNP. Single nucleotide polymorphism (Polimorfismo simple)

SOD1. Superoxide Dismutase 1 (Superóxido Dismutasa 1)

SREBP1. Sterol regulatory element binding protein 1 (proteína de unión al elemento de regulación del estero 1)

TAB. Tejido Adiposo Blanco

TAG. Triacilgliceroles

TAP. Tejido Adiposo Pardo

TEAC. Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

TEP. Tejido extraplacentario

Tf. Tasa de fertilidad: número de partos por cerda y año.

Tm. Tasa de mortalidad total entre nacimiento y destete (expresado en porcentaje)

TNF. *Tumor necrosis factor* (factor de necrosis tumoral)

Tp. Tasa de prolificidad: número de lechones nacidos vivos por camada o tamaño de camada al nacimiento.

TRIM63. *Tripartite Motif Containing 63*

UCP-1. *Uncoupling Protein 1 (Proteína desacoplante 1)*

VCAM. *Molécula de adhesión celular vascular*

VEGFA. *Vascular Endothelial Growth Factor A (Factor de crecimiento endotelial vascular A)*



Resumen

El cerdo ibérico, perteneciente al tronco porcino *Sus scrofa meridionalis* o cerdo mediterráneo, ha sido criado en sistemas extensivos durante siglos y como consecuencia, ha desarrollado un genotipo "ahorrador" que le permite adaptarse a las condiciones climáticas extremas y a los ciclos estacionales de abundancia y escasez de alimento característicos del suroeste de la Península Ibérica. Por otro lado, la rusticidad propia de la raza y la escasa selección genética determinan una menor eficiencia de sus parámetros productivos respecto a otras razas cosmopolitas seleccionadas.

Sin embargo, en los últimos años, la demanda de productos cárnicos de calidad por parte de los consumidores ha llevado a la intensificación de los sistemas de producción del cerdo ibérico. Los sistemas intensivos aumentan la rentabilidad del proceso productivo, ya que permiten acortar los ciclos de producción y reducir los meses de vida para alcanzar el peso mínimo de sacrificio. Sin embargo, existen marcadas diferencias en la eficiencia de la producción del cerdo ibérico respecto a las razas mejoradas, siendo las más evidentes la menor precocidad y mayor duración del ciclo productivo en el cerdo ibérico.

Una de las estrategias abordadas para aumentar los rendimientos productivos del cerdo ibérico criado en intensivo ha sido aumentar su eficiencia reproductiva, principalmente su prolificidad, ya que un aumento de prolificidad supone un aumento de lechones y, en teoría, una mayor producción de carne por camada y cerda. Sin embargo, la eficiencia reproductiva en porcino, como sucede en otras especies, depende de numerosos factores, tanto intrínsecos (raza, genotipo, edad, número de partos y estado fisiológico) como extrínsecos (manejo reproductivo, alimentación, higiene y sanidad, época del año y factores sociales, principalmente). Alteraciones en estos factores pueden dar lugar a cambios en el estado materno y en el desarrollo y función placentaria y, en consecuencia, a deficiencias en el desarrollo fetal y a la aparición de fenómenos de restricción del crecimiento intrauterino y programación prenatal. Un retraso en el desarrollo prenatal tendrá como consecuencia el nacimiento de lechones con bajo peso, los cuales verán reducido su potencial de crecimiento magro y aumentarán su predisposición al engrasamiento. Además, estos lechones con bajo peso presentan mayores tasas de mortalidad y alteraciones en su desarrollo y su metabolismo postnatal que pueden afectar a la calidad de su canal y carne, generando así pérdidas económicas importantes para el productor.

Estos fenómenos de retraso del desarrollo y programación prenatal, comunes en la especie porcina y, más concretamente, en la raza ibérica que ocupa el presente estudio, hacen necesaria la implementación de estrategias para minimizar su incidencia y/o disminuir sus efectos negativos.

Es por ello que el presente trabajo pretende profundizar en el conocimiento del efecto de diferentes factores individuales que afectan al desarrollo prenatal del cerdo ibérico, y determinar la efectividad de la suplementación nutricional materna con agentes que favorezcan el desarrollo y la homeorhesis fetal y, así, mitigar los efectos del retraso en el crecimiento intrauterino. En los últimos años, los trabajos de nuestro grupo se han centrado en el uso de agentes antioxidantes (concretamente hidroxitirosol) para abordar este problema, ya que los fetos afectados por retraso del crecimiento intrauterino presentan menor capacidad antioxidante y mayor estrés oxidativo.

Para ello, se realizaron tres procedimientos experimentales. En todos ellos se realizó una restricción alimenticia materna para aumentar la incidencia de fetos con retraso del crecimiento intrauterino y sus consecuencias. Los experimentos I y II tuvieron como objetivo profundizar en el conocimiento del efecto de los factores individuales (genotipo, peso y sexo fetal y estado metabólico materno) sobre el desarrollo prenatal. Además, el experimento I permitió establecer el estadio de desarrollo fetal más adecuado para la toma de datos de la presente Tesis Doctoral. Por último, el tercer procedimiento experimental, que en realidad estuvo compuesto por dos estudios (experimentos III y IV), tuvo como objetivo determinar la efectividad de la suplementación materna con hidroxitirosol para mitigar los efectos del retraso en el crecimiento intrauterino y la programación prenatal.

Los resultados del experimento I, en el que se pretendía estudiar el efecto del sexo fetal y la edad gestacional sobre el desarrollo prenatal en gestaciones comprometidas, mostraron que el estado metabólico materno juega un papel clave tanto en el desarrollo como en la homeorhesis fetal en la raza ibérica, al igual que en otras razas y especies de mamíferos. En este sentido, el perfil metabólico materno, principalmente el lipídico e independientemente de la edad gestacional, afectó al desarrollo prenatal y a la disponibilidad lipídica y glucídica por parte del feto. Por otro lado, se observó una alteración en la disponibilidad de lípidos fetales con la subnutrición materna prolongada, siendo ésta menor en estadios tardíos de desarrollo; este hecho puede ser consecuencia del aumento de la peroxidación lipídica fetal que se observó con la desnutrición materna prolongada. Este aumento del estrés oxidativo con la progresión de la desnutrición materna se relacionó, a su vez, con cambios en la composición de ácidos grasos en el músculo fetal; así, se observaron posibles

alteraciones en la lipogénesis y en la regulación de la insulina en los fetos afectados por restricción del crecimiento.

Los resultados obtenidos en el experimento II, cuyo objetivo principal fue determinar el efecto del genotipo, el sexo y el peso fetal sobre el transcriptoma muscular del cerdo ibérico, mostraron que el genotipo fetal tiene un fuerte impacto sobre los parámetros de desarrollo corporal y estado metabólico, así como sobre el transcriptoma del músculo *longissimus dorsi*, a 77 días de gestación. De hecho, se observó que las rutas génicas relacionadas con el desarrollo muscular eran más activas en las razas magras, incluso en este estadio temprano del desarrollo. Además, se observó una posible alteración del metabolismo lipídico en la raza ibérica, respaldando la hipótesis de que las diferencias metabólicas entre razas grasas y magras se establecen ya en estadios de desarrollo muy tempranos. Finalmente, es de reseñar que los resultados obtenidos del análisis transcriptómico muscular revelaron una posible regulación negativa de la ruta AMPK en los fetos ibéricos puros, posiblemente relacionada con los elevados niveles de leptina característicos de las razas obesas. Por otro lado, el diseño experimental del experimento II permitió, a su vez, determinar el papel del peso fetal sobre los parámetros metabólicos en los diferentes genotipos y sobre su perfil transcriptómico muscular. En cuanto al perfil metabólico fetal, los resultados mostraron la importancia de la disponibilidad de lípidos y azúcares para el correcto desarrollo fetal. Concretamente, en el caso de los fetos ibéricos puros, este hecho fue respaldado por los datos obtenidos del análisis transcriptómico, ya que tanto los datos de expresión génica como la interpretación funcional señalaron una alteración del metabolismo lipídico en los fetos de menor peso. Además, se detectó una menor expresión de genes relacionados con el crecimiento del músculo *longissimus dorsi* en cerdo, como por ejemplo *COL9A2* y *MATN1* en los fetos de menor peso, independientemente del genotipo. Los resultados sugieren que estos genes, así como otros muchos genes diferencialmente expresados y reguladores, podrían tener un papel importante en el desarrollo muscular prenatal en el cerdo, constituyendo por tanto interesantes genes candidato relacionados con el crecimiento prenatal.

En conjunto, los resultados del experimento I y II mostraron un claro efecto diferencial del sexo fetal; las hembras ibéricas afectadas por malnutrición materna presentaron mejores mecanismos adaptativos que los machos, lo que podría aumentar sus probabilidades de supervivencia en la vida postnatal. Además, los mecanismos de crecimiento compensatorio fueron más acusados en hembras que en machos (principalmente, mayor eficiencia placentaria y mayor desarrollo de la cabeza y el cerebro o *brain sparing effect*). Confirmando esta mejor adaptación por parte de las hembras a condiciones uterinas adversas, se observó una mayor síntesis de ácidos

grasos no esenciales y mejor disponibilidad de ácidos grasos esenciales en las hembras ibéricas. Además, los resultados, en conjunto, obtenidos al analizar el efecto del sexo fetal sobre la composición de ácidos grasos y el transcriptoma muscular revelaron una posible protección por parte de las hembras a la resistencia a la insulina (menor ratio de omega-6/omega-3 y menor expresión de los genes *AHSG* y *FETUB*).

Finalmente, los resultados del diseño experimental III, que engloba los experimentos III y IV y que tuvo como objetivo determinar el efecto de la suplementación nutricional materna con hidroxitirosol sobre diferentes parámetros de desarrollo prenatal, señalaron la utilidad de la suplementación materna con hidroxitirosol en gestaciones comprometidas. En este sentido, se observó que la suplementación con hidroxitirosol aumenta la capacidad antioxidante fetal y disminuye la peroxidación lipídica, lo que se tradujo en un aumento de la disponibilidad de lípidos y ácidos grasos necesarios para el desarrollo fetal. Los efectos de la suplementación materna con hidroxitirosol estuvieron fuertemente modulados por el sexo fetal; así, los efectos protectores de éste compuesto fueron más evidentes en los machos.

Sin embargo, también se observaron posibles efectos negativos de la administración de este compuesto que deben ser testados antes de la aplicación práctica de la sustancia. En primer lugar, a pesar de las evidencias de un efecto protector del tratamiento sobre el desarrollo de los fetos machos obtenidas en el experimento III, estos presentaron menor desarrollo corporal y, específicamente, menor desarrollo del hígado (experimento III) y menor contenido de energía total (experimento IV). Por otro lado, en este mismo experimento, la suplementación con hidroxitirosol aumentó el ratio omega6/omega3 y el índice de desaturación en los tejidos fetales. El primer indicio podría relacionarse con un aumento del estado pro-inflamatorio; el segundo, con alteraciones en lipogénesis y resistencia a la insulina. Por ello, a pesar del efecto beneficioso de la suplementación materna con hidroxitirosol encontrados en el desarrollo de la presente Memoria de Tesis Doctoral, deben realizarse estudios más específicos que evalúen sus potenciales efectos a largo plazo.

Summary

The Iberian pig, which belongs to the *Sus scrofa meridionalis* or Mediterranean pig type, has been raised for centuries in extensive systems and as a consequence, it has developed a "thrifty" genotype that allows it to adapt to extreme climatic conditions and seasonal cycles of abundance and scarcity of food, typical of the southwest Iberian Peninsula. On the other hand, the breed's rusticity and the scarce genetic selection determine a lower efficiency of its productive parameters compared to other selected cosmopolitan breeds.

However, in recent years, consumer demands for quality meat products has led to the intensification of Iberian pig production systems. Intensive systems increase the profitability of the production process, as they shorten production cycles and reduce the months of life to reach the minimum slaughter weight. However, there are marked differences in the efficiency of the production of the Iberian pig with respect to improved breeds, the most evident being the shorter precocity and longer duration of the production cycle in the Iberian pig.

One of the strategies to increase the productive yields of the Iberian pig raised in intensive has been to improve its reproductive efficiency, mainly its prolificacy, since an increase in prolificacy means an increase in piglet number and, in theory, a greater production of meat per litter and sow. However, reproductive efficiency in pigs, as in other species, depends on numerous factors, both intrinsic (breed, genotype, age, number of births and physiological status) and extrinsic (reproductive management, diet, hygiene and health, time of year and social factors). Alterations in these factors can lead to changes in maternal state and in placental development and function and, consequently, to deficiencies in fetal development and the appearance of intrauterine growth restriction and prenatal programming phenomena. The appearance of intrauterine growth restriction results in the birth of piglets with low body weight, which will reduce their potential for lean growth and increase their predisposition to fattening. In addition, these piglets with low body weight present higher mortality rates and alterations in their development and postnatal metabolism that can affect the quality of their carcasses and meat, thus generating important economic losses for the producer.

These phenomena of intrauterine growth restriction and prenatal programming, common in the porcine species and, more specifically, in the Iberian breed, make necessary the implementation of strategies to minimize its incidence and/or diminish its negative effects.

With this background, the present work tried to deepen in the knowledge of the effect of different individual factors that affect the prenatal development of the Iberian pig, and to determine the effectiveness of the maternal nutritional supplementation with agents that favor the development and the fetal homeorhesis, so as to mitigate the effects of the of intrauterine growth restriction. In recent years, the work of our group has focused on the use of antioxidant agents (specifically hydroxytyrosol) to address this problem, as fetuses affected by intrauterine growth restriction have lower antioxidant capacity and higher oxidative stress.

Three experimental procedures were carried out for this purpose. In all of them, a maternal food restriction was applied to increase the incidence of intrauterine growth restriction and its consequences. Experiments I and II aimed to deepen in the knowledge of the effect of individual factors (genotype, fetal weight and sex, and maternal metabolic state) on prenatal development. In addition, experiment I allowed to establish the most appropriate stage of fetal development for the data collection of this Doctoral Thesis. Finally, the third experimental procedure, which actually consisted of two studies (experiments III and IV), aimed to determine the effectiveness of maternal supplementation with hydroxytyrosol to mitigate the effects of intrauterine growth restriction and prenatal programming.

The results of experiment I, which aimed to study the effect of fetal sex and gestational age on prenatal development in compromised gestations, showed that the maternal metabolic state plays a key role in both fetal development and homeorhesis in the Iberian breed, as well as it has been observed in other breeds and species of mammals. In this sense, the maternal metabolic profile, mainly lipid and regardless of gestational age, affects prenatal development and the lipid and glycemic availability of the fetus. On the other hand, an alteration was observed in the availability of fetal lipids with prolonged maternal undernutrition, being lower in later stages of development, with prolonged undernutrition. This fact can be a consequence of the increase of the fetal lipid peroxidation observed with prolonged maternal undernutrition. This increase in oxidative stress with the progression of maternal undernutrition was related, in turn, to changes in the composition of fatty acids in the fetal muscle; thus, possible alterations in lipogenesis and insulin regulation were observed in fetuses affected by growth restriction.

The results obtained in experiment II, whose main objective was to determine the effect of the genotype, sex and fetal weight on the muscle transcriptome of the Iberian pig, showed that the fetal genotype had a strong impact on the parameters of body development and metabolic state, as well as on the transcriptome of the muscle *longissimus dorsi*, at gestation Day 77. In fact, it was observed that gene pathways related

to muscle development were more active in the lean genotype, even at this early stage of development. In addition, a possible alteration of lipid metabolism was observed in the Iberian breed, supporting the hypothesis that metabolic differences between fat and lean breeds are already established at very early stages of development. Finally, it should be noted that the results obtained from muscle transcriptomic analysis revealed a possible negative regulation of the AMPK pathway in pure Iberian fetuses, possibly related to the high leptin levels characteristic of obese breeds. On the other hand, the experimental design of experiment II allowed, in turn, to determine the role of fetal weight on metabolic parameters in different genotypes and on their muscle transcriptomic profiles. As for the fetal metabolic profile, the results show the importance of the availability of lipids and sugars for the correct fetal development. Specifically, in the case of pure Iberian fetuses, this fact was supported by data obtained from transcriptomic analysis, since both gene expression data and functional interpretation indicate an alteration of lipid metabolism in lower-weight fetuses. In addition, a lower expression of genes related to the growth of the *longissimus dorsi* muscle in pigs was detected, such as *COL9A2* and *MATN1* in lower weight fetuses, regardless of genotype. The results suggest that these genes, as well as many other differentially expressed and regulatory genes, may play an important role in prenatal muscle development in the pig, thus constituting interesting candidate genes related to prenatal growth.

Overall, the results of experiments I and II showed a clear differential effect of fetal sex; Iberian females affected by maternal undernutrition had better adaptive mechanisms than males, which could increase their chances of survival in postnatal life. In addition, compensatory growth mechanisms were more pronounced in females than in males (mainly, greater placental efficiency and greater development of the head and brain or *brain sparing effect*). In agreement with the finding that females had better adaptation to adverse uterine conditions, a greater combination of non-essential fatty acids and better availability of essential fatty acids was observed in Iberian females. In addition, the whole results obtained when analyzing the effect of fetal sex on the composition of fatty acids and muscular transcriptome revealed a possible protection in females to insulin resistance (lower ratio of omega-6/omega-3 and lower expression of the genes *AHSG* and *FETUB*).

Finally, the results of the experimental design III, which includes experiments III and IV and whose objective was to determine the effect of maternal nutritional supplementation with hydroxytyrosol on different parameters of prenatal development, indicated the usefulness of maternal supplementation with hydroxytyrosol in compromised gestations. In this sense, it was observed that hydroxytyrosol supplementation increased fetal antioxidant capacity and decreased lipid peroxidation,

which resulted in an increase in the availability of lipids and fatty acids necessary for fetal development. The effects of maternal supplementation with hydroxytyrosol were strongly modulated by fetal sex; thus, the protective effects of this compound were more evident in males.

However, possible adverse effects of the administration of this compound were also observed, and should be tested before the practical application of the substance. Firstly, despite the evidence of a protective effect of the treatment on the development of male fetuses obtained in experiment III, these animals presented lower body development and, specifically, lower liver development (experiment III) and lower total energy content (experiment IV). On the other hand, in this same experiment, hydroxytyrosol supplementation increased the omega6/omega3 ratio and the rate of desaturation in fetal tissues. The first finding could be related to an increase in the pro-inflammatory state; the second, with alterations in lipogenesis and insulin resistance. Therefore, despite the beneficial effect of maternal supplementation with hydroxytyrosol found in the development of this Doctoral Thesis, more specific studies should be carried out to evaluate its potential long-term effects



1. Introducción

1.1. Origen, distribución geográfica y sistemas de producción del cerdo ibérico

La domesticación del cerdo comenzó de forma independiente en Europa y en China, hace unos 10.000 años (Larson *et al.* 2005; Larson *et al.* 2007); hipótesis que ha podido ser confirmada gracias al empleo de herramientas genéticas moleculares (Larson *et al.* 2007; Megens *et al.* 2008). Aunque existen discrepancias en la clasificación filogenética del cerdo doméstico, la mayoría de autores coinciden en la existencia de cuatro troncos ancestrales dentro del género *Sus*: *scrofa*, *striatosus*, *eusus* y *mediterraneus*. Estos troncos principales han dado lugar, en la actualidad, a las más de 100 razas porcinas domésticas reconocidas y a las 200 variedades no reconocidas como razas (http://www.infocarne.com/cerdo/razas_cerdo.asp).

Por otra parte, el concepto moderno de producción porcina comenzó a desarrollarse en Inglaterra, entre los siglos XVII y XVIII; momento en el cual empezaron a importarse cerdos de razas asiáticas (Porter 1993; White 2011). Es entonces cuando comenzaron los cruces entre las diferentes razas, combinando el gran tamaño pero crecimiento tardío de los cerdos procedentes del norte de Europa, con el crecimiento temprano y mayor contenido graso de las razas asiáticas (White 2011), lo que suponía un mayor aporte de energía para la población en épocas de escasez.

La mayor parte de la producción porcina proviene de razas magras cosmopolitas, altamente seleccionadas, en las que se han llevado a cabo programas de mejora encaminados a obtener un elevado rendimiento magro, una alta prolificidad, un bajo índice de conversión y una gran precocidad (https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1969_12.pdf). Sin embargo, a pesar de sus buenas características productivas, las cualidades organolépticas de sus productos están muy por debajo de las razas rústicas no seleccionadas (Lonergan *et al.* 2001).

Las diferentes variedades, estirpes y líneas que se engloban en la denominación cerdo ibérico proceden del tronco *sus mediterraneus*. *Sus mediterraneus* engloba también a otras razas de relativa importancia económica, como por ejemplo el cerdo Negro Siciliano en Italia y el Alentejano en Portugal.

En el año 1944, Aparicio Sánchez (Laguna Sanz 1998) establece una clasificación específica para el tronco ibérico en el que diferencia las variedades: Negra, Colorada, Rubia y Manchado de Jabugo. Pero es en el año 2007, bajo la Orden Ministerial del 5 de diciembre (Orden APA/3628/2007), cuando se recoge de forma oficial y administrativa

las cinco variedades en las que se divide actualmente la raza ibérica: Retinta, Lampiña, Entrepelado, Torbiscal y Manchado de Jabugo. Actualmente, el cerdo ibérico es la única Raza Autóctona Porcina de Fomento de España.

Los animales utilizados en la presente tesis doctoral pertenecen a la variedad Retinta. La variedad Retinta, originaria de Extremadura, presenta un color de capa rojo muy oscuro y es la más utilizada en la producción de porcino ibérico ya que, en comparación con las variedades de capa negra, presenta menor engrasamiento y mejores rendimientos tanto productivos como reproductivos (Clemente *et al.* 2007 <https://feagas.com/razas/porcino/iberico-retinto/>).

Tradicionalmente, y durante siglos, el cerdo ibérico ha estado asociado a un sistema de manejo extensivo, coexistiendo en perfecta armonía con el ecosistema de la *dehesa* donde cumple un papel fundamental para garantizar la sostenibilidad de este ecosistema. La mayor extensión de dehesa se localiza el suroeste de la península ibérica (Figura 1), y abarca alrededor de 4 millones de hectáreas en España y alrededor de 1 millón en Portugal (allí conocida como *montado*). Este bosque mediterráneo se compone de numerosas especies arbóreas del género *Quercus* (fundamentalmente *Q. rotundifolia*, *Q. ilex* o encina, *Q. suber* o alcornoque, *Q. lusitanicus* o quejigo), de las que se obtiene la bellota; fruto de gran importancia en la producción porcina ibérica. La bellota, junto con la hierba y otros recursos propios de la dehesa, es la fuente de energía principal para el cerdo criado exclusivamente en extensivo o finalizado en montanera.



Figura 1. Distribución geográfica de la dehesa en la península Ibérica (<http://fedehesa.org/distribucion-geografica-de-las-dehesas/>).

En la actualidad existe una marcada tendencia a intensificar la producción del cerdo ibérico, con la finalidad de aumentar los rendimientos productivos. El Real

Decreto 4/2014, posteriormente modificado por el Real Decreto 255/2016, por el que se aprueba la norma de calidad para la carne, el jamón, la paleta, la caña de lomo Ibérico y los productos frescos obtenidos del despiece de la canal, clasifica los animales según su alimentación y manejo, y designación racial.

En función del tipo racial:

- 100% ibérico: cuando los productos proceden de animales con un 100% de pureza racial; al igual que sus progenitores, los cuales deben estar inscritos en el correspondiente libro genealógico.
- Ibérico: en este caso, los productos cárnicos proceden de animales con al menos un 50% de genética ibérica, siendo siempre la madre de raza ibérica pura e inscrita en el libro genealógico. Podemos diferenciar:
 - 75% ibérico: hembra 100% de raza ibérica y machos 50% ibéricos y 50% duroc, ambos inscritos en el libro genealógico.
 - 50% ibérico: hembra 100% de raza ibérica y machos 100% duroc, ambos inscritos en el árbol genealógico.

En función del tipo de alimentación y manejo del animal, los productos se clasifican en:

- “bellota”: todos aquellos productos que proceden de animales mantenidos con alimentación exclusiva con bellota, hierba y otros recursos obtenidos de su manejo en extensivo en ecosistemas de dehesa. El peso mínimo de la canal al sacrificio para estos animales es de 108 kg en individuos 100% ibéricos y 115 en ibéricos y una edad mínima de 14 meses
- “cebo de campo”: todos aquellos productos que proceden de animales que se han alimentado en parte de los recursos propios de la dehesa y en parte con piensos formulados a base de cereales y leguminosas. La explotación puede haberse realizado en extensivo o en intensivo al aire libre. El peso medio de la canal al sacrificio para estos animales, con una edad mínima de sacrificio de 12 meses, debe ser de 108 kg y en animales 100% ibéricos y 115 kg en animales ibéricos.
- “cebo”: todos aquellos productos procedentes de animales criados en sistemas de explotación intensiva alimentados a base de piensos formulados con cereales y leguminosas. En este caso, la edad mínima para el sacrificio desciende a 10 meses, siempre y cuando cumpla con los pesos mínimos de la canal a sacrificio, que de nuevo será de para animales 108 kg en animales 100% ibéricos y de 115 kg en ibéricos.

La mayor parte de los productos ibéricos que se comercializan proceden del cruce ibérico x duroc y de animales alimentados con pienso o de "cebo" (ASICI: http://www.iberico.com/norma_calidad.php).

Los sistemas de producción intensiva aumentan la rentabilidad del cerdo ibérico, ya que permiten acortar los ciclos de producción propios de los sistemas extensivos o semi-extensivos (Buxadé & Daza 2001) y reducir los meses de vida para alcanzar el peso mínimo de sacrificio (de 14-18 meses en los sistemas extensivos a 10 meses en los sistemas intensivos). Sin embargo, existen marcadas diferencias en cuanto a la intensificación de la producción del cerdo ibérico y las razas mejoradas. La diferencia más evidente es la duración del ciclo productivo; en el caso del cerdo ibérico, como hemos comentado antes, se necesitan en torno a 10 meses de vida para lograr los pesos mínimos establecidos para el sacrificio; en el caso de las razas mejoradas pueden alcanzar los 100 kg de peso vivo con 5 meses de vida. Estos periodos productivos tan largos conllevan a su vez, modificaciones en el tipo y cantidad de alimento del cerdo ibérico criado en intensivo.

1.2. Situación actual de la producción y perspectivas de futuro

En España, el sector porcino representa el 12,7% de la producción final agraria y ocupa el primer puesto en cuanto a importancia económica, ya que representa el 36,4% de la producción final ganadera (MAPA; <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/sectores-ganaderos/porcino/default.aspx>). España ocupa el segundo puesto en la Unión Europea (por detrás de Alemania) tanto como productor (con un 17,5% de toneladas producidas) como exportador de porcino y, como productor, ocupa el cuarto puesto a nivel mundial (después de China, EEUU, y Alemania). Además, España ocupa el primer puesto en censo de animales procesados dentro de la Unión Europea con más del 19% del censo comunitario (Figura 2) y superando las 14.000 cabezas en 2019.

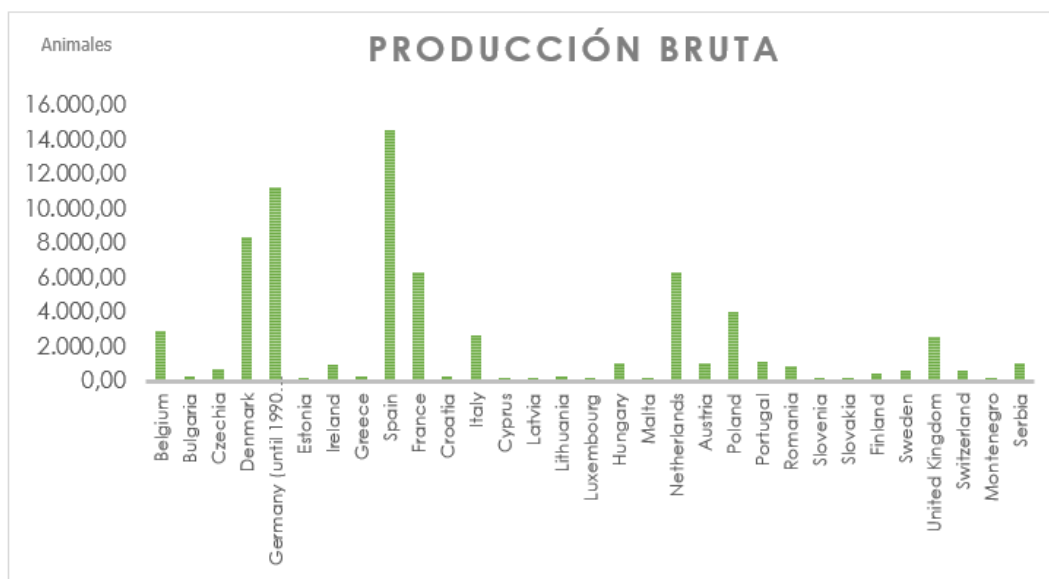


Figura 2. Censo comunitario de la producción de porcino hasta junio de 2019 (Eurostat).

La raza ibérica es de gran importancia e impacto económico en la producción porcina española, mostrando además una evolución positiva en los últimos años. El último censo de campaña completa de 2018 indica un aumento en el número de cabezas de porcino ibérico en casi un 10% con respecto a la campaña anterior, llegando a superar los 3 millones de individuos y siendo Extremadura la Comunidad Autónoma más representativa con 1.268.854 individuos (Tabla 1). Este aumento, tanto en la producción como en la exportación de productos derivados del cerdo, frescos y curados, ha hecho necesaria una intensificación de la producción porcina que incluye el desarrollo de estrategias de manejo, nutricionales y de mejora genética que permitan optimizar al máximo los rendimientos productivos. Sin embargo, las peculiaridades fisiológicas, reproductivas y de manejo propias del cerdo ibérico hacen de ésta una raza con limitaciones para la implantación de sistemas más intensificados.

Censo porcino ibérico				
Comunidad Autónoma	2016	2017	2018	Diferencia
Madrid	262	272	300	28
Castilla y León	803.067	821.436	856.824	35.388
Castilla la Mancha	87.787	115.305	172.950	57.645
Extremadura	1.239.549	1.173.184	1.268.854	95.670
Andalucía	717.481	721.338	752.733	31.395
Total	2.848.146	2.831.535	3.051.661	220.126

Tabla 1. Censo de ganado porcino ibérico en España de los últimos tres años divididos por Comunidad Autónoma (Fuente: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación; MAPA).

1.3. Peculiaridades fisiológicas de la raza ibérica

Como se ha comentado anteriormente, el cerdo ibérico desciende del tronco *mediterraneus*, lo que lo aleja tanto fenotípicamente como en parámetros productivos, metabólicos o reproductivos de las razas porcinas descendientes de los troncos *scrofa*, *striatosus* y *eusus*. Además, el cerdo ibérico ha sido objeto de escasa selección genética y muestra una fuerte influencia del manejo en extensivo en que ha sido mantenido tradicionalmente. En este sentido, las características morfológicas de cerdos mediterráneos encontrados en las ruinas de Pompeya, ciudad destruida por la erupción del Vesubio en el año 79 de nuestra era (**Figura 3**), son muy similares a las de los cerdos ibéricos que encontramos hoy en día en nuestro país.



Figura 3. Restos de cerdos encontrados bajo la lava en la ciudad de Pompeya tras la erupción del Vesubio.

El hecho de que el cerdo ibérico, y otras razas mediterráneas, hayan sido mantenidas en sistemas extensivos durante siglos ha supuesto que desarrollen un genotipo "ahorrador", que les permite adaptarse a los ciclos estacionales de abundancia y escasez de alimento a los que están expuestos en su entorno. Este genotipo *ahorrador* actúa como un mecanismo de adaptación a su medio ambiente, de modo que permite la acumulación de grasa durante las épocas de abundancia (primavera y otoño) para así poder afrontar las épocas de escasez de alimentos (verano e invierno; Neel 1962). La hipótesis del genotipo *ahorrador* fue desarrollada para la especie humana en 1962 (Neel 1962), a partir de estudios sobre la epidemia de obesidad y diabetes *mellitus* o tipo 2 en los indios Pima de Norteamérica (Neel 1999). Neel sospechaba que esta enfermedad tan común y perjudicial tenía una base genética, y

buscaba explicar cómo la selección natural favorecía estos genes con efectos perjudiciales. La explicación se basó en que los genes que predisponen a la diabetes (llamados genes ahorradores), eran históricamente ventajosos pero perjudiciales en la vida moderna (Neel 1999). Es decir, los cambios genéticos que constituyen la base del genotipo ahorrador tienen como objetivo el acúmulo de reservas durante las épocas de abundancia de alimentos para sobrevivir en épocas de escasez, favoreciendo la deposición grasa y la resistencia a la insulina. Sin embargo, estos cambios son perjudiciales en caso de abundancia continuada de alimentos y escasez de ejercicio.

1.3.1. Perfil hormonal y metabólico

El cerdo ibérico presenta genotipo ahorrador, con una elevada capacidad de adaptación al medio según épocas de abundancia o escasez, y, como consecuencia, de acumulación de grasa como reservorio energético. Además de la elevada deposición grasa, el cerdo ibérico se caracteriza por presentar una baja deposición proteica si la comparamos con razas mejoradas (Barea *et al.* 2007). Este hecho hace del cerdo ibérico un animal con un marcado perfil lipogénico y un crecimiento lento. Sobre la capacidad individual de deposición de proteína intervienen factores genéticos involucrados en la regulación de la actividad hormonal que regula sus características metabólicas. En este sentido, en estudios llevados a cabo por Fernández-Figares y col. (Fernandez-Figares *et al.* 2007), se observaron claras diferencias en el perfil hormonal de cerdas de las razas ibérica y landrace. Los niveles séricos de insulina, factor de crecimiento asociado a insulina (IGF-I) y leptina resultaron más elevados en la raza ibérica que en la raza landrace. El sistema IGF-I (junto con la hormona de crecimiento GH), y sus proteínas asociadas y receptores, actúan como un sistema multinivel hormonal llamado eje somatotrópico, el cual es considerado como una ruta clave que regula el desarrollo muscular (Tomas *et al.* 1992; Breier 1999).

La insulina es la hormona anabólica por excelencia. Es producida exclusivamente por las células pancreáticas y se secreta tras la ingesta de alimento, en respuesta a determinados nutrientes como glucosa, ácidos grasos (AG) y aminoácidos. Además de su acción lipogénica y glucopénica en sangre, la insulina tiene una acción anorexigénica a nivel hipotalámico; así, niveles elevados de ésta hormona actúan reduciendo el apetito (Schwartz *et al.* 1992; Sipols *et al.* 1995). Sin embargo, la llamada *resistencia a la insulina* es un estado en el que el cerebro no responde a las concentraciones fisiológicas de esta hormona, provocando una desregulación de la homeostasis celular y de funciones metabólicas y cognitivas (Cetinkalp *et al.* 2014; Arnold *et al.* 2018). Por tanto, puede definirse la *resistencia a la insulina* como una

reducción de la respuesta de los tejidos a la acción de ésta, con una consecuente hiperinsulinemia compensatoria.

Por otro lado, la leptina (también conocida como proteína ob) fue la primera adipoquina identificada y que desempeña un papel indispensable en el control de la ingesta de alimentos y el gasto de energía y, por tanto, en el control del peso corporal, ya que interviene en la señal-respuesta llevada a cabo entre el tejido adiposo y el hipotálamo (Friedman & Halaas 1998). En el metabolismo energético, la leptina secretada por los adipocitos actúa a nivel hipotalámico por la interacción con su receptor (*LEPR*); lo que conlleva un aumento del gasto de energía (por aumento del metabolismo corporal y de la temperatura corporal) y de actividad física, así como una reducción del apetito (por la acción de péptidos anorexigénicos; (Margetic *et al.* 2002). Sin embargo, los genotipos obesos (como es el caso del cerdo ibérico) se caracterizan por desarrollar *resistencia a la leptina*, observándose un aumento de los niveles plasmáticos de ésta hormona sin su esperable efecto anorexigenico; este hecho está relacionado con alteraciones en los receptores hipotalámicos (Druker 2005).

En concreto, esta desregulación entre señal y respuesta podría estar relacionada, en el cerdo ibérico, con el polimorfismo *LEPR*c.1987C>T que, a su vez, está fuertemente asociado con caracteres de deposición grasa y crecimiento (Ovilo *et al.* 2002; Ovilo *et al.* 2005). Parece que este polimorfismo está relacionado con el nivel de expresión hipotalámico del gen que codifica el receptor de leptina (*LEPR*) (Ovilo *et al.* 2010). De hecho, los resultados de este estudio demuestran que el alelo T de este polimorfismo se asocia con una reducción de la expresión del gen *LEPR*, probablemente debido a un cambio en la estructura secundaria del ARN mensajero que comprometería la estabilidad de éste, así como modificaciones en la expresión de otros neurotransmisores hipotalámicos involucrados en el control del balance energético. Como consecuencia de los cambios en la expresión génica (tanto a nivel hipotalámico como muscular), relacionados principalmente con variaciones tanto estructurales como funcionales en el gen receptor de la leptina, se produce una desregulación en el equilibrio apetito/saciedad. Este hecho potencia la acumulación de grasa como reservorio energético.

1.3.2. Crecimiento y deposición del tejido adiposo

El crecimiento y la deposición grasa son algunos de los aspectos fisiológicos más estudiados en la especie porcina, debido a su gran impacto en los beneficios económicos del sector. Son numerosos los factores individuales que influyen sobre estos parámetros; entre ellos, destacan la edad, el sexo y la raza (Ayuso *et al.* 2016; Vázquez-

Gómez *et al.* 2018). Igualmente, factores ambientales como la cantidad y composición de la dieta (tanto en estadios prenatales como postnatales), la temperatura o las horas de luz, entre otros, repercuten en el contenido graso del animal y en su crecimiento (da Costa *et al.* 2004; Doran *et al.* 2006). La deposición grasa, además de afectar a parámetros productivos, tiene un impacto importante sobre el estado de salud y el bienestar del animal y sobre las características sensoriales de sus productos. Por todo ello, es de gran interés el conocimiento de todos aquellos factores susceptibles a selección que permitan mejorar tanto los rendimientos como la calidad de los productos finales.

1.3.2.1. Tipos de depósitos grasos

Podemos diferenciar tres grandes tipos de depósitos grasos: grasa subcutánea (que constituye un 60-70% del total de los depósitos grasos), grasa visceral (10-15%) y grasa inter- e intramuscular o GIM (20-25%) (Gerbens 2004). Los dos depósitos grasos más estudiados y que mayor interés despiertan son la grasa subcutánea, por representar una gran proporción del peso de la canal, y la GIM, por estar estrechamente relacionada con las características organolépticas y la calidad de los productos frescos y curados. Se ha podido comprobar que las células grasas que se encuentran en ambos depósitos presentan diferencias en cuanto a los procesos de adipogénesis y lipogénesis. De este modo, los pre-adipocitos presentes en la GIM comienzan su diferenciación de forma más tardía que los presentes en la grasa subcutánea dorsal (Gondret *et al.* 2008; Wang *et al.* 2013). Además, los adipocitos presentes en la grasa subcutánea dorsal son capaces de almacenar más lípidos y de forma más rápida que los presentes en la GIM (Zhou *et al.* 2010; Kouba & Mourof 2011).

Si bien existen niveles de infiltración grasa tan elevados que pueden llegar a constituir un factor de rechazo por parte del consumidor, en general, en el cerdo ibérico se considera que cuanto mayor es el contenido en GIM, de mayor calidad será el producto. La infiltración grasa aumenta la calidad organoléptica del producto y además, permite una atenuación de la sal de curado, haciendo que ésta no interfiera en el desarrollo y percepción del sabor y el aroma, y además, asegura una curación lenta y de mejor calidad. Por otro lado, la medición del espesor de la grasa dorsal puede ser un indicador del bienestar del animal (desnutrición o sobrealimentación; (Barnett *et al.* 2001), y permite predecir la cantidad total de lípidos corporales (Nieto *et al.* 2013).

Pero el tejido adiposo no es únicamente un depósito de energía, sino que, además, presenta una importante actividad endocrina, secretando numerosas moléculas al torrente sanguíneo. Estas sustancias, conocidas como adipoquinas

(hormonas, citoquinas y factores de crecimiento), modulan la función de otros órganos y regulan numerosos procesos fisiológicos como el balance energético y el equilibrio apetito/saciedad, la sensibilidad a la insulina, presión arterial o reproducción (Ahima & Flier 2000; Caprio *et al.* 2001). Es por ello que el proceso de formación del tejido adiposo, conocido como adipogénesis, despierta gran interés tanto en medicina humana como en producción animal debido a su gran impacto sobre la salud y sobre parámetros productivos y de calidad del producto final.

1.3.2.2. Adipogénesis

La adipogénesis es el proceso por el cual las células grasas inmaduras o pre-adipocitos se convierten en células grasas maduras o adipocitos, que junto a otros tipos celulares formarán el conocido tejido adiposo. Existen cinco tipos de células grasas (Sánchez *et al.* 2016):

- **Adipocito pardo:** Su función principal es la de generar calor a partir de su almacenamiento lipídico gracias a la expresión de la proteína desacoplante 1 (UCP-1; (Rosenwald & Wolfrum 2014)). Esta proteína está presente en las mitocondrias del tejido adiposo pardo, y su función es la de generar calor mediante termogénesis, siendo así la principal fuente de calor en mamíferos recién nacidos e hibernantes (Blondin 2014).
- **Adipocito blanco:** es el tipo más abundante y constituye el tejido adiposo blanco, el mayor reservorio energético de los mamíferos; estos adipocitos no expresan la proteína UCP-1 (Rosenwald & Wolfrum, 2014) y, por tanto, no actúan como fuente de calor. Su función principal será la síntesis, acumulación y metabolismo de triglicéridos, aunque también actúa como adipoquina, produciendo sustancias de acción autocrina, endocrina y paracrina (ej: leptina). Es el principal efector de los procesos de lipogénesis y lipólisis, regulados por diversos agentes hormonales y bajo la influencia de otros órganos y sistemas (Proenca 2014).
- **Adipocito beige o "brite":** Es un tipo especial de adipocito blanco, con múltiples vacuolas lipídicas y capaz de expresar UCP-1 (Walden *et al.* 2012). Se localiza en el tejido adiposo blanco y su formación viene determinada por la exposición a temperaturas bajas o por la estimulación de receptores β_3 adrenérgicos (Wu *et al.* 2012). Los receptores β_3 adrenérgicos se localizan en el tejido adiposo, y la estimulación de éstos conlleva un aumento de la termogénesis en los tejidos

adiposos blanco y pardo, aumenta la lipólisis y reduce el contenido graso (Ozonas 2014).

- **Adipocito rosa:** Son adipocitos que se encuentran exclusivamente en las glándulas mamarias de hembras en lactación (Giordano *et al.* 2014). Se forman a partir de la transdiferenciación de los adipocitos blancos (Giordano *et al.* 2014) y son capaces de almacenar grandes cantidades de grasa, además de producir adipoquinas como la leptina (Wang *et al.* 2011) o la proteína S100b, con un aparente efecto neurotrófico en lactantes a concentraciones fisiológicas (Gazzolo *et al.* 2004; Gonçalves *et al.* 2010).
- **Célula estrellada hepática (CEH):** también conocidas como células de Ito o lipocito hepático, presentan un fenotipo dual. En estado fisiológico presentan un fenotipo quiescente con numerosas vacuolas llenas de vitamina A. Este estado fisiológico presenta una función muy importante en la regulación de la homeostasis de la matriz extracelular (Weiskirchen & Tacke 2014) mediante la producción de apolipoproteínas, prostaglandinas, factores de crecimiento y citoquinas (Friedman 2000). El segundo fenotipo es el de activación, el cual es desencadenado por una lesión tisular consecuente a una alteración metabólica o inflamatoria (Mederacke *et al.* 2013). En este estado, pierde las vesículas grasas y comienza a secretar determinadas sustancias con función endocrina y paracrina como la desmina (Weiskirchen & Tacke 2014). A medida que la lesión se cronifica, se produce una desregulación de la homeostasis lipídica, generándose resistencia a la insulina, respuesta proinflamatoria y finalmente fibrogénesis (Carpino *et al.* 2013). Este fenómeno está comúnmente asociado a la obesidad y a la hiperleptinemia (Zhai *et al.* 2013).

La diferenciación e interacción de los diferentes tipos de adipocitos viene representada en la figura 4.

En la especie porcina, pueden encontrarse adipocitos desde el inicio del último tercio de gestación (día 75 de gestación aproximadamente; (Walden *et al.* 2012), aunque la mayor expansión adipocitaria se produce en el momento del nacimiento. La adipogénesis es un proceso continuo que depende en gran medida de factores ambientales y, principalmente, de la alimentación del animal (Margareto *et al.* 2001). Numerosos genes están involucrados en la formación adipocitaria, de modo que unos son activados (característicos de los adipocitos) y otros inhibidos por la acción de factores de transcripción propios del proceso de adipogénesis (Farmer 2006; Ma *et al.* 2015).

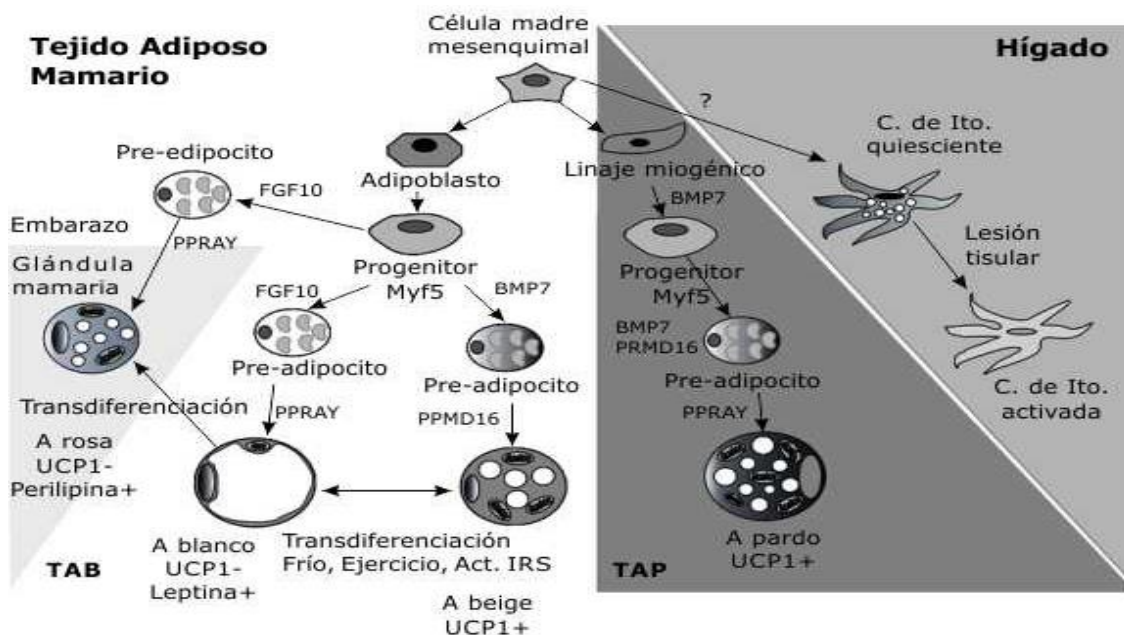


Figura 4. Diferenciación e interacción entre los diferentes adipocitos en mamíferos. (Fuente: Sánchez et al. 2016). UCP-1: *uncoupling protein 1*. FGF: *fibroblastic grow factor*. BMP-7: *bone morphogenetic protein 7*. PGC1: *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1*. PPARγ: *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*. PRDM16: *PR domain contain 16*. C: células. A: adipocito. TAB: tejido adiposo blanco. TAP: tejido adiposo pardo. Act: activación. IRS: *insulin receptor substrate*.

1.3.2.3. Regulación génica de la adipogénesis

Como hemos comentado anteriormente, la adipogénesis es un proceso complejo, con numerosos genes y factores de transcripción involucrados en la diferenciación celular de pre-adipocito a adipocito maduro (Farmer 2006). Los principales factores de transcripción y adipocinas involucrados en el proceso de adipogénesis están representados en la figura 5. Entre los factores de transcripción más importantes y mejor estudiados se encuentran los pertenecientes a la familia *CCAAT-enhancer binding protein (C/EBP)* y a la familia *peroxisome activated receptors (PPAR;* (Rosen & MacDougald, 2006)).

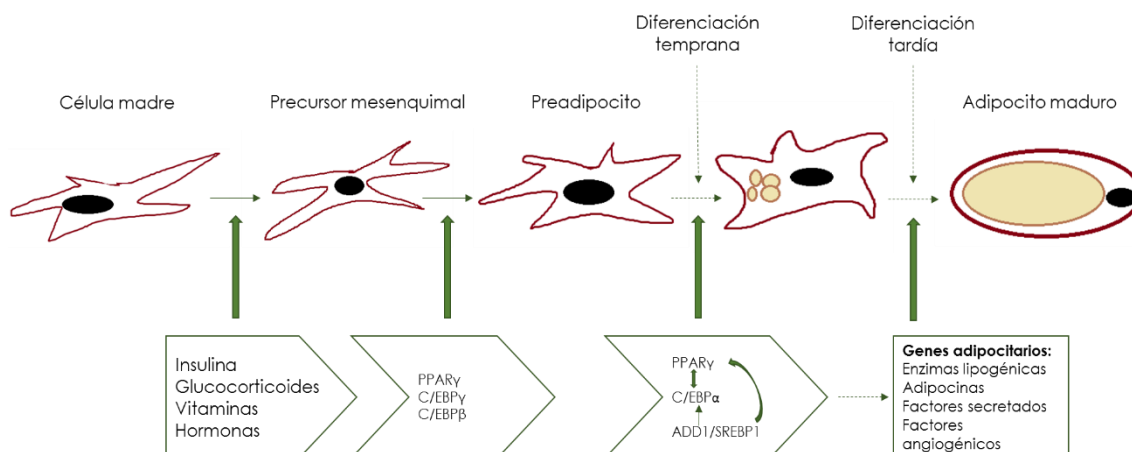


Figura 5. Representación esquemática de los diferentes estadios celulares y los principales factores de transcripción involucrados durante la adipogénesis.

El proceso de adipogénesis se inicia gracias a la acción de determinados factores presentes en el torrente sanguíneo, como son insulina, glucocorticoides, vitaminas u hormonas tiroideas. Una vez que las células madre han sido activadas y se diferencian en precursores mesenquimatosos, comienza la acción de los factores de transcripción de las familias PPARs y C/EBPs. Estos actuarán hasta la fase de diferenciación terminal y coordinarán la red de expresión génica y proteica involucrada en establecer las características fenotípicas propias del adipocito maduro ($\alpha P2$, *GLUT4*, *SCD1*, *PEPCK* o *LEP*; (Rosen & Spiegelman 2000)).

Los factores de transcripción de la familia PPAR activan la expresión de genes involucrados en numerosos procesos, incluido el metabolismo lipídico y glucídico (Patsouris *et al.* 2006). Concretamente, la isoforma PPAR γ es esencial en la activación del proceso de adipogénesis (Rosen & Spiegelman 2000), no conociéndose ningún otro factor adipogénico capaz de inducir el proceso en ausencia de PPAR γ (Rosen & MacDougald 2006). Por otro lado, la isoforma C/EBP α actúa de forma sinérgica con PPAR γ en la coordinación del proceso de diferenciación del adipocito (Rosen & MacDougald 2006). Existen muchos genes inducidos en las siguientes fases de diferenciación; entre ellos destacan glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (*GDPH*), lipasa sensible a hormonas (*LIPE*), ácido graso sintasa (*FASN*), acetil CoA carboxilase (*ACACA*), enzima málica (*ME*), proteínas de unión de ácidos grasos (*FABP*), perilipina (*PLIN*); y también adipoquinas como leptina (*LEP*), adiponectina (*ADIPOQ*), adipina (*CFD*), factor de necrosis tumoral (*TNF*), visfatina (*NAMPT*) o proteína de unión al retinol 4 (*RBP4*) (Gregoire 2001). Concretamente, durante la diferenciación terminal, actúa la proteína de unión al elemento de regulación del esteroide (*SREBP1*), la cual permite la acumulación lipídica y la expresión de genes específicos del adipocito maduro relacionados con la biosíntesis y oxidación de AG como *SCD*, *CPT1*, *ACSL1*, *PPAR* entre otros (Scheideler *et*

al. 2008). Además de estos genes, el adipocito maduro es capaz de producir factores angiogénicos que permiten la vascularización del nuevo tejido (Cao 2007).

Las razas grasas, entre las que se encuentra el cerdo ibérico, presentan mayor engrasamiento y, por tanto, mayor diferenciación adipocitaria, que las razas blancas mejoradas (Puig-Oliveras *et al.* 2014). Este hecho influye sobre las características diferenciales de la canal del cerdo ibérico y las razas blancas (Tabla 2).

	IBÉRICO	CERDOS BLANCOS
Espesor del tocino dorsal (mm)	71	15-20
% magro en la canal	27,3	50-55
% grasa en la canal	55,4	25-28

Tabla 2. Características diferenciales de la canal entre el cerdo ibérico y los cerdos blancos (fuente: Mayoral *et al.* 1999).

Además, la raza ibérica presenta un metabolismo lipídico alterado, con mayor acumulación de grasa como reservorio energético y con mayor concentración de lípidos en plasma (colesterol y triglicéridos; (Torres-Rovira *et al.* 2013a; Ayuso *et al.* 2015a). El genotipo, por tanto, es uno de los principales factores que determinan la capacidad adipogénica del animal. La mayor parte de los estudios realizados en porcino, especialmente en ibérico, se han llevado a cabo en estadios de desarrollo postnatal. Sin embargo, son escasos los estudios realizados en estadios prenatales y se desconoce en qué momento del desarrollo comienzan a fijarse las diferencias en cuanto a características definidas por el genotipo del animal.

1.3.2.4. Lipogénesis, lipólisis y β -oxidación

El cerdo, al ser un animal monogástrico, no es capaz de modificar sustancialmente los AG presentes en la dieta, por lo que la composición de los diferentes depósitos grasos será un reflejo importante de la alimentación del animal. No obstante, una parte de la composición de los depósitos grasos estará determinada por la síntesis endógena (lipogénesis) y por la lipólisis y β -oxidación, ya que las dietas tradicionales del ganado porcino se caracterizan por un escaso contenido en grasa. De hecho, la síntesis *de novo* de AG representa el 86% del total de ácidos grasos no esenciales (AGNE) depositados en el cerdo en crecimiento (Kloareg *et al.* 2007).

La lipogénesis es el proceso bioquímico por el cual se forman los AG de cadena larga esterificados con glicerol que formarán los triacilgliceroles (TAG) o grasas de reserva en el citoplasma celular. Este proceso de *síntesis de novo*, crucial y estrictamente regulado, ocurre principalmente en el citoplasma de adipocitos y hepatocitos (Figura 6), aunque también se ha podido comprobar que existe una lipogénesis *de novo* en el tejido muscular (Wang *et al.* 2013).

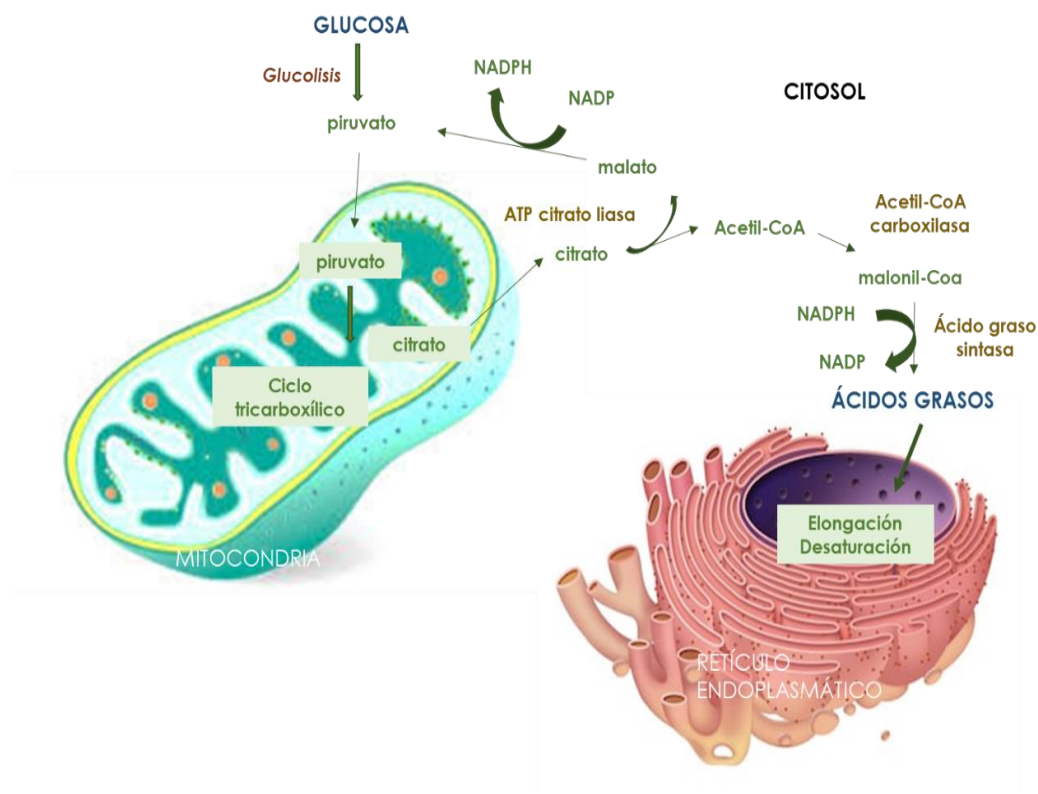


Figura 6. Representación esquemática del proceso de lipogénesis de novo a partir de glucosa (Fuente: Herman & Barbara 2012).

La principal misión de la lipogénesis de novo es convertir en lípidos los carbohidratos no almacenados como glucógeno en el hígado, considerados una fuente de energía más eficiente (Hellerstein 1999), así como mantener y controlar la correcta homeostasis energética mediante la comunicación entre tejidos periféricos (como por ejemplo tejido muscular y adiposo) y tejidos oxidativos (como el hígado o el páncreas).

Los principales sistemas enzimáticos implicados en la lipogénesis son:

- **Acetil coenzima A carboxilasa:** convierte el acetil-CoA en malonil-CoA, requiriendo para ello NADPH, ATP, ion manganeso, biotina, ácido pantoténico y HCO_3^- , como cofactores. En el cerdo, como mamífero monogástrico, la principal fuente de acetil-CoA es la degradación de la glucosa procedente de la dieta (Hellerstein 1999).
- **Ácido graso sintasa:** se trata de un complejo enzimático de una sola cadena polipeptídica que cataliza seis reacciones sucesivas, que conlleva la síntesis de ácido palmítico a partir de una molécula de acetil-CoA y 7 de malonil-CoA. Este constituiría en sí el primer paso de la síntesis de AG, ya que a partir del palmítico se sintetizan el resto de AG saturados e insaturados (excepto los AG esenciales) por la acción de enzimas elongasas y desaturasas (Angosto & Villarejo 2014).

- **Elongasas y desaturasas:** estas enzimas se localizan en el retículo endoplasmático y son las encargadas de transformar el ácido palmítico en los diferentes AG. El perfil de AG grasos sintetizados *de novo* será diferente según la batería de enzimas presente en cada tejido (Angosto & Villarejo 2014).

Al igual que la adipogénesis, la lipogénesis *de novo* es un proceso estrechamente regulado por numerosos factores de transcripción, entre los que destacan el receptor X hepático (LXR), la proteína 1c de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP-1c) y la proteína de unión al elemento de respuesta a carbohidratos (ChREBP) (Kim & Spiegelman 1996; Shimano *et al.* 1997). Aunque el papel de este último en la activación de la lipogénesis es muy controvertido, algunos estudios relacionan a SREBP-1c y ChREBP con la regulación de la expresión de los genes acetil-CoA carboxilasa (ACC), ácido graso sintetasa (FAS), acetil-CoA sintetasa (ACSS) y ATP-citrato liasa (ACL), genes clave para la activación de la lipogénesis (Shimano *et al.* 1999; Dentin *et al.* 2004). Estos estudios muestran que, por un lado, la glucosa estimula la expresión de ChREBP y LXR, y éstos a su vez la expresión de ACL, FAS, y SCD1 en hígado (Musso *et al.* 2009), mientras que la insulina es la encargada de estimular SREBP-1c.

Por otro lado, la lipólisis es un proceso catabólico por el que los TAG son hidrolizados por la acción de la lipasa, liberándose AG y glicerol al torrente sanguíneo para ser posteriormente transportados a las células. Se produce principalmente en el tejido adiposo subcutáneo, siendo éste el principal contribuyente de la formación de ácidos grasos libres (AGL; (Mittendorfer *et al.* 2009). Por tanto, es la primera etapa de la degradación y movilización lipídica y se encuentra estimulada por la necesidad energética de los tejidos periféricos. En ella, aquellos AG de cadena larga cuya finalidad es la obtención de energía utilizarán la vía de la L-carnitina; por el contrario, los de cadena corta entrarán directamente a la mitocondria vía β -oxidación (Figura 7).

La β -oxidación es un proceso catabólico que tiene lugar dentro de la mitocondria y cuya finalidad es la obtención de energía a partir de los TAG hidrolizados (Saponaro *et al.* 2015). Es un proceso que, de forma general, ocurre durante el ayuno o en dietas bajas en carbohidratos. Algunos autores sugieren que un aumento de las concentraciones de L-carnitina podría reducir el contenido en grasa de la canal (Heo *et al.* 2000; Owen *et al.* 2001; Saponaro *et al.* 2015). Uno de los precursores de la formación de la L-carnitina es la lisina; de este modo una suplementación con lisina, supondría una mayor síntesis de L-carnitina y, por tanto, una mayor tasa de degradación de AG, reduciendo de éste modo el contenido graso (Katsumata *et al.* 2005).

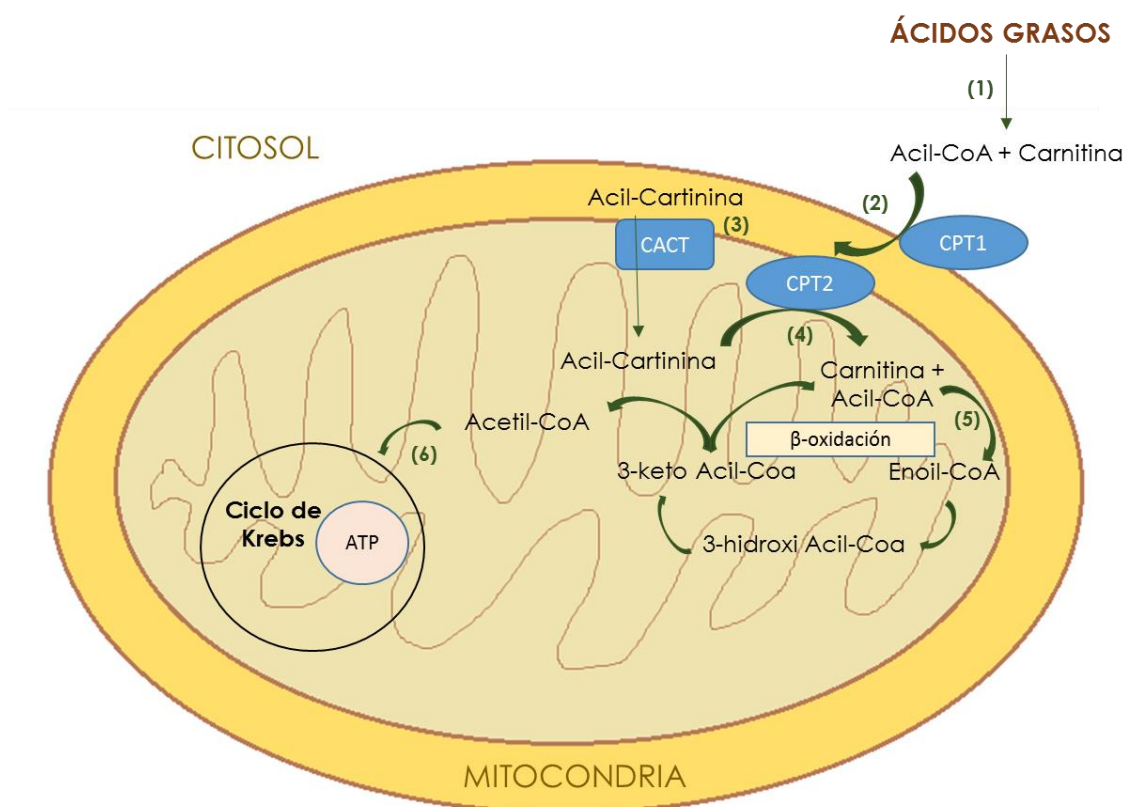


Figura 7. Representación gráfica de la β -oxidación. (1) Los ácidos grasos son transformados en Acetil-Coa en el citosol; (2) La proteína Carnitina Palmitoil Transferasa-1 (CPT1) cataliza la transferencia del grupo acilo de un Acil-CoA grasos de cadena larga a carnitina para formar acilcarnitinas (principalmente palmitoil carnitina); (3) La Carnitina Aciltransferasa (CACT) transfiere la Acil-Carnitina a través de la membrana mitocondrial externa; (4) La Carnitina Palmitoil Transferasa-2 (CPT2) reconvierte la Acil-Carnitina en Acil-CoA y Carnitina; (5) Acil-CoA entra en el ciclo de oxidación y se degrada en varias moléculas de Acetil-CoA; (6) Acetil-CoA entra en el ciclo de Krebs para producir energía como trifosfato de adenosina (ATP).

Un correcto balance entre lipogénesis y lipólisis repercutirá sobre la acumulación lipídica en los diferentes tejidos. Estudios en la especie humana revelan que un aumento en los procesos de lipogénesis deriva en un exceso de síntesis de TAG hepáticos, lo que provoca disfunción hepática no alcohólica (esteatosis hepática no alcohólica; NASH) y diabetes (Cai *et al.* 2005; Donnelly *et al.* 2005; Flannery *et al.* 2012; Ma *et al.* 2015). Además, tasas elevadas de lipogénesis *de novo* han sido relacionadas con concentraciones altas de glucosa e insulina postprandial, así como procesos inflamatorios (Bechmann *et al.* 2012).

1.3.2.5. Importancia de la grasa intramuscular y el perfil de ácidos grasos

La grasa intramuscular (GIM) es uno de los depósitos grasos más importantes y mejor estudiados por sus implicaciones en producción animal y, por tanto, en la industria

cárnica. Se localiza entre y dentro de las fibras musculares y se compone principalmente de TAG, fosfolípidos, colesterol y AGL (Hocquette *et al.* 2010). Los TAG (fracción de lípidos neutros) y los fosfolípidos (fracción de lípidos polares) son los principales constituyentes de la GIM; la contribución del resto de lípidos es solo marginal. Este depósito graso influye notablemente en las características sensoriales y nutricionales de la carne (Ventanas *et al.* 2005), y es considerado como un criterio de selección por la Asociación Española de Criadores de Cerdo Ibérico (AECERIBER: <http://www.aeceriber.es/>). Por otro lado, el perfil de AG presente en el tejido adiposo en general, y concretamente en la GIM, es también un factor importante que afecta a las características de la carne. De hecho, se sabe que la firmeza de la carne está estrechamente relacionada con el punto de fusión de la grasa y éste, a su vez, con el balance de ácidos grasos saturados o SFA (punto de fusión a temperaturas altas) y ácidos grasos poliinsaturados o PUFA (punto de fusión a temperaturas bajas; (Wood *et al.* 2008)). Algunos autores han observado que el punto de fusión de la grasa de cerdo se ve influenciado más concretamente por la concentración de los ácidos esteárico (C18:0) y linoleico (C18:2 n-6; (Bote *et al.* 2000; Wood *et al.* 2008)). No obstante, otros autores sugieren que el AG con mayor influencia sobre el punto de fusión de la grasa en el cerdo ibérico es el ácido oleico (C18:1 n-9; (Segura *et al.* 2015)). El ácido oleico aparece en proporciones muy elevadas en la grasa de cerdo ibérico (Serra *et al.* 1998; López-Bote *et al.* 2000; Barea *et al.* 2013), lo que determina que la temperatura de fusión sea bastante baja (20-25°C). Otra característica del aspecto "al corte" de los productos del cerdo Ibérico, como es su intenso brillo, deriva también de la elevada proporción de grasa intramuscular y de la fluidez de ésta (Gómez-Nieves & Robina 2005).

La composición de la GIM es también muy importante en aspectos relacionados con la salud humana. De este modo, entre las recomendaciones para reducir el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, la *American Health Association*, establece que el consumo de grasa total no debería superar el 30% de la ingesta diaria; del ella, menos del 10% debería estar representado por SFA (Krauss *et al.* 2000). También debe tenerse en cuenta la importancia del equilibrio $\sum n-6/\sum n-3$, cuyos precursores son el ácido linoleico (C18:2 n-6) y el α -linolénico (C18:3 n-3) respectivamente. En la dieta humana se recomienda que este ratio se sitúe en torno a una proporción 4:1 (Ulbricht & Southgate 1991; Jimenez-Colmenero *et al.* 2010). Sin embargo, aunque desde el punto de vista nutricional parece ser favorable aumentar la proporción de PUFA, un aumento excesivo de éstos AG en el tejido muscular y graso, perjudica las características sensoriales de la carne (Lawrence & Fowler 1997). Así, un excesivo contenido en PUFA conlleva un enranciamiento de la grasa y una disminución de su consistencia, que está principalmente asociada al cociente esteárico/linoleico (Cava *et al.* 1999).

La cantidad y composición de la GIM se encuentra fuertemente influida por el genotipo; pudiéndose encontrar diferencias muy importantes entre razas e incluso entre estirpes (Muriel *et al.* 2004). De hecho, se sabe que las razas autóctonas europeas, además de presentar mayor contenido graso que las razas mejoradas, presentan un perfil de AG diferente (Pugliese & Sirtori 2012).

Las diferencias, en cuanto a contenido graso, entre las razas mejoradas y el cerdo ibérico son muy marcadas, de modo que un mayor engrasamiento de la canal del cerdo ibérico empeora sus características productivas, aunque mejora las características nutricionales y organolépticas del producto final. La introducción de la raza duroc en la producción del cerdo ibérico ha supuesto disminuir los ciclos productivos y aumentar el tamaño de la canal. Sin embargo, también ha supuesto una disminución de la calidad y cantidad de la GIM. En estudios anteriores, se pudieron observar diferencias en cuanto al % de GIM entre cerdos ibéricos puros y cruzados con la raza duroc-jersey en diferentes tejidos y a diferentes edades, resultando siempre un mayor contenido de GIM en la raza ibérica (Ovilo *et al.* 2014a; Ayuso *et al.* 2015a; Ayuso *et al.* 2016).

Por otro lado, hemos de tener en cuenta que la cantidad y composición de la GIM viene determinada por la regulación de numerosos genes. Muchos de ellos ya son considerados como genes candidato relacionados con la síntesis y metabolismo de los ácidos grasos (lipogénesis y lipólisis). Entre ellos podemos mencionar a *SREBP-1c*, *ChREBP*, *LXR*, *ACACA*, *FASN*, *FAS*, *ACC*, *SCD1*, *ME1*, *ELOVL6*, *FABP4*, *DGAT*, *CPT-1*, *AdPLA*, *ACSL4* o *ACOX1* (Singh *et al.* 1992; Nechtelberger *et al.* 2001; Cronan & Waldrop 2002; Horton *et al.* 2002; de Sousa *et al.* 2005; Damon *et al.* 2006; Kim *et al.* 2011; Corominas *et al.* 2013; Skiba *et al.* 2013; Tuohetahunttila *et al.* 2015).

Además de los genes relacionados con la regulación de la acumulación lipídica dentro de los adipocitos, hemos de mencionar aquellos genes candidato relacionados con la diferenciación adipocitaria (adipogénesis). Entre ellos, destacan *PPARG*, *RXR α* , *RARA*, *CEBPA*, *CEBPB*, *ASXL2*, *DLK1*, *EGR2*, *KLF5*, *LIPE*, *ME*, *PLIN* y *ADIPOQ* (Tontonoz *et al.* 1994; Darlington *et al.* 1998; Rosen *et al.* 1999; Chen *et al.* 2005; Oishi *et al.* 2005; Park *et al.* 2011).

Estudios transcriptómicos en los que se comparan razas de cerdo magras con razas grasas han mostrado una sobreexpresión de muchos de estos genes en aquellas razas con mayor capacidad adipogénica (Puig-Oliveras *et al.* 2014; Ayuso *et al.* 2015a; Ayuso *et al.* 2016). Del mismo modo, cerdos ibéricos puros presentan una mayor expresión de genes, enzimas lipogénicas y desaturasas relacionados con la

acumulación grasa que cerdos cruzados con duroc (Ovilo *et al.* 2014a; Ayuso *et al.* 2016) en diferentes tejidos y a diferentes edades.

1.3.2.6. *Importancia de la cantidad y el tipo de fibra muscular*

El estudio de los mecanismos y factores involucrados en el crecimiento y desarrollo del músculo esquelético (miogénesis), de forma similar a aquellos que intervienen en cantidad y composición de la GIM, despierta gran interés en la industria cárnica. Por tanto, profundizar en el conocimiento de los factores con influencia sobre la miogénesis permitirá obtener canales más grandes y con mayor contenido cárnico y, por tanto, mejores rendimientos productivos.

El músculo esquelético se compone de fibras musculares que, de forma genérica, se pueden dividir en función de sus características contráctiles y metabólicas en fibras tipo I, también conocidas como lentas u oxidativas; y fibras tipo II, conocidas como fibras rápidas o glucolíticas. Las fibras tipo I presentan metabolismo aeróbico, de modo que obtienen la energía oxidando el piruvato en la mitocondria. Por el contrario, las fibras tipo II presentan metabolismo anaeróbico y obtienen la energía mediante la conversión del piruvato a ácido láctico en el sarcoplasma (citoplasma de las células musculares; (Nelson & Cox 2008)). Se sabe que las razas porcinas grasas presentan mayor proporción de fibras oxidativas que las razas magras (Lefaucheur *et al.* 2004; Wimmers *et al.* 2008). Así, se puede hipotetizar que la selección intensiva de individuos magros ha conducido a un aumento en el número de fibras glucolíticas y una disminución de fibras oxidativas. Concretamente, se ha observado que la raza ibérica presenta un 20% de fibras oxidativas frente al 10% que presentan las razas convencionales (Gómez *et al.* 2016). Esta mayor proporción de fibras oxidativas está asociada con una mayor acumulación de GIM y, por tanto, con mejores características sensoriales de la carne, pero con un menor potencial de crecimiento (Andrés *et al.* 1999; Listrat *et al.* 2016). Además de las diferencias observadas en cuanto a la proporción de fibras, también existen diferencias en cuanto a la cantidad de éstas; así en animales de tendencia grasa como la raza meishan, el número de fibras es menor que en cerdos blancos como large white (Lefaucheur *et al.* 2004).

Estas diferencias en cuanto a cantidad y tipo de fibra muscular entre las razas magras y las razas grasas se inician ya en estadios prenatales. En el cerdo, la formación de los diferentes tipos de fibras se produce en tres oleadas de diferenciación, ocurriendo dos de ellas en estadios prenatales y la última al nacimiento. Así, entre los días 30 y 60 de gestación, se produce la formación de las fibras primarias, mientras que las fibras secundarias se forman entre los días 54 y 90 de gestación, usando como soporte a las

fibras primarias (Wigmore & Stickland 1983; Rehfeldt *et al.* 2000; Te Pas *et al.* 2005). Finalmente, en el momento del nacimiento se formarán las fibras terciarias, consideradas de menor importancia respecto al número total (Picard *et al.* 2002). El crecimiento del músculo en la vida postnatal depende principalmente de procesos de hipertrofia o aumento del tamaño de las fibras musculares (Rehfeldt & Kuhn 2006). Es por ello que el potencial de crecimiento del tejido magro es esencialmente dependiente del número de fibras formadas en la etapa prenatal (limitado a su vez por factores genéticos y fisiológicos), mientras que el tamaño de éstas vendrá limitado por factores epigenéticos y el ambiente postnatal (Maltin *et al.* 2001; Rehfeldt and Kuhn 2006).

La alimentación materna durante la gestación tiene un fuerte impacto sobre el desarrollo muscular temprano. De este modo, alteraciones en el desarrollo muscular fetal debido a un déficit materno de nutrientes o por alteraciones placentarias conlleva la aparición de lechones con bajo peso al nacimiento (Wigmore & Stickland 1983). Estos lechones, además de presentar rendimientos más bajos y mayor infiltración grasa, tendrán carnes más duras debido a que presentan una disminución en el número de fibras secundarias y ésta se compensa con una mayor deposición de colágeno (Andrés *et al.* 1999; Listrat *et al.* 2016). Este aumento del colágeno en músculo hace que las piezas magras sean no sólo más duras sino también más secas y con menor aceptación por parte del consumidor.

1.3.3. Aspectos reproductivos y factores limitantes del desarrollo prenatal

La vida reproductiva constituye más del 70% del total de la vida de las hembras en una explotación porcina. De hecho, la rentabilidad de las granjas de madres depende directamente de los lechones producidos (número de lechones por cerda y año) y de los gastos originados en su producción (Kyriazakis 2006). Existen numerosos factores intrínsecos (genotipo, edad, estado fisiológico y número de partos) y extrínsecos (manejo reproductivo, alimentación, higiene y sanidad, época del año y factores sociales) que afectan a la eficiencia reproductiva y al desarrollo prenatal en porcino.

Actualmente, los mayores esfuerzos para aumentar la eficiencia reproductiva se centran en disminuir los periodos improductivos (adelantando el momento de la aparición de la pubertad y reduciendo la duración de los intervalos entre partos) y en aumentar la prolificidad (aumentando el número de lechones por cerda y parto). Para lograr esto, se recurre a la selección genética de reproductoras, sobre todo en razas magras, junto con la adecuación del manejo y de la alimentación. Existe una marcada diferencia entre el número de lechones nacidos totales en el cerdo ibérico y en las razas magras mejoradas; mientras que en la raza ibérica, la media oscila entre 6 y 7 lechones,

en las razas mejoradas se pueden alcanzar los 13,5 lechones (Sereno *et al.* 2002; Sabater and Garbayo 2007; Arnay *et al.* 2011). Por otro lado, la eficiencia reproductiva repercute sobre la productividad numérica en base a la siguiente fórmula:

$$Pn = Tf \times Tp \times (1 - Tm/100)$$

Donde:

Pn = Productividad numérica: número de lechones destetados por cerda y año.

Tf = Tasa de fertilidad: número de partos por cerda y año.

Tp = Tasa de prolificidad: número de lechones nacidos vivos por camada o tamaño de camada al nacimiento.

Tm = Tasa de mortalidad total entre nacimiento y destete (expresado en porcentaje)

Así, la prolificidad de una hembra se ve afectada por diferentes factores entre los que destacan la tasa de ovulación, mortalidad embrionaria y fetal, capacidad uterina y eficiencia placentaria.

1.3.3.1. Tasa de ovulación

Cuando hablamos de tasa de ovulación nos referimos al número de ovocitos liberados en un ciclo estral y representa el tamaño potencial de la camada. Este valor va a depender de varios factores, siendo los más importantes:

- Edad y ciclo: por lo general, las cerdas nulíparas tienen menores tasas de ovulación que las multíparas. Este valor se estabiliza a partir de la segunda o tercera ovulación o gestación. Pero, además, las camadas de las nulíparas son menos numerosas que las de las multíparas (Ordaz-Ochoa *et al.* 2013), aunque esta característica está influenciada no sólo por el número de ovulaciones sino por el tamaño uterino, que va aumentando en cada gestación.
- Estado corporal: Un excesivo engrasamiento puede reducir la tasa de ovulación o incluso anularla; ocurriendo lo mismo con hembras demasiado delgadas o magras, las cuales pueden incluso llegar a presentar fallos reproductivos.

En porcino, la ovulación comienza entre 31 a 44 horas después el inicio del celo (Almeida *et al.* 2000; Horsley *et al.* 2005) y, debido al carácter poliovulatorio de la especie, la ovulación puede prolongarse hasta el último tercio del periodo de celo que

puede durar entre 2 y 3 días (Kemp & Soede 1996; Nissen *et al.* 1997), <http://cal.vet.upenn.edu/projects/swine/bio/fem/estr/hm.html>).

Tradicionalmente, se ha asumido que el mayor factor limitante de la prolificidad en el cerdo ibérico es una menor tasa de ovulación. Sin embargo, estudios realizados en hembras ibéricas retintas, mediante valoración directa del número de ovulaciones en el ovario, contradicen esta creencia. Tanto el desarrollo de los folículos ováricos como su eficiencia ovulatoria son similares a los de hembras de raza landrace o large white no seleccionadas por prolificidad (Gonzalez-Anover *et al.* 2011a). El desarrollo de los cuerpos lúteos generados en el ovario tras la ovulación sería también similar entre estas razas (Gonzalez-Anover *et al.* 2011c), aunque se evidencia una menor secreción de progesterona, la hormona responsable de mantener la gestación (Astiz *et al.* 2013).

Estos estudios muestran que, contrariamente a lo supuesto, la tasa de ovulación no es el mayor limitante de la prolificidad del cerdo ibérico, ya que hay hembras con altas tasas de ovulación en las que la prolificidad vendría limitada posteriormente por una menor tasa de implantación y viabilidad embrionaria hasta el día 35, momento en que se produce la transición de embrión a feto (Gonzalez-Anover *et al.* 2011b).

1.3.3.2. *Mortalidad embrionaria y fetal*

La mortalidad embrionaria se traduce en la pérdida o reducción de embriones durante la gestación. Estas pérdidas son bastante importantes en el ganado porcino, pudiendo variar entre un 20% y un 45%. En general, se considera que el 90-95% de los ovocitos ovulados alcanzan la fertilización. Sin embargo, entre un 25 y un 30% de los embriones generados mueren entre los días 12 y 30 de gestación. Finalmente, la mayor parte de las pérdidas gestacionales (75%) se producen a partir del día 30 o período peri-implantacional (Ford 1997). Posteriormente, existiría un segundo periodo crítico hacia la mitad de la gestación, en el que ocurren un 10-15% de pérdidas, debidas a un problema de falta de espacio de los fetos para desarrollar su tamaño adecuado (Wessels *et al.* 2007). Por tanto, el factor limitante en este caso es la capacidad uterina, o espacio necesario para albergar el conjunto de embrión/feto y placenta en desarrollo, que viene definida por el tamaño uterino (Wu *et al.* 2006). En caso de un alto número de embriones, algunos de ellos no tienen el suficiente espacio para llevar a cabo una correcta implantación y placentación y mueren. En estadios posteriores, como se describe a continuación, la falta de espacio para el desarrollo del feto y su placenta puede traducirse también en mortalidad fetal o en retrasos en el crecimiento intrauterino (Figura 8). Por tanto, hembras con menor tasa de ovulación presentan alta

supervivencia embrionaria y, por ello, el número de embriones en desarrollo es similar al número de ovulaciones.

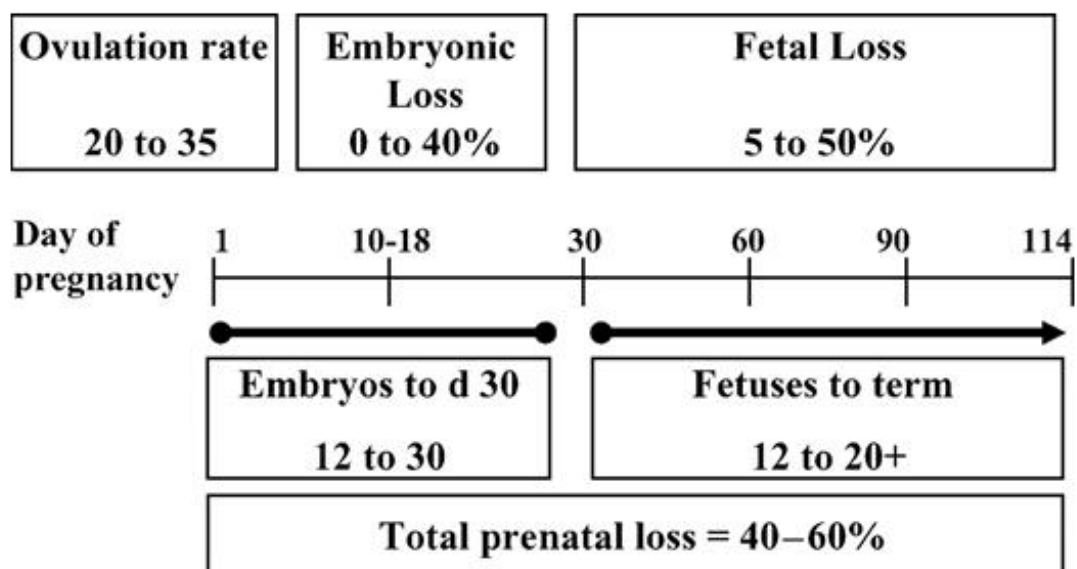


Figura 8. Representación esquemática de la pérdida embrionaria/fetal durante la gestación de cercas multíparas (Foxcroft *et al.* 2006).

En la raza ibérica, existen estirpes o variedades como la torbiscal, seleccionada por sus mejores características productivas y de calidad de producto, pero también para obtener un aumento en los rendimientos reproductivos y, específicamente, en la prolificidad. Sin embargo, incluso en esta línea o en sus cruces, existen unas altas pérdidas embrionarias que limitan la prolificidad. Así, hembras de cruce retinto con torbiscal presentan tasas de ovulación muy altas (alrededor de 21 cuerpos lúteos) pero el número de embriones viables disminuye hasta cifras de 10-11 en el momento de transición de embrión a feto (Torres-Rovira *et al.* 2011).

1.3.3.3. Capacidad uterina

El tamaño uterino condiciona la llamada capacidad uterina o capacidad de albergar un determinado número de embriones en desarrollo, siendo éste un factor limitante físico ya conocido en esquemas de selección de hembras blancas hiperprolíficas. Mientras que en líneas hiperprolíficas el tamaño del útero prácticamente se duplica desde el día 1 al 35 de gestación (150 a 270 cm de longitud), en la raza ibérica, además de presentar un tamaño uterino inferior, éste prácticamente no varía con el progreso de la gestación (100 a 130 cm de longitud) (Gonzalez-Anover *et al.* 2011b). Por tanto, en la raza ibérica la capacidad uterina representa un factor muy limitante para el aumento de la prolificidad ya que, en caso de un alto número de embriones en desarrollo, habrá un compromiso del desarrollo placentario y fetal debido

a un espacio uterino limitado (Town *et al.* 2004; van der Waaij *et al.* 2010). Esta falta de espacio implica una mala placentación y por tanto un inadecuado intercambio de oxígeno y/o nutrientes entre el feto y la madre, provocando muerte embrionaria. Además, en camadas con un alto número de individuos implantados, el desarrollo de algunos fetos y su placenta se verá también perjudicado por la falta de espacio y, aunque no mueran, su desarrollo estará restringido.

1.3.3.4. Eficiencia placentaria

La placenta es el órgano esencial para el correcto desarrollo embrionario y fetal, constituyendo un órgano endocrino en el que se producen y secretan diferentes hormonas (leptina, estrógenos, progesterona, etc.) y factores de crecimiento (principalmente IGF-I y II), y en el que se produce el intercambio de nutrientes y oxígeno entre el feto y la madre y se eliminan productos de desecho (Gude *et al.* 2004). En el cerdo, inmediatamente después de la implantación, se desencadena una cascada de señales génicas que permiten iniciar la formación de la placenta (Vonnahme & Ford 2004). Es entonces, alrededor del día 15 de gestación (Geisert & Yelich 1997), cuando comienza la placentación, que es seguida de una rápida angiogénesis o vascularización (Reynolds & Redmer 2001), así los vasos son claramente visibles a partir del día 25 de gestación. La placenta experimentará, por tanto, un crecimiento muy rápido desde el día 20 hasta el día 50, enlenteciéndose su crecimiento posteriormente, alrededor del día 70 de gestación (Knight *et al.* 1977; Wu *et al.* 2005).

Un buen indicador de eficiencia placentaria es el valor obtenido al dividir el peso del feto por el peso de su placenta; valor que a su vez está estrechamente relacionado con un buen desarrollo prenatal (Wu *et al.* 2008). La eficiencia de la placenta siempre dependerá de su tamaño y del espacio uterino con que cuenta para desarrollarse (Vallet *et al.* 2009; Vallet *et al.* 2014); a pesar de ello, existen mecanismos compensatorios basados en el aumento de pliegues y vascularización, que se producen durante el último tercio de gestación en aquellas placentas con menor desarrollo. Si la alteración del desarrollo placentario es moderada, estos mecanismos adaptativos consiguen aumentar su eficiencia (Coan *et al.* 2010; Sandovici *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2015). Sin embargo, cuando el retraso en el crecimiento placentario es acusado, estos mecanismos compensatorios no son suficientes para suplir las necesidades nutricionales y de oxígeno de los fetos y aparece el retraso en el crecimiento intrauterino o IUGR por sus siglas en inglés (Wootton *et al.* 1977; Foxcroft *et al.* 2007). La restricción del crecimiento fetal puede ser simétrica o asimétrica en función de sus causas (Anthony *et al.* 2003). Por un lado, el IUGR simétrico se caracteriza por una reducción uniforme del

tamaño del feto y de sus órganos desde el inicio de la gestación y está asociado a factores genéticos e infecciosos; el IUGR asimétrico se caracteriza por presentar reducción del tamaño de algunos órganos, mientras que otros (principalmente el cerebro) continúan con su desarrollo normal. Este último tipo de IUGR es el más común y está asociado con un déficit nutricional y/o de oxígeno durante el desarrollo fetal tardío; período en el que las necesidades nutricionales por parte del feto son mayores. La priorización del desarrollo del cerebro mediante una mejor irrigación sanguínea a costa de otros órganos, o "brain sparing effect", que ocurre en el IUGR asimétrico tiene como objetivo asegurar un correcto desarrollo de funciones neurológicas esenciales para la vida (funciones autónomas), como puede ser respirar, reconocer su entorno y el correcto desarrollo del reflejo de mamar (Perry 2002).

La exposición a desnutrición durante períodos tardíos de desarrollo fetal (dos últimos tercios de la gestación) supone una disminución de la eficiencia placentaria y, por tanto, un agravamiento de los procesos de IUGR. La incidencia del IUGR supondrá una mayor aparición de lechones de *bajo peso al nacimiento* (BPN), ya que en este estadio no son capaces de adaptar su crecimiento a la falta de nutrientes (Gonzalez-Bulnes *et al.* 2012a; Barbero *et al.* 2013; Oviló *et al.* 2014b).

Los lechones con BPN por causa de procesos de IUGR presentan altas tasas de morbilidad y mortalidad neonatales y aquellos que sobreviven presentan una fuerte propensión a enfermedades a lo largo de su vida postnatal (Wu *et al.* 2006). Esto está asociado a problemas gastrointestinales, metabólicos, respiratorios e inmunológicos debido a alteraciones en órganos vitales como el intestino, el hígado, los pulmones o el sistema inmune. En lechones con BPN muy extremo, la priorización del cerebro que ocurre durante el desarrollo fetal puede comprometer fuertemente el desarrollo de otros órganos, con consecuencias importantes, siendo los órganos más afectados los representados en la Tabla 3.

Tabla 3. Órganos fetales afectados por retraso en el crecimiento intrauterino.

ÓRGANO CON CRECIMIENTO RETARDADO	CONSECUENCIA	REFERENCIAS
<i>Hígado</i>	Alteración del metabolismo de la glucosa, lípidos, proteínas y vitaminas	<i>(Liu et al. 2013)</i>
<i>Intestino</i>	Intolerancias alimenticias y enfermedades gastrointestinales	<i>(D'Inca et al. 2010)</i>
<i>Pulmones</i>	Anomalías en las vías respiratorias y los pulmones, causando alteración de la función respiratoria	<i>(Pike et al. 2012)</i>
<i>Sistema Inmune</i>	Depresión del sistema inmune y aumento de la susceptibilidad a padecer enfermedades	<i>(Sangild 2003)</i>

Hay que tener en cuenta que la salud de cualquier neonato depende en gran medida de un correcto desarrollo del sistema gastrointestinal, que le permita una

correcta absorción y utilización del alimento. Los individuos afectados por IUGR presentan alteraciones en el desarrollo, morfología y función intestinal que les predisponen a intolerancias alimenticias y enfermedades digestivas (Alvarenga *et al.* 2013; Michiels *et al.* 2013). Del mismo modo, un desarrollo hepático adecuado es esencial para el metabolismo de la glucosa, los aminoácidos, las proteínas, los lípidos, las vitaminas y los minerales (Liu *et al.* 2013). Por otro lado, los lechones nacen sin anticuerpos o inmunidad mediada por células; los anticuerpos solo se obtienen de la madre a través del calostro durante las primeras horas de vida (Rooke & Bland 2002). Por lo tanto, cualquier problema relacionado con la succión o la transferencia de inmunidad pasiva del calostro aumentará la susceptibilidad a infecciones. Por estas razones, la mayoría de los lechones con BPN mueren antes del destete, mientras que los supervivientes verán mermados su desarrollo y crecimiento debido a todos estos condicionamientos que, además, se agravan con la edad. Además de los problemas propios asociados a los lechones de BPN, la variabilidad de peso intra-camada aumenta, por sí misma, la morbilidad en la vida post-natal temprana y los costes de manejo en los sistemas de producción porcina (Yuan *et al.* 2015).

Además, el BPN supone un factor limitante en sí mismo, ya que puede afectar la viabilidad del lechón por competencia durante la lactación con respecto a sus hermanos de camada de pesos normales (English 1998; Douglas *et al.* 2014). Los lechones con BPN, aparte de un menor peso durante su desarrollo postnatal, presentan también una tendencia al engrasamiento, menor número de miofibrillas musculares y mayor tamaño de las mismas, lo que limita el crecimiento muscular (Rehfeldt and Kuhn 2006). Un estudio reciente de nuestro grupo llevado a cabo en una granja comercial, en el que se tomaron medidas y pesos corporales de 671 lechones en el momento del nacimiento, permitió establecer que el peso medio para un lechón proveniente del cruce comercial iberico x duroc es de $1,4 \pm 0,2$ kg. Este trabajo también permitió establecer un umbral de peso para la clasificación de lechones como BPN con un valor de 0,9 kg (Vázquez-Gómez *et al.* 2018).

1.3.4. Programación prenatal y sus consecuencias en la vida adulta

Los efectos del retraso en el crecimiento intrauterino sobre el fenotipo y la salud del cerdo adulto están en concordancia con la hipótesis del Profesor Barker y colaboradores conocida como "Developmental Origins of Health and Disease" o DOHaD. Esta hipótesis, originalmente desarrollada para medicina humana, postula que un ambiente intrauterino inadecuado modifica los patrones de crecimiento fetales, lo que compromete el correcto crecimiento post-natal y, posteriormente, afecta al estado

de salud en la vida adulta (Barker & Clark 1997). Durante la década de los 90, surgieron numerosos estudios que demostraron que aquellas personas que fueron expuestas a malnutrición materna durante el embarazo nacieron con bajo peso debido a un crecimiento y desarrollo fetal deficiente y presentaron mayor propensión a la obesidad, diabetes y enfermedades cardiovasculares durante la vida adulta (Barker *et al.* 1989; Barker 1993; Barker & Clark 1997; Gluckman and Hanson 2004). Estas observaciones llevaron a acuñar el término "programación prenatal o fetal".

El embrión o feto en crecimiento tiene la capacidad de modificar la estructura y función de diferentes órganos en respuesta a señales provenientes del entorno materno. La "programación prenatal" comienza desde la fertilización del ovocito y continúa durante la implantación, la organogénesis y el crecimiento embrionario. Durante estas primeras etapas, los individuos en desarrollo son muy susceptibles a cambios en el ambiente intrauterino, de modo que pueden modificar la expresión de determinados genes sin modificar la secuencia genómica (mediante cambios epigenéticos), permitiéndoles adaptarse a dichos cambios del entorno. Esta "plasticidad embrionaria" permite que en caso de un suministro inadecuado de oxígeno y/o nutrientes durante el desarrollo prenatal, ya sea por deficiencia placentaria o por malnutrición materna, el embrión o el feto sean capaces de modificar la estructura tisular y el funcionamiento de sus órganos en desarrollo para adaptar su homeostasis a las condiciones uterinas. La finalidad de estos cambios en la homeostasis fetal es asegurar la supervivencia en la vida postnatal, adaptándose, "programándose", a las condiciones externas inadecuadas que espera encontrar después del nacimiento (Gluckman *et al.* 2005a; Gluckman *et al.* 2005b; Gluckman *et al.* 2007).

La "programación prenatal" puede resultar beneficiosa para la supervivencia de la progenie; sin embargo, puede tener un efecto dañino en la vida postnatal si las condiciones intra- y extrauterinas no coinciden. Es decir, si la "programación" falla y en la vida postnatal el individuo "programado" para escasez de nutrientes durante el desarrollo prenatal se enfrenta a una dieta normal, o peor aún obesogénica, pueden aparecer alteraciones metabólicas en la vida adulta como obesidad, diabetes o síndrome metabólico (Neel 1962).

En el caso de la producción porcina, estudios previos han señalado que los fenómenos de "programación prenatal" son más pronunciados en el cerdo ibérico que en cerdo blanco (Torres-Rovira *et al.* 2013a). Cabe destacar que los efectos de éste fenómeno sobre la progenie dependen tanto del estadio gestacional en el que comience el desequilibrio de oxígeno y/o nutrientes, de la gravedad o duración de éste, y de la respuesta adaptativa de la madre para amortiguar este ambiente lesivo para el desarrollo fetal. De hecho, la exposición a una nutrición inadecuada durante toda la

gestación se asocia a lechones con pesos al nacimiento dentro de la normalidad (Barbero *et al.* 2013), ya que los fetos se adaptan a la menor disponibilidad de alimento. Sin embargo, los lechones que sufren desnutrición intrauterina están sometidos al proceso de "programación prenatal" y en caso de exceso de alimento durante la vida postnatal (como ocurre en el período de engorde) presentarán un mayor contenido de grasa en las canales, lo que disminuirá su valor en el mercado y sus rendimientos económicos (Schroder 2003; Gondret *et al.* 2006; Rehfeldt *et al.* 2008).

Por lo tanto, el crecimiento prenatal es un estadio de desarrollo clave que determinará en gran medida el balance salud/enfermedad y la capacidad productiva del individuo en su vida adulta, así como la heterogeneidad de los lotes, y por ende, las pérdidas económicas asociadas.

1.3.5. Sexo fetal

Está ampliamente estudiado (tanto en la especie humana como en modelos animales) que el sexo fetal juega un papel muy importante en aquellos individuos afectados por crecimiento intrauterino retardado (Clifton & Murphy 2004; Gupta *et al.* 2004; Aiken & Ozanne 2013). En el caso del cerdo ibérico existe un fuerte componente determinado por el sexo del individuo (Gonzalez-Bulnes *et al.* 2012a). Concretamente, en un estudio de nuestro grupo, en el que se analizó la respuesta metabólica y el desarrollo por parte de fetos de 62 días de gestación afectados por IUGR, se observó un claro efecto del sexo en la raza ibérica, no observándose un impacto tan importante en el cruce large white x landrace. Así, las hembras ibéricas mostraron un mecanismo de crecimiento compensatorio alcanzando los pesos de sus hermanos (Torres-Rovira *et al.* 2013b). Además, se pudo observar que la estrategia adaptativa del "brain sparing effect" fue más acusada en hembras ibéricas. Como mencionamos anteriormente, el objetivo del "brain sparing effect" es asegurar el crecimiento del cerebro a expensas de otros órganos y estructuras corporales, asegurando así la supervivencia del individuo (Rudolph 1984; Perry 2002).

Con respecto al efecto del sexo en estadios postnatales, hemos de tener en cuenta que lechones macho con BPN, al igual que en las razas magras, tienen un crecimiento posnatal comprometido y permanecen más pequeños que los lechones machos que no han sido expuestos a desnutrición. Sin embargo, sus hermanas de camada evidencian crecimiento compensatorio, alcanzando pesos y tamaños similares a los de las hembras normales (Gonzalez-Bulnes *et al.* 2012a). Este crecimiento compensatorio de las hembras parece verse favorecido por cambios en la expresión de

genes que participan en las rutas de la melanocortina (*LEPR*, *MC4R*, *NPY* o *POMC*) en hipotálamo, relacionadas con el control del balance energético (Ovilo *et al.* 2014b).

A pesar de esta mejor adaptación por parte de las hembras, que puede considerarse lógica si tenemos en cuenta su importancia para la supervivencia de la especie, el crecimiento postnatal se ve afectado por una mayor tendencia al engrasamiento. Esta tendencia, aparte de afectar a la canal, afecta también a la fisiología reproductiva de las hembras. En primer lugar, estas hembras alcanzan antes la pubertad que las hembras con una alimentación adecuada durante el periodo fetal (Barbero *et al.* 2013); sin embargo, una vez alcanzada la edad adulta, las hembras que fueron expuestas a desnutrición prenatal presentan menor prolificidad (Gonzalez-Anover *et al.* 2010; Gonzalez-Anover *et al.* 2012).

1.4. Vías de mejora del desarrollo prenatal

En porcino ibérico, como en otras razas y especies, una posible vía para la optimización del rendimiento productivo puede basarse en mejorar aquellos parámetros determinantes para: a) la viabilidad y el adecuado desarrollo de embriones y fetos, y b) obtener camadas más homogéneas en cuanto a pesos al nacimiento si lo que se busca es un mayor número de lechones. Como se ha expuesto anteriormente, el bajo peso al nacimiento va asociado a pérdidas económicas importantes en la industria porcina. De ahí la necesidad de encontrar estrategias que permitan homogenizar los pesos intra- e inter-camada.

1.4.1. Estrategias nutricionales y terapias antioxidantes

Una de las principales vías para disminuir los efectos de la programación prenatal, y por tanto, la aparición de lechones con bajo peso, es el uso de estrategias nutricionales durante la gestación. La aplicación de estrategias nutricionales puede basarse en el aumento de la cantidad de alimento, el aumento de energía o proteínas, o en la suplementación de la dieta con diferentes sustancias (principalmente vitaminas, aminoácidos o polifenoles). Con estas estrategias se pretende mejorar la condición corporal de la cerda gestante y la eficiencia placentaria. De este modo, se actúa directamente sobre la disponibilidad de nutrientes y oxígeno para el feto, el estado antioxidante/oxidativo, inflamatorio e inmunitario del feto (Wu *et al.* 2010; Mordhorst & Prather 2017). En la actualidad, la suplementación con estas sustancias se considera

beneficiosa y es cada vez más frecuente; sin embargo, no se ha llevado a cabo un adecuado estudio de posibles efectos adversos sobre la progenie.

1.4.1.1. Suplementación con aminoácidos

Los aminoácidos (AA) desempeñan un papel muy importante en la viabilidad y el desarrollo embrionario; no sólo por participar en la síntesis proteica sino también por su función reguladora de la secreción hormonal y su participación en la síntesis de otras sustancias no proteicas. Pero, además, la acción de los AA continúa durante los procesos de desarrollo fetal; concretamente durante los procesos de miogénesis y adipogénesis, por lo que podrían tener efecto en las características de la canal y la calidad de la carne en la vida adulta (Li *et al.* 2010; Wu *et al.* 2010; Wu *et al.* 2011). Tradicionalmente, los AA han sido clasificados como:

- **Aminoácidos esenciales (AAE):** Son aquellos AA cuyos esqueletos de carbono no pueden ser sintetizados *de novo* o son sintetizados de forma inadecuada por el individuo; por ello, deben ser proporcionados con la dieta (Chen *et al.* 2009; Wu 2009).
- **Aminoácidos no esenciales (AANE):** son aquellos AA que el individuo es capaz de sintetizar *de novo* en cantidades lo suficientemente elevadas como para cubrir sus necesidades (Baker 2009).

Estudios recientes, consideran una serie de AA conocidos como aminoácidos funcionales (AAF); son aquellos AA capaces de regular rutas metabólicas clave con el objetivo de mejorar la supervivencia, el crecimiento, la reproducción o la salud, tanto en animales como en humanos (Wu 2009). Este nuevo grupo de AA incluye tanto AAE como AANE (arginina, cisteína, glutamina, leucina, prolina, y triptófano; Kim & Wu 2009; Stipanuk *et al.* 2009; Tan *et al.* 2009a; Tan *et al.* 2009b).

Existen numerosas evidencias en las que se relaciona el bajo peso al nacimiento con una reducción en la capacidad placentaria para el transporte de aminoácidos y con alteraciones en sus rutas metabólicas durante el desarrollo prenatal (Baptista *et al.* 2015). Por ello, las nuevas terapias para reducir la aparición de lechones con bajo peso están en su mayoría enfocadas a aumentar la disponibilidad de aminoácidos en la dieta y, como consecuencia, en la circulación materna. El efecto de la suplementación con aminoácidos ha sido estudiado en razas magras y ha demostrado ser una herramienta muy valiosa para mejorar el peso al nacimiento y el estado metabólico de los lechones (Baptista *et al.* 2015). Uno de los aminoácidos más estudiados ha sido la arginina. La arginina es un precursor de la síntesis de numerosas sustancias biológicas importantes como por ejemplo el óxido nítrico, urea, poliaminas, prolina o glutamato (Morris 2006).

Además, algunos estudios indican que este AA está involucrado en la regulación del metabolismo de nutrientes, de procesos transcripción génica y cambios epigenéticos (Jobgen *et al.* 2006; Frank *et al.* 2007; Wang *et al.* 2009; Wu *et al.* 2009). Asimismo, se ha descrito que concentraciones elevadas de arginina en líquido alantoideo porcino están estrechamente asociadas con concentraciones elevadas de óxido nítrico y poliaminas (Wu *et al.* 1996); estas sustancias a su vez, juegan un papel clave en los procesos de angiogénesis, embriogénesis y crecimiento placentario y fetal (Reynolds2001; Bee 2010). Es por ello que la arginina se clasifica como un AA nutricionalmente esencial para fetos y neonatos (Wu 2009). Los resultados de algunos estudios evidencian que la suplementación materna con arginina disminuye la mortalidad fetal y la aparición de lechones con BPN y mejora el estado oxidativo fetal (Zeng *et al.* 2008; Wu *et al.* 2010; Lin *et al.* 2014). Sin embargo, algunos trabajos indican que la suplementación materna con arginina en el primer tercio de gestación podría reducir tanto el tamaño de camada como el peso fetal (Li *et al.* 2010).

Otro aminoácido con posibles beneficios sobre el desarrollo prenatal es la glutamina, ya que juega un papel importante en el metabolismo del carbón y del nitrógeno y es uno de los aminoácidos libres más abundantes en el cordón umbilical porcino (Lin *et al.* 2012). En razas magras se ha visto que la suplementación materna con un 1% de glutamina disminuye la variabilidad de peso intracamada y aumenta el número de nacidos vivos y el peso de éstos (Wu *et al.* 2011).

La prolina es otro aminoácido con posibles efectos positivos sobre el desarrollo prenatal; así, la suplementación durante la fase de implantación en cerdas landrace x yorkshire aumenta el peso al nacimiento de sus lechones (Gonzalez-Anover & Gonzalez-Bulnes 2017). Por otro lado, la suplementación materna con una combinación de arginina (0,4%) y glutamina (0,4%) mejora la eficiencia en la utilización de nutrientes, disminuye la variabilidad de pesos intracamada y aumenta el peso al nacimiento (Mateo *et al.* 2008). La suplementación con ambos aminoácidos se basa en que tanto la arginina como la glutamina intervienen en la regulación de la síntesis proteica activando la producción de poliaminas (esenciales para la expresión génica y la traducción del ARNm) y la ruta de la rapamicina (mTOR) en mamíferos (Figura 9).

No obstante, hemos de tener en cuenta que la suplementación con aminoácidos supone una estrategia nutricional relativamente cara, por lo que los estudios deberían enfocarse en determinar cuál es la cantidad mínima de éstos con efectos sobre el desarrollo fetal y durante qué periodos gestacionales tienen un mayor efecto.

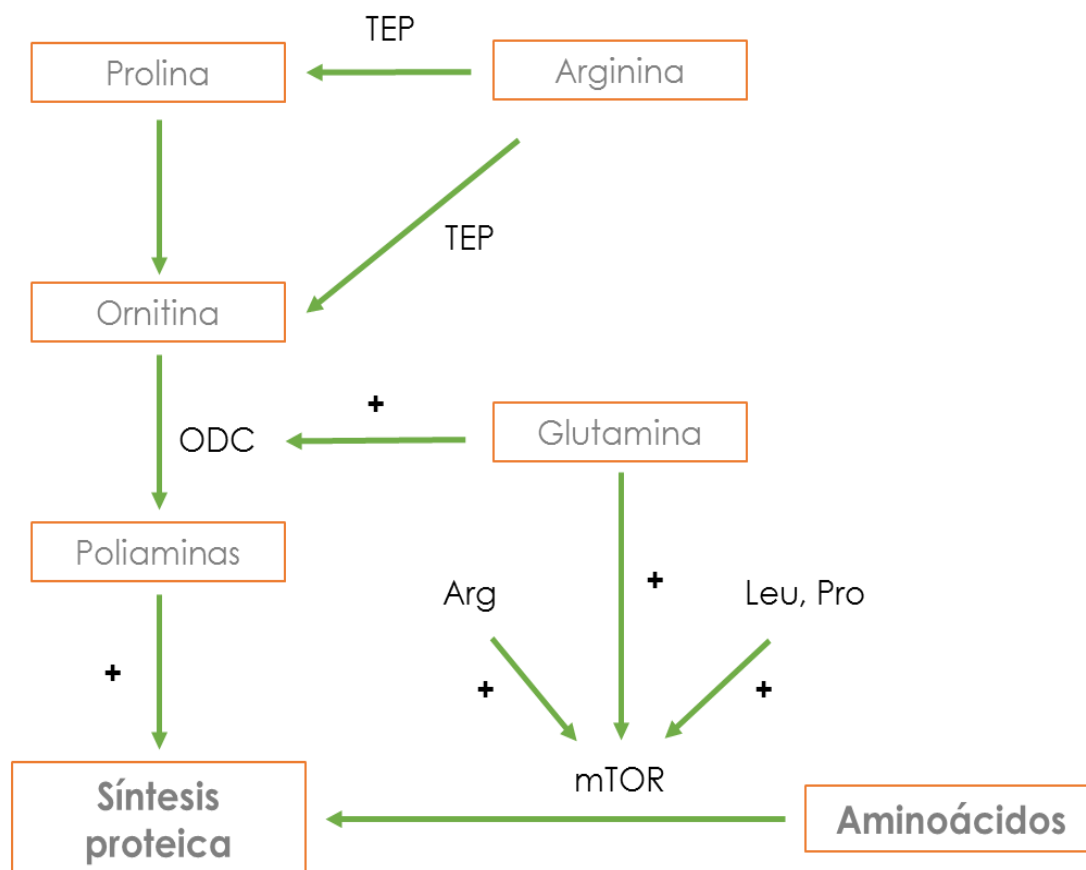


Figura 9. Regulación aminoacídica de la síntesis proteica en placenta porcina. TEP = Tejido extraplacentario; ODC = Ornitina descarboxilasa; Arg = L-arginina; Leu = L-leucina; Pro = L-prolina (fuente: (Wu *et al.* 2010)).

1.4.1.2. Suplementación materna con vitaminas

Otra alternativa es el uso de vitaminas que favorezcan la síntesis proteica, entre las que destacan las vitaminas del grupo B, como pueden ser las vitaminas B6, B9 y B12. La vitamina B6 o piridoxina interviene en la síntesis de ADN, ARN y proteínas, favoreciendo la obtención de energía por parte del embrión y del feto (Bowling 2011). Por otro lado, la deficiencia de vitamina B9 o ácido fólico induce la aparición de defectos en la placentación, provocando aborto o retrasos en el crecimiento fetal y en la formación del tubo neural, apareciendo la espina bífida y anencefalia (Scholl & Johnson 2000). Existe, además, una correlación positiva entre los niveles de vitamina B6 y B9 y los de la vitamina B12 o cianocobalamina; esta última favorece la síntesis de fosfolípidos esenciales para el desarrollo embrionario y fetal (Pepper & Black 2011). Por otro lado, estudios en porcino indican que la suplementación con vitamina B9 ayuda a mejorar el metabolismo en fetos afectados por IUGR (Liu *et al.* 2011; Liu *et al.* 2012). Por tanto, la administración conjunta de vitaminas del grupo B favorece la viabilidad y el

desarrollo embrionario y fetal y disminuye la incidencia de retraso en el crecimiento intrauterino (Furness *et al.* 2013).

Además de los efectos de las vitaminas del grupo B sobre la síntesis proteica, existen vitaminas con efectos antioxidantes; concretamente, las vitaminas A, C y E. Su uso está ampliamente extendido en la producción de porcino.

La vitamina A o retinol presenta actividad paracrina y función antioxidante. El retinol se une a sus proteínas de unión (RBP por sus siglas en inglés) para formar un complejo, que será la principal forma de transporte de la vitamina A (Mahan & Vallet 1997). De hecho, en el cerdo, la RBP facilita la transferencia de retinol de la madre al feto, lo protege de reacciones oxidativas y actúa como sustrato para la síntesis de otros metabolitos del retinol (Mahan & Vallet 1997). Por tanto, se puede hipotetizar que una suplementación con vitamina A actuaría favoreciendo las condiciones intrauterinas. Sin embargo, en un estudio realizado en cerdos blancos se observó que la suplementación nutricional con vitamina A no supuso un aumento de los niveles plasmáticos de retinol, lo que sugiere que el hígado almacena o elimina el exceso de éste (Hoppe *et al.* 1992). Además de las funciones biológicas descritas, los niveles de vitamina A en la dieta pueden influenciar determinadas características de calidad de la carne; en concreto los niveles de grasa intramuscular (Olivares *et al.* 2009a; Olivares *et al.* 2009b). Además, en medicina humana se ha observado que un exceso de vitamina A puede tener un efecto teratogénico (Rothman *et al.* 1995).

La vitamina E es el principal agente antioxidante *in vivo* conocido que previene específicamente de la acción de la oxidación de los PUFA de los fosfolípidos de membrana (Halliwell 1994), permitiendo la integridad de las membranas incluso en presencia de radicales libres (Diplock 1983). Concretamente, la vitamina E juega un papel muy importante en la calidad de la carne, de modo que la suplementación con vitamina E mejora su estabilidad oxidativa (Rey *et al.* 1997; Daza *et al.* 2005; Rey *et al.* 2006), su estabilidad de color (Monahan *et al.* 1994) y reduce las pérdidas de exudado (Asgar *et al.* 1991; Monahan *et al.* 1994). De estas funciones se deriva la importancia de la suplementación con vitamina E en etapas tardías de crecimiento. Sin embargo, hemos de tener en cuenta que un exceso vitamínico puede ocasionar efectos negativos debido a las interacciones que se producen entre nutrientes, de modo que el exceso de uno puede limitar la biodisponibilidad de otro (Bieri *et al.* 1981; Goodman *et al.* 1994; de Lira *et al.* 2013). Esta interacción también ha sido estudiada en cerdo, en el que un exceso de vitamina A supone una disminución de α -tocoferol en lechones recién destetados (Blair *et al.* 1996; Ching *et al.* 2002) o en distintas fases de crecimiento (Ayuso *et al.* 2015b). Con respecto al efecto de la suplementación materna con vitamina E sobre el desarrollo fetal, se sabe que el α -tocoferol (la forma biológica más activa de la

vitamina E) es capaz de atravesar la placenta, pero lo hace a niveles muy bajos; por ello, la concentración plasmática de α -tocoferol será muy baja en lechones recién nacidos (Mahan 1991). Para suplir esta baja concentración de α -tocoferol en el momento del nacimiento, distintos autores han llevado a cabo estrategias de suplementación de este micronutriente tanto en la madre durante la gestación-lactación como en el lechón (Amazan *et al.* 2012); el efecto de suplementación de la madre resulta ser el más efectivo para conseguir una mayor acumulación de vitamina E a pocos días tras el destete. Dado el importante carácter antioxidante de esta vitamina, su acumulación viene determinada por el estatus oxidativo del animal (Amazan *et al.* 2012), así como por la suplementación de otros agentes pro-oxidantes como el hierro u otros minerales. Así, se ha observado que la administración de hierro en lechones recién nacidos activa el estado antioxidante de lechones neonatos (Loudenslager *et al.* 1986).

La vitamina C o ácido ascórbico es esencial para un adecuado desarrollo de la gestación; su déficit en cerdas gestantes provoca anomalías hematológicas y del esqueleto en los fetos en desarrollo (Wegger & Palludan 1994). Esto se debe a que el feto no es capaz de sintetizar vitamina C, por lo que su disponibilidad depende del transporte materno (Brown *et al.* 1972). Una suplementación materna con vitamina C no supone un aumento de la concentración de ésta en la cerda gestante, pero sí en el feto en desarrollo (Brown 1984; Wegger & Palludan 1984). Este intercambio vitamínico entre el feto y la madre, por tanto, parece ser muy activo durante los periodos de crecimiento rápido fetal, ya que el feto requiere vitaminas para la síntesis de tejido conectivo. Estudios en ovino también parecen concluir que existe un intercambio muy activo entre la madre y el feto de vitamina C, de modo que el feto verá mejorado su estado antioxidante y su condición corporal (Sales *et al.* 2019). Por otro lado, la suplementación con vitamina C resulta una estrategia relativamente económica, actuando, además, de forma sinérgica con la vitamina E. En este sentido, algunos autores indican la existencia de una correlación positiva entre los valores de vitamina C y E (Niki *et al.* 1982; Niki *et al.* 1985; Liu & Lee 1998); esto supone un aumento de las concentraciones de vitamina E disponible para el individuo sin necesidad de aumentar su dosis.

1.4.1.3. *Suplementación materna con polifenoles*

Los polifenoles son el grupo más extenso de sustancias no energéticas presentes en los alimentos de origen vegetal (frutas, verduras o semillas). El nombre polifenol se debe a que son compuestos con varios anillos fenólicos. Esta estructura química determina sus características fisicoquímicas, permitiendo su participación en reacciones

de óxido-reducción (que determinarán sus conocidas propiedades antioxidantes) y en la modulación de numerosos procesos metabólicos. Son sustancias con una función dual, de modo que, a la vez que son capaces de inhibir la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS), capturan aquellas ROS ya formadas. Actualmente, numerosos estudios analizan el papel de los polifenoles en la prevención de cáncer, enfermedades metabólicas y cardiovasculares, así como en problemas neurológicos (Brewer 2011; Rigacci and Stefani 2016). Por otro lado, debido a su elevada capacidad antioxidante, diferentes estudios hipotetizan sobre el uso de los polifenoles durante gestaciones comprometidas (con incidencia de IUGR) para mejorar el estado antioxidante materno, y por tanto placentario y fetal (Prior *et al.* 2007; Ly *et al.* 2015). Podemos encontrar diversas clases y subclases de polifenoles según el número y estructura de sus anillos, siendo los más importantes:

- ❖ **Flavonoides:** representan la subclase de polifenoles más abundante dentro del reino vegetal. En las plantas normalmente se encuentran en forma de glucósidos y son los responsables de los colores azulados y naranja que encontramos en algunas flores, frutos u hojas (Brouillard and Cheminat 1988). Además de en vegetales, podemos encontrarlos en el vino (especialmente en el vino tinto) y en menor cantidad, en la cerveza (Kuhnau 1976). Dentro de los flavonoides encontramos dos subclases principales:
 - Isoflavonas: Se encuentran principalmente en legumbres, incluyendo la soja, frijoles negros, judías verdes y garbanzos. Estudios en ratones han relacionado la suplementación materna con isoflavonas con una disminución del estrés oxidativo y la hipertensión en la descendencia (Bonacasa *et al.* 2011) pero indican la aparición de problemas reproductivos, acelerando la madurez reproductiva en hembras y aumentando la metilación del ADN (Johnson *et al.* 2009; Jefferson & Williams 2011; Ho *et al.* 2017). Aunque existe un efecto negativo sobre parámetros reproductivos en ratones, un estudio realizado en machos minipig, determinó que la administración de concentraciones bajas de isoflavonas procedentes de la soja no afecta a su correcto desarrollo reproductivo (Yuan *et al.* 2012).
 - Quercitina: Lo encontramos principalmente en la piel de vegetales y frutas, en el té negro, en el vino y principalmente en la cebolla. Es uno de los polifenoles más estudiados, y se sabe que de forma natural la quercitina se encuentra en forma glucosilada (unida a residuos azucarados; (Kelly 2011); mientras que la suplementación nutricional con quercitina consiste en la molécula libre de ésta. Esto supone que la absorción por parte del organismo es diferente si la suplementación se realiza con quercitina libre o glucosilada, debido a que la

glucosilación facilita su absorción a nivel intestinal (Morand *et al.* 2000). Los estudios sobre el efecto de la suplementación materna con quercitina en gestaciones afectadas por IUGR, muestran efectos contradictorios. Por una parte, estudios en humana han mostrado que la suplementación mejora el estado oxidativo fetal y la dislipidemia en gestantes diabéticas y previene la hiperglicemia post-natal, la resistencia a la insulina, y la obesidad y la osteoporosis tempranas, mejora la circulación uterina y placentaria, y es capaz de revertir los efectos de la preeclampsia (Prior *et al.* 2007; Prater *et al.* 2008; Johnson *et al.* 2009; Jefferson & Williams 2011; Pereira Braga *et al.* 2013). Un estudio reciente además relaciona la administración prolongada de quercitina durante la gestación, con pesos al nacimiento más elevados pero camadas más pequeñas (Beazley & Nurminskaya 2016). No obstante, también se han observado numerosos efectos adversos como: aumento de citoquinas asociadas a inflamación en la vida adulta, constricción del *ductus arteriosus*, alteración de la implantación embrionaria por el aumento del ratio estradiol/progesterona y aumento de la metilación en células hematopoyéticas (Johnson *et al.* 2009; Zielinsky *et al.* 2010; Jefferson & Williams 2011; Zielinsky & Busato 2013; Hahn *et al.* 2017).

- ❖ **Estilbenos:** son compuestos fenólicos de bajo peso molecular presentes en numerosas familias de plantas como *Vitaceae*, *Pinaceae*, *Liliaceae* o *Moraceae* entre otras (Morales *et al.* 2000). Actúa como un potente antifúngico en las plantas. Los más estudiados se localizan en la vid, en la cual encontramos al estilbeno más conocido, el resveratrol o *t*-R.
 - Resveratrol: la concentración de resveratrol en la piel de la uva varía entre 50 y 100 µg por gramo fresco, mientras que en vino su concentración aumenta 0,1-12 mg por litro (Martínez Márquez 2016). El término "*the french paradox*" es actualmente utilizado para referirse al hallazgo epidemiológico de una relación inversa entre el consumo de vino y la incidencia de enfermedades cardiovasculares (Renaud & de Lorgeril 1992). En la actualidad, se ha podido relacionar el resveratrol presente en la uva y el vino con aumento de la actividad antioxidante, anti-trombogénica, anti-inflamatoria, cardio- y neuro-protectora y con la prevención de determinados cánceres (Martínez Márquez 2016). Por otro lado, numerosos estudios sugieren los posibles beneficios de una suplementación materna con resveratrol para mejorar las condiciones uterinas y por tanto, el desarrollo fetal; algunos estudios en roedores sugieren que la suplementación con este polifenol disminuye el estrés oxidativo y la apoptosis asociada a embriopatía diabética, y mejora el desarrollo fetal en gestantes diabéticas. Por

otro lado, mejora el estado oxidativo y la vascularización en fetos afectados por IUGR y disminuye la aparición de neonatos con bajo peso (Singh *et al.* 2011; Singh *et al.* 2013; Costa *et al.* 2016; Vazquez-Gomez *et al.* 2017).

❖ **Feniletanoides:** son polifenoles no flavonoides derivados del ácido benzoico. Dentro de éste grupo destacan el tirosol y el hidroxitirosol. Ambos fenoles simples, constituyen los principales compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen (AOV). Se ha podido comprobar que los efectos beneficiosos del AOV para la salud humana son debidos tanto a la composición de MUFAs (principalmente atribuido al ácido oleico) y vitaminas (en especial la vitamina E), como a su composición en fenoles (Covas *et al.* 2006).

➤ Hidroxitirosol (HT): es el compuesto fenólico mayoritario del AOV (entre 50-800 mg/kg), presente además en las aceitunas y en las hojas del olivo (Gimeno *et al.* 2002). Procede de la hidrólisis de la oleuropeína, un glicósido que puede llegar a constituir más del 14% del peso seco de la aceituna (Ryan & Robards 1998). Tras la maduración del fruto y debido a los procesos de elaboración de la aceituna de mesa, la oleuropeína se hidroliza, dando lugar a la oleuropeína aglicona, HT y ácido elenólico (Figura 10). Parece ser que la estructura orto-dimérica del HT es fundamental para ejercer su acción antioxidante y actuar como quelante de metales (Aeschbach *et al.* 1994; Ryan & Robards 1998). Los iones metálicos como el Fe y el Cu pueden llegar a ser potencialmente peligrosos debido a la capacidad de actuar como transferidores de electrones y, por tanto, catalizar reacciones de autoxidación (Halliwell & Gutteridge 2015).

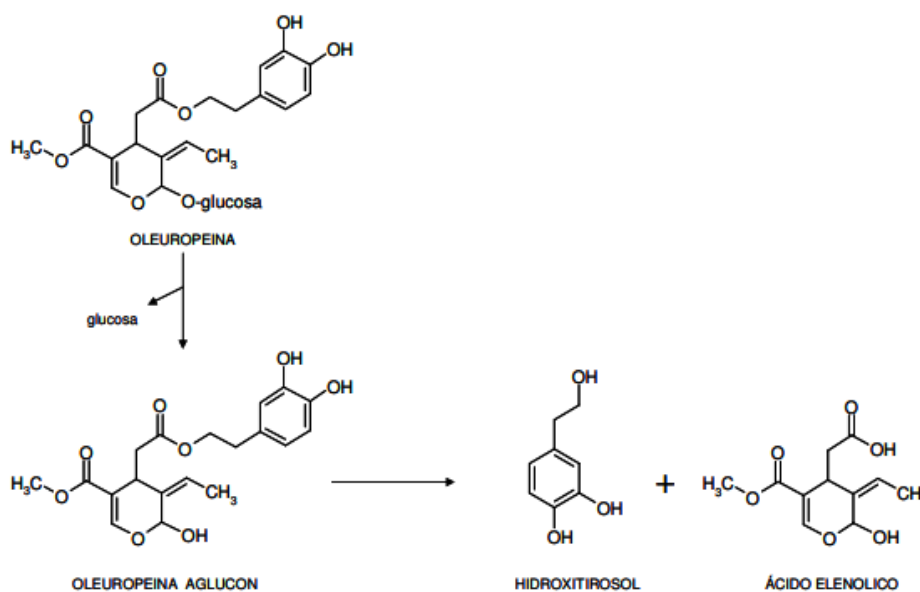


Figura 10. Hidrolización de la oleuropeína y síntesis de HT.

El HT, por tanto, es el compuesto con mayor capacidad antioxidante conocido hasta el momento, presentando, además, propiedades reguladoras del metabolismo, antiinflamatorias e inmunomoduladoras (Vazquez-Gomez *et al.* 2017). Por otro lado, se ha observado que, además de captar radicales libres y de la capacidad de protección frente a la oxidación, el HT (incluso a concentraciones fisiológicas) protege frente a los daños ocasionados por el peróxido de oxígeno en el ADN (Quiles *et al.* 2002). Estas propiedades del HT sobre el estado inflamatorio y la capacidad antioxidante, podrían estar relacionadas con los cambios de metilación que ejerce sobre el ADN, relacionados, a su vez, con los posibles cambios de expresión génica que produce el compuesto (Fuccelli *et al.* 2018).

Gracias a estas características, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) recomienda un consumo mínimo de 5 mg de HT al día, ya que protege de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad o LDL (EFSA2011: <https://www.efsa.europa.eu/en/corporate/pub/ar11>). Algunos estudios en la especie humana han demostrado que los polifenoles del vino o del AOV se absorben de manera dosis-dependiente y que son detectables en plasma u orina (Visioli *et al.* 2003; Weinbrenner *et al.* 2004). Sin embargo, uno de los problemas de los compuestos fenólicos es su baja biodisponibilidad. El concepto de biodisponibilidad más comúnmente aceptado se refiere a "la proporción de nutrientes que se digieren, se absorben y se metabolizan a través de las rutas metabólicas habituales de asimilación" (Srinivasan 2001). Por este motivo, no siempre los polifenoles más abundantes son los más activos en el organismo, ya sea por una menor actividad intrínseca, una menor absorción a nivel intestinal, por ser altamente metabolizables o por excretarse de forma rápida. En este sentido, hemos de tener en cuenta que, prácticamente todos los compuestos fenólicos sufren diversas modificaciones desde su ingesta hasta la utilización por parte del organismo, de modo que en la mayoría de los casos, los polifenoles que se encuentran en plasma o tejidos son muy diferentes a las formas presentes en los alimentos, y de ahí, la difícil tarea de identificación de sus metabolitos y de su actividad biológica (Day & Williamson 2001; Natsume *et al.* 2003). No obstante, en el caso del HT existe una alta biodisponibilidad (Bulotta *et al.* 2014), de manera que es altamente absorbido por el organismo, permitiendo realizar sus diferentes funciones metabólicas y farmacocinéticas (Bulotta *et al.* 2014). Debido a sus propiedades farmacológicas (potente antioxidante, regulador del metabolismo, inmunomodulador y propiedades antiinflamatorias) y su elevada

estabilidad y biodisponibilidad, el HT se ha convertido en uno de los antioxidantes naturales más estudiados (Tabla 4).

Tabla 4. Efectos del HT en la protección frente a enfermedades cardiovasculares. (Fuente: Bulotta *et al.* 2014).

Protección	Efecto
Enfermedades vasculares	Antioxidante
	↓ Activación endotelial
	↓ Adhesión de monocitos
	↓ La agregación plaquetaria
Enfermedades cardíacas	↓ La proliferación de células vasculares del músculo liso
	↓ Oclusión coronaria
	↓ Cardiotoxicidad
	↓ Isquemia
Cáncer	↓ Infarto de miocardio
	↓ La proliferación celular
	↓ Mortalidad
	Detención del ciclo celular
	↓ Crecimiento del tumor
	↓ Inflamación

Sin embargo, existen pocos estudios enfocados a determinar los efectos del HT durante la gestación y, más concretamente, en los efectos que podría tener sobre gestaciones afectadas por IUGR. La hipótesis de que el HT podría mejorar las condiciones uterinas en gestaciones con riesgo de sufrir IUGR se basa en las propiedades antioxidantes del HT, ya que el proceso de IUGR se relaciona con un inadecuado transporte de nutrientes y oxígeno, lo que determinará un estado antioxidante fetal debilitado (Gupta *et al.* 2004; Kamath *et al.* 2006; Biri *et al.* 2007; Prior *et al.* 2007; Ly *et al.* 2015). Es por ello que, si el HT es capaz de atravesar la placenta y actuar a nivel fetal, el feto podría mejorar su actividad antioxidante y enfrentarse de manera más adecuada a las condiciones adversas uterinas propias de gestaciones afectadas por IUGR. Un reciente trabajo de nuestro grupo (Vazquez-Gomez *et al.* 2017) mostró que la suplementación de la dieta materna con hidroxitirosol durante la gestación mejora los patrones de desarrollo pre- y postnatal y las características metabólicas de la descendencia. Los principales beneficios observados fueron un mayor peso medio de la camada al nacimiento (Tabla 5) y una menor incidencia de lechones con bajo peso al nacimiento.

Tabla 5. Efecto de la suplementación de la dieta materna con hydroxytyrosol sobre el peso al nacimiento. Valores medios (\pm SEM) de peso al nacimiento (kg) en camadas de 2-6 y 7-10 lechones en grupos tratados con hidroxitirosol y control (Vazquez-Gomez *et al.* 2017). Las letras del superíndice indican diferencias significativas entre grupos según el tamaño de la camada: C \neq D, $P < 0,05$.

	Grupo Control	Grupo hidroxitirosol
2-6 lechones/camada	1,21 \pm 0,05 ^C	1,38 \pm 0,05 ^D
7-10 lechones/camada	1,13 \pm 0,03 ^C	1,23 \pm 0,02 ^D
Todas las camadas	1,15 \pm 0,02	1,27 \pm 0,02

Además, en los lechones de las camadas más prolíficas, la suplementación materna durante la gestación con hidroxitirosol favoreció una mayor ganancia media diaria y mayores pesos corporales al destete (Figura 11).

En resumen, a pesar de que existen numerosos estudios acerca de los posibles efectos positivos de la administración de HT sobre el cáncer y enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, no existen trabajos en los que se determinen los posibles beneficios o efectos adversos de la suplementación materna con HT sobre el desarrollo fetal. El estudio de posibles efectos adversos es importante porque su mecanismo de acción a nivel molecular comparte numerosas similitudes con otros polifenoles más estudiados como el resveratrol (Chango & Pogribny 2015). Por ello, se puede hipotetizar que la suplementación con HT podría tener efectos adversos no conocidos. Por tanto, profundizar en el conocimiento de los mecanismos de acción del HT y sus efectos sobre el desarrollo fetal, puede conducir a nuevas estrategias nutricionales en casos de gestaciones comprometidas.

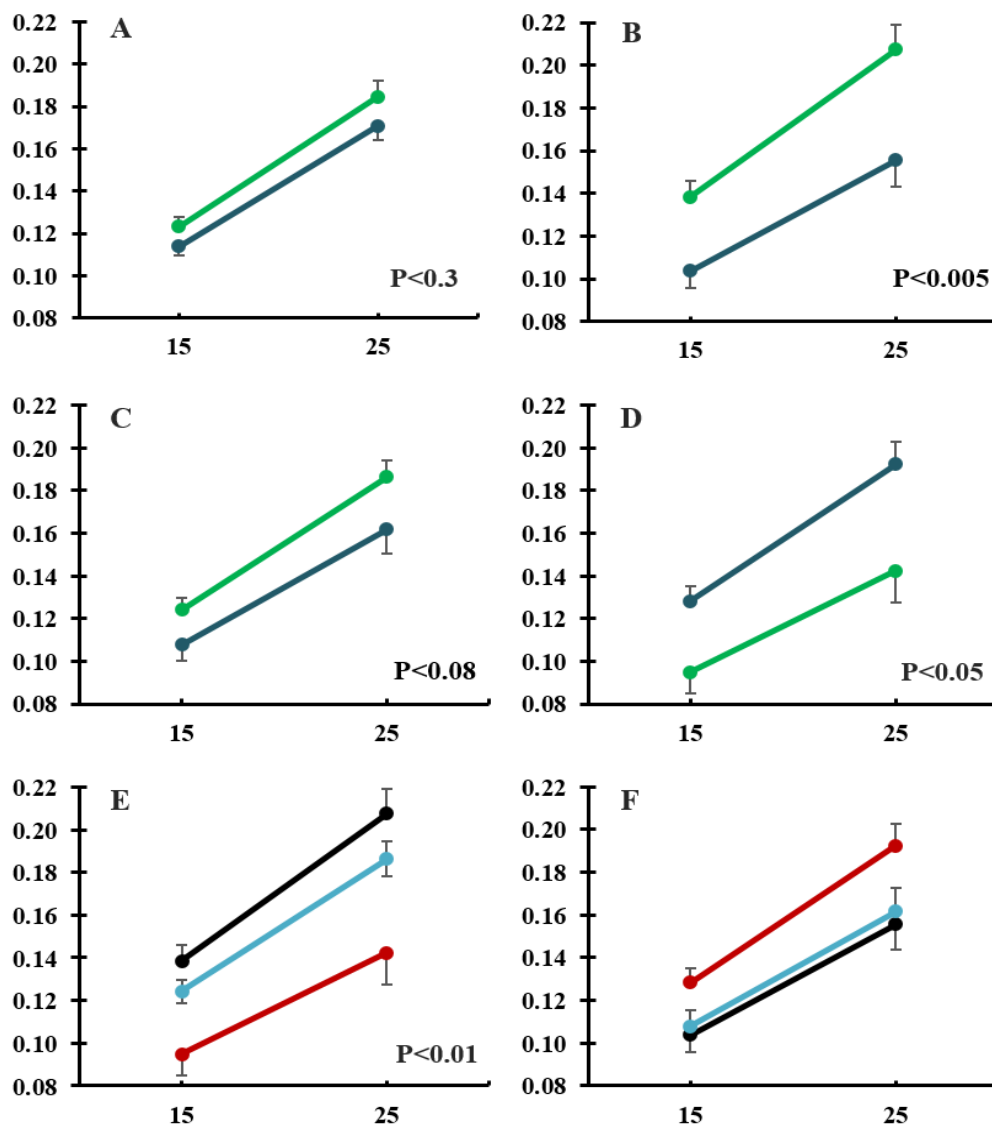


Figura 11. Cambios en la ganancia diaria media (Kg/día \pm S.E.M.) de los lechones durante el período de lactación. El panel A representa las diferencias totales entre los grupos de tratamiento. Los paneles B, C y D representan diferencias entre tratamientos teniendo en cuenta el tamaño de la camada (2-6, 7-8 y 9-10 lechones, respectivamente). Los paneles E y F representan las diferencias dentro del tratamiento teniendo en cuenta el tamaño de la camada en los grupos control y tratado, respectivamente. Azul oscuro: grupo hidroxitirosol. Verde: grupo control. Rojo: 9-10 lechones/camada. Azul claro: 8-7 lechones/camada. Negro: 2-6 lechones/camada (Vazquez-Gomez *et al.* 2017).

1.5. Genómica funcional como herramienta para el estudio de la fisiología y el desarrollo prenatal de la raza ibérica

En la actualidad, disponemos de numerosas herramientas moleculares y métodos estadísticos al alcance de la mejora genética animal, que tienen utilidad para explorar la base genética de caracteres complejos como el crecimiento, la deposición de grasa o la prolificidad en todas las especies ganaderas. Existen dos tipos de enfoques principales utilizados dentro de los estudios de la base genética de caracteres de interés:

- Enfoque libre de hipótesis o *hyphotesis-free*: como su nombre indica, este tipo de enfoque no tiene consideraciones previas y se enfoca en el estudio del genoma completo. Dentro de este tipo de estudio podemos diferenciar entre:
 - *Estudios estructurales*: abarcan los estudios basados en el análisis de variantes estructurales o marcadores/polimorfismos de ADN, cubriendo todo el genoma; incluyen los estudios de desequilibrio de ligamiento (QTLs) y los estudios de asociación de SNP (GWAS).
 - *Estudios funcionales*: engloban los análisis transcriptómicos (mediante Microarrays y RNA-seq) y estudios a otros niveles de la función génica (epigenómica, proteómica, metabolómica).
- Enfoque con hipótesis previa o *hyphotesis-driven*: se focaliza en el estudio estructural o funcional de un número limitado de genes (genes candidato). Estos genes son seleccionados con un criterio biológico, posicional o funcional, por lo que es necesario disponer de un conocimiento previo de la biología, posición o función de dichos genes, así como de la base metabólica o fisiológica del carácter de interés. Cuenta con la ventaja de presentar gran robustez estadística (Tabor *et al.* 2002).

La búsqueda de QTLs (*quantitative trait locus*) relacionados con caracteres de interés, como calidad de carne, inmunidad, reproducción o producción comenzó hace ya varias décadas mediante el empleo de marcadores de tipo microsatélite (Andersson *et al.* 1994; Ollivier 2009) y fue una estrategia pionera en la identificación de regiones genómicas de interés. Sin embargo, el enorme desarrollo de las tecnologías de análisis masivo de polimorfismos de tipo SNP (*Single Nucleotide Polimorphism*) mediante chips de genotipado, ha impuesto esta tecnología en los últimos años para el barrido

genómico completo. Los chips de alta densidad disponibles a nivel comercial para especies domésticas incluyen decenas o centenas de miles de SNPs distribuidos por todo el genoma (Goddard & Hayes 2009; Fan *et al.* 2010). Entre sus aplicaciones destacan los estudios de asociación tipo GWAS (*Genome-Wide Association Studies*), los cuales permiten realizar estudios de asociación entre datos fenotípicos de interés y datos genotípicos representativos de todo el genoma, pudiendo así detectar SNPs relacionados con caracteres de interés (Goddard & Hayes 2009). En humanos, el primer estudio GWAS se publicó en 2005 por (Klein *et al.* 2005), y no fue hasta 2010 cuando se publicó el primer estudio GWAS en cerdo (Duijvesteijn *et al.* 2010). A partir de entonces, son numerosos los trabajos de tipo GWAS llevados a cabo para identificar mutaciones en porcino (revisado en (Sharma *et al.* 2015)). Sin embargo, a día de hoy no hay estudios genómicos estructurales enfocados en la identificación de SNPs relacionados con el desarrollo prenatal, probablemente debido a la multitud de factores maternos y ambientales que influyen en dicho proceso, la dificultad de disponer de registros antes del nacimiento y a la baja heredabilidad del carácter peso al nacimiento (Wittenburg *et al.* 2008). En un estudio reciente realizado en la raza duroc se ha llevado a cabo un estudio de asociación con la finalidad de encontrar marcadores maternos relacionados con el número de lechones nacidos vivos y nacidos muertos (Chen *et al.* 2019). En este sentido, todos los estudios de asociación relacionados para el estudio de la prolificidad en porcino, se han llevado a cabo tomando como unidad experimental a la cerda gestante, y no a cada feto de forma individualizada (Wang *et al.* 2016). Sin embargo, los eventos que ocurren durante el desarrollo prenatal tienen un fuerte impacto sobre las características del individuo en la vida postnatal. Es por ello que los estudios genómicos y funcionales realizados durante la vida prenatal permiten profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares con influencia sobre el correcto desarrollo fetal y por tanto, sobre el correcto desarrollo postnatal.

La detección de nuevas regiones genómicas asociadas a caracteres de interés en ganado porcino y otras especies domésticas ha avanzado a gran velocidad gracias a la secuenciación de su genoma. Se sabe que el genoma porcino está compuesto por 18 pares de autosomas y dos cromosomas sexuales (X e Y), con un tamaño estimado de alrededor de 2,7 Gb (Walters *et al.* 2012). Desde la secuenciación completa del genoma porcino (Archibald *et al.* 2010), se han puesto a disposición de la comunidad científica varias versiones del genoma completo, hasta la versión actual Scrofa 11.1, generada en 2017 por el *Swine Genome Sequencing Consortium* (SGSC).

Una alternativa clara a los estudios de genómica estructural como los GWAS o QTLs son los estudios genómicos funcionales. La primera tecnología que permitió analizar la expresión génica de miles de genes conocidos en un mismo experimento fue el

microarray de expresión (Figura 12). Esta tecnología ha sido extensamente usada en estudios transcriptómicos en porcino (Pena *et al.* 2013; Ovilo *et al.* 2014a), siendo los microarrays más conocidos los de la plataforma *Affymetrix Porcine GeneChip™* y el *Agilent Porcine Gene Expression Microarray*. No obstante, en los últimos años esta tecnología ha sido progresivamente remplazada por los métodos de secuenciación de nueva generación o NGS como el RNA-seq.

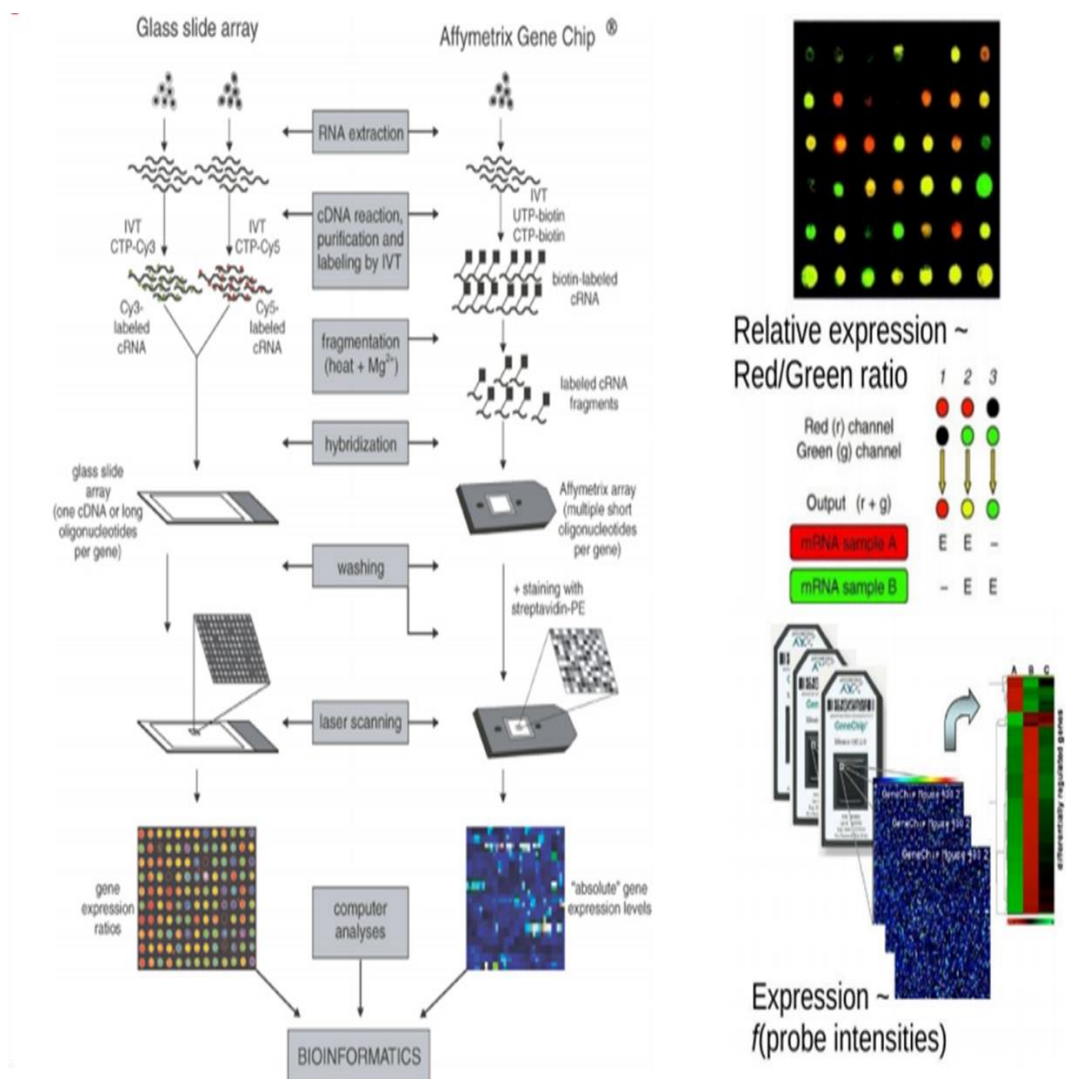


Figura 12. Resumen del flujo de trabajo en el análisis de microarrays de expresión (Staal *et al.* 2003; Ranz & Machado 2006).

La secuenciación masiva del transcriptoma mediante RNA-seq permite secuenciar el genoma completo de una muestra, permitiendo cuantificar prácticamente todos los transcritos expresados (Piskol *et al.* 2013; Korir & Seoighe 2014). Además, si lo comparamos con los microarrays, la tecnología RNA-seq tiene una mayor sensibilidad y rango dinámico, mayor reproducibilidad y necesita menor cantidad de ARN de partida (Oshlack *et al.* 2010; Chen *et al.* 2011).

Esta metodología permite identificar:

- Genes e isoformas que se están expresando en un organismo, tejido o célula.
- Diferencias de expresión génica condicionadas a un tratamiento o fenotipo.
- Nuevas isoformas y/o exones (Trapnell *et al.* 2012).
- Polimorfismos o SNP en regiones del genoma que se expresan (Chepelev *et al.* 2009; Gan *et al.* 2010; Guttman *et al.* 2010; Pflueger *et al.* 2011).

El procedimiento general para este tipo de análisis comienza con la extracción y fragmentación del ARN, seguido de la secuenciación de dichos fragmentos cortos mediante alguna de las tecnologías disponibles en la actualidad (Tabla 6).

Tabla 6. Resumen de los procesos y empresas desarrolladoras de sistemas de secuenciación NGS (Levy & Myers 2016).

Manufacturer	Amplification	Detection	Chemistry	URL
Commercial				
Illumina	Clonal	Optical	Sequencing by synthesis	http://www.illumina.com
Oxford Nanopore	Single molecule	Nanopore	Nanopore	http://www.nanoporetech.com
Pacific Biosciences	Single molecule	Optical	Sequencing by synthesis	http://www.pacb.com
ThermoFisher Ion Torrent	Clonal	Solid state	Sequencing by synthesis	http://www.thermofisher.com/us/en/home/brands/ion-torrent.html
Precommercial				
Quantum Biosystems	Single molecule	Nanogate	Nanogate	http://www.quantumbiosystems.com
Base4	Single molecule	Optical	Pyrophosphorolysis	http://base4.co.uk
GenapSys (GENIUS)	Clonal	Solid state	Sequencing by synthesis	http://www.genapsys.com
QIAGEN (GeneReader)	Clonal	Optical	Sequencing by synthesis	http://www.qiagen.com
Roche Genia	Single molecule	Solid state	Nanopore	http://geniachip.com
Postcommercial				
Roche 454 (GS FLX)	Clonal	Optical	Sequencing by synthesis	http://www.454.com
Helicos BioSciences (Heliscope)	Single molecule	Optical	Sequencing by synthesis	—
Dover (Polonator)	Clonal	Optical	Sequencing by ligation	—
ThermoFisher Applied Biosystems (SOLiD)	Clonal	Optical	Sequencing by ligation	http://www.thermofisher.com/us/en/home/brands/applied-biosystems.html
Complete Genomics	Clonal	Optical	Sequencing by ligation	http://www.completegenomics.com

A continuación, estas lecturas cortas serán mapeadas frente al genoma de referencia en caso de estar disponible, o alineadas *de novo* de no ser así. Finalmente, estas lecturas serán ensambladas en fragmentos más largos (Martin & Wang 2011) y, los niveles de expresión génica son cuantificados gracias a que el número de lecturas

obtenidas es proporcional al nivel de expresión (Oshlack *et al.* 2010). El flujo de trabajo llevado a cabo para el ensamblaje del transcriptoma se presenta en la figura 13.

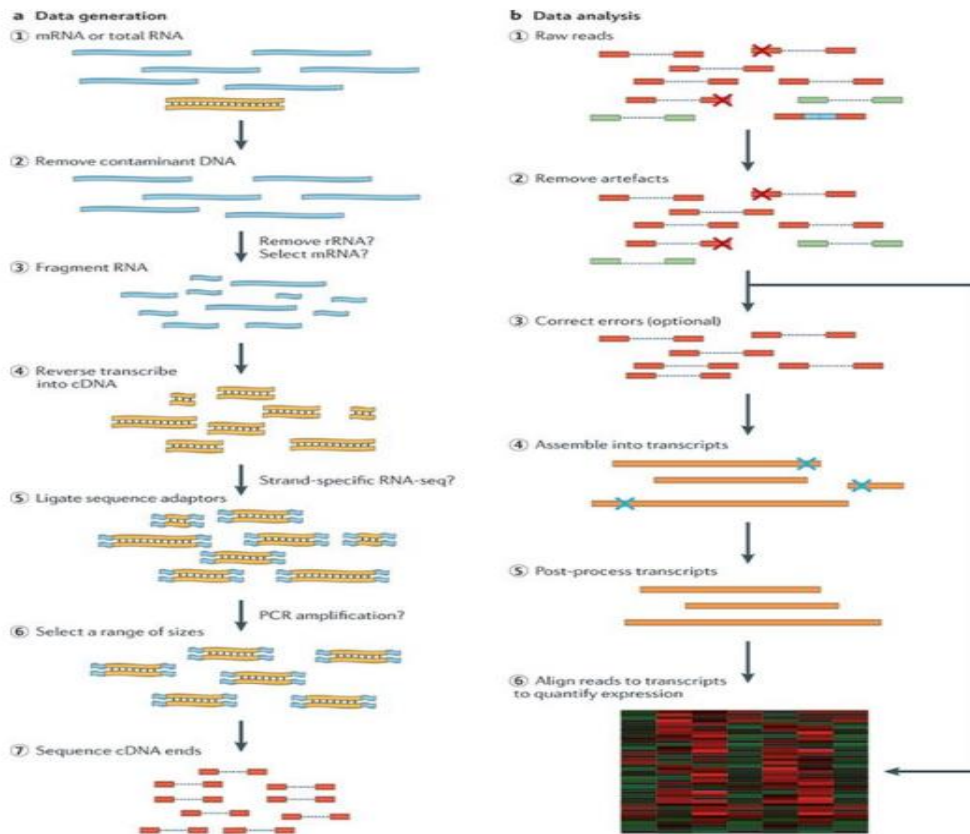


Figura 13. Representación gráfica de un experimento típico de RNA-seq (Martin & Wang 2011).

A pesar de ser una tecnología novedosa y con grandes ventajas con respecto a los microarrays, hemos de tener en cuenta que este tipo de análisis también presentan algunas limitaciones. En primer lugar, se genera una gran cantidad de información, del orden de 5 GB por archivo, lo que dificulta su almacenaje y encarece la metodología (Mantione *et al.* 2014). Además, existen numerosos softwares disponibles (Figura 14) para realizar el análisis bioinformático, siendo necesaria la homogenización de los protocolos de análisis bioinformático. No obstante, ambas tecnologías para el análisis del transcriptoma (tanto Microarrays como RNA-seq) han sido empleadas en la especie porcina con la finalidad de profundizar en el conocimiento de la base genética responsable de las diferencias en cuanto a parámetros productivos y reproductivos entre razas (Puig-Oliveras *et al.* 2014; Ayuso *et al.* 2015a; Ayuso *et al.* 2016; Zhu *et al.* 2016).

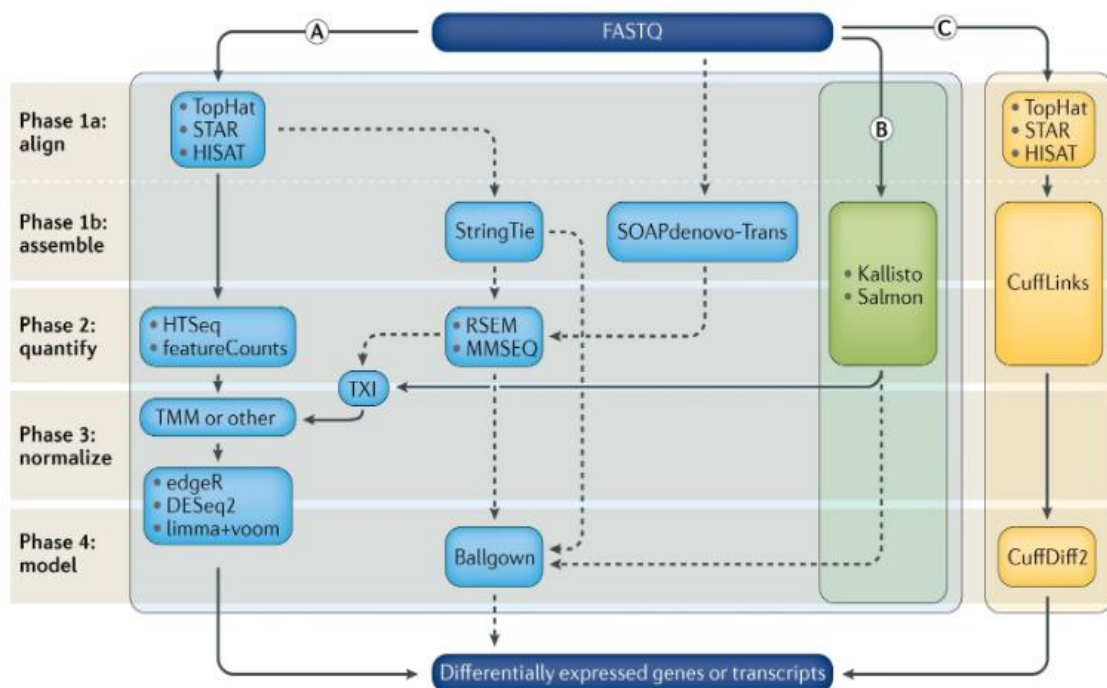


Figura 11. Flujo de trabajo para el análisis de datos de un experimento de RNA-seq (Stark et al. 2019). El análisis computacional para un análisis de expresión diferencial (ED) comienza con las lecturas de ARN sin procesar en formato FASTQ. Se representan tres posibles flujos de trabajo (A, B y C, representados con líneas continuas) y las herramientas alternativas (líneas discontinuas).

Debido a la importancia del músculo esquelético en la industria porcina, son numerosos los estudios enfocados a la identificación de diferencias de expresión asociadas al desarrollo y crecimiento muscular en razas mejoradas (Tabla 7), siendo los estudios en razas tradicionales mucho más escasos. Concretamente, los estudios transcriptómicos realizados en razas tradicionales, específicamente en la raza ibérica, han sido realizados en estadios post-natales de desarrollo (Puig-Oliveras et al. 2014; Ayuso et al. 2015a; Ayuso et al. 2016; Benítez et al. 2019). Sin embargo, la caracterización de los patrones de expresión génica durante el desarrollo muscular prenatal permite comprender las bases moleculares tempranas de las diferencias metabólicas y fenotípicas existentes entre las razas tradicionales y comerciales. De aquí deriva la necesidad de un análisis exhaustivo en busca de genes, redes génicas y rutas moleculares con influencia sobre el desarrollo prenatal en la raza ibérica.

Tabla 7. Trabajos enfocados en el estudio de las diferencias de expresión génica relacionada con el desarrollo muscular durante el desarrollo prenatal en cerdo.

Metodología	Objetivo	Edad gestacional (días)	Razas	Referencia
RT-PCR	Identificación de genes y rutas génicas relacionadas con procesos de miogénesis e identificar genes diferencialmente expresados entre ambas razas de fenotipos divergentes	14, 21, 35, 49, 63, 77 y 91	Pietrain vs. Duroc	(Murani <i>et al.</i> 2007)
Microarray	Detectar las posibles diferencias de expresión relacionadas con los procesos de miogénesis entre razas comerciales y locales	40 y 70	Yorkshire x Landrace vs. Piau	(Sollero <i>et al.</i> 2011)
Microarray	Conocer el perfil transcriptómico durante los procesos de miogénesis y relacionarlo con funciones biológicas	14, 21, 35, 49, 63, 77 y 91	Duroc	(Te Pas <i>et al.</i> 2005)
RNA-seq	Obtener información acerca de las rutas génicas relacionadas con los procesos de miogénesis propias de cada raza	30, 40, 55, 63, 70, 90 y 105	Tongcheng vs. Yorkshire	(Zhao <i>et al.</i> 2011)
RT-PCR	Detectar posibles diferencias de expresión entre razas durante la miogénesis	21, 40, 70 y 90	Duroc x Landrace x Large White vs. Piau	(Reis <i>et al.</i> 2016)
RNA-seq	Comprender la regulación transcriptómica durante la miogénesis	40, 55, 63, 70 y 90	Tongcheng vs. Yorkshire	(Liu <i>et al.</i> 2018)
RNA-seq	Desarrollar un atlas completo del genoma porcino durante el desarrollo del músculo esquelético y detectar diferencias de expresión entre los periodos gestacionales	33, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, y 105	Landrace	(Yang <i>et al.</i> 2019)



2. Justificación y objetivos

En los mamíferos, el desarrollo prenatal y postnatal temprano está fuertemente influido por factores maternos (genotipo, alimentación, estrés, correcto desarrollo y función placentaria). En el caso del cerdo, al ser una especie politoca, esta influencia es muy relevante. Las alteraciones en estos factores pueden dar lugar a deficiencias en el desarrollo y fenómenos de programación prenatal en los fetos, produciéndose cambios epigenéticos encaminados a la adaptación a estas condiciones adversas.

Un retraso en el desarrollo prenatal debido a un ambiente uterino adverso (por deficiencias en el aporte placentario de nutrientes y oxígeno) tendrá como consecuencia el nacimiento de cerdos con bajo peso al nacimiento, los cuales verán reducido su potencial de crecimiento magro y aumentarán su predisposición al engrasamiento como forma de almacenamiento de la energía necesaria para su supervivencia (Quiniou *et al.* 2002; Bee 2004; Rehfeldt & Kuhn 2006). Estos cambios adaptativos tienen consecuencias en la salud y el bienestar de los animales (más susceptibles a padecer enfermedades en la vida adulta; (Sangild 2003; Alvarenga *et al.* 2013; Michiels *et al.* 2013) y en sus rendimientos productivos (canales más pequeñas y engrasadas y cambios en la calidad de la carne (Gondret *et al.* 2006).

Los efectos del medio ambiente uterino sobre el crecimiento prenatal pueden variar debido a factores genéticos individuales y a su interacción con factores nutricionales. En este sentido, el genotipo fetal podría determinar la respuesta adaptativa a un ambiente uterino desfavorable y por tanto modular el correcto desarrollo en la vida postnatal. Los rasgos metabólicos "ahorradores" del cerdo ibérico implican a priori que cualquier alteración en la programación prenatal podría afectarles de forma más acusada que a otras razas comerciales más magras.

En el aspecto productivo, los fenómenos de programación prenatal pueden perjudicar la calidad de la canal y la carne por alteraciones en los procesos de desarrollo muscular y adipocitario (miogénesis y adipogénesis) y en las características de la grasa (perfil de ácidos grasos). El desarrollo muscular en estadios prenatales es uno de los principales factores determinantes del desarrollo postnatal y de la calidad del producto final, ya que el número de miofibrillas está establecido al nacimiento (Beermann *et al.* 1978; Foxcroft *et al.* 2006; Xi *et al.* 2007). Una inadecuada alimentación de la cerda gestante tanto en cantidad de alimento como en calidad del mismo, puede afectar al correcto desarrollo de las fibras musculares y éste, a su vez, determinar un desarrollo fetal inadecuado, apareciendo fetos con crecimiento intrauterino retardado que conducirá al nacimiento de lechones con bajo peso al nacimiento y a una disminución de la homogeneidad intra- e intercamada. Cabe mencionar que, al igual que el tipo y cantidad de fibra muscular afecta al correcto desarrollo fetal y por tanto a la calidad de los productos finales, la cantidad y composición de la grasa juega

un papel muy importante en las características organolépticas y la calidad de la canal y la carne. Además, estos lechones “programados” durante el desarrollo prenatal son más susceptibles a desarrollar enfermedades, debido a alteraciones en su sistema inmune y a un aumento del estrés oxidativo y disminución de la capacidad antioxidante (Dennerly 2010).

Una de las estrategias que se pueden adoptar para mitigar los efectos de la programación prenatal, y por tanto de la aparición de lechones con bajo peso es la administración de sustancias antioxidantes a la cerda gestante. Uno de los agentes antioxidantes más potentes y asequibles en la actualidad es el hidroxitirosol, un polifenol presente en las hojas del olivo y en las aceitunas (y por tanto en el aceite de oliva virgen), con propiedades antioxidantes, anti-inflamatorias e inmuno-moduladoras (Tundis *et al.* 2008). Un estudio reciente de nuestro grupo sugiere que la suplementación materna con hidroxitirosol ayuda a disminuir la aparición del crecimiento intrauterino retardado y, por tanto, disminuye el número de lechones con bajo peso al nacimiento (Vazquez-Gomez *et al.* 2017).

La presente Tesis Doctoral se realizó bajo el marco de los proyectos del plan estatal de I+D+i: *Estrategias para mitigar los efectos de la variabilidad de peso intracamada en el desarrollo y calidad de la producción cárnica en el cerdo ibérico* (AGL2013-48121-C3-R) y *Factores individuales y nutricionales determinantes de la homogeneidad y los rendimientos en producción de cerdo ibérico* (AGL2016-79321-C2-R). En consonancia con los objetivos de dichos proyectos, y la problemática expuesta en el apartado anterior, la presente Tesis Doctoral plantea dos objetivos generales:

- Profundizar en el conocimiento de factores individuales con efecto sobre el desarrollo prenatal. Para la consecución de este objetivo se plantearon dos objetivos específicos:
 - **Objetivo específico I (Experimento I):** Establecer el estadio de desarrollo fetal más adecuado para la toma de datos en el desarrollo experimental de la Tesis Doctoral. Se corresponde con el artículo: *Ontogeny of Sex-Related Differences in Foetal Developmental Features, Lipid Availability and Fatty Acid Composition* publicado en la revista *International Journal of Molecular Sciences*.
 - **Objetivo específico II (Experimento II):** Determinar los efectos individuales (genotipo, peso y sexo) con influencia sobre el metabolismo fetal y el transcriptoma muscular y sus posibles implicaciones en el desarrollo postnatal. Se corresponde con el artículo: *Impact of Genotype, Body*

Weight and Sex on the Prenatal Muscle Transcriptome of Iberian Pig en revisión en la revista *Plos One*

- Determinar la efectividad de la suplementación materna con polifenoles para mitigar los efectos de la programación prenatal. Para la consecución de este objetivo general se plantearon dos objetivos específicos:
 - **Objetivo específico III (Experimento III):** Profundizar en el conocimiento del modo de acción y efectividad de estrategias nutricionales basadas en la administración de agentes antioxidantes a cerdas gestantes para mitigar los efectos del retraso en el crecimiento intrauterino y disminuir la variabilidad del peso intra-camada. Se corresponde con el artículo: *Polyphenols and IUGR Pregnancies: Effects of Maternal Hydroxytyrosol Supplementation on Placental Gene Expression and Fetal Antioxidant Status, DNA-Methylation and Phenotype*, publicado en la revista *International Journal of Molecular Sciences*
 - **Objetivo específico IV (Experimento III):** Determinar el efecto de la administración de agentes antioxidantes a cerdas gestantes sobre la composición y acumulación de grasa y energía en los tejidos fetales. Se corresponde con el artículo: *Polyphenols and IUGR Pregnancies: Effects of Maternal Hydroxytyrosol Supplementation on Hepatic Fat Accretion and Energy and Fatty Acids Profile of Fetal Tissues* publicado en la revista *Nutrients*.



3. Diseño Experimental

Los experimentos comprendidos en la presente Tesis Doctoral se realizaron en las instalaciones de la Granja Animalario del Departamento de Reproducción Animal del INIA, las cuales cumplen con los requisitos locales, nacionales y europeos para los establecimientos dedicados a investigación animal (RD53/2013) y fueron evaluados y aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal de este organismo (procedimiento CEEA2013/036).

Las reproductoras ibéricas (n=29) utilizadas en el desarrollo experimental se genotiparon mediante pirosecuenciación (Ovilo *et al.* 2005), lo que permitió confirmar la homocigosis para el alelo *LEPRc.1987T*. El mismo procedimiento se llevó a cabo con los eyaculados de los machos utilizados para la inseminación en cada uno de los experimentos, que en el caso de verracos ibéricos puros resultaron homocigotos para *LEPRc.1987T*, y los machos Large White resultaron homocigotos para *LEPRc.1987C*. Este marcador nos permitió identificar a los descendientes F1 puros (genotipo TT) y cruzados al 50% (genotipo CT)

Todas las cerdas fueron sometidas a tratamientos de sincronización de celo y ovulación con altrenogest (Regumate, MSD, Boxmeer, The Netherlands) e inseminadas con 3 dosis de 80ml de eyaculado, con 6×10^9 espermatozoides móviles. Estas hembras se alimentaron con una dieta estándar (89,8% de materia seca, 15,1% de proteína cruda, 2,8% de grasa y 3,00 Mcal/kg) durante todo el desarrollo experimental. A los 35 días después de la inseminación, se procedió al diagnóstico de gestación mediante ultrasonografía. Una vez confirmado que todas las cerdas estaban preñadas, se las pesó y la cantidad de alimento recibido por cada una de ellas se redujo a un 50% de sus necesidades nutricionales diarias hasta el momento del muestreo. Estudios anteriores (Gonzalez-Bulnes *et al.* 2012a) han demostrado que esta restricción en la cantidad de alimento aumenta la incidencia de fetos con retraso en el crecimiento intrauterino.

3.1. Diseño experimental I: Ontogeny of Sex-Related Differences in Foetal Developmental Features, Lipid Availability and Fatty Acid Composition.

Un total de 9 cerdas multíparas ibéricas puras fueron inseminadas con semen de verraco ibérico puro. En el día 70 de gestación se llevó a cabo el muestreo de los fetos presentes en cinco de las cerdas, mientras que las cuatro cerdas restantes se muestrearon a los 90 días de gestación.

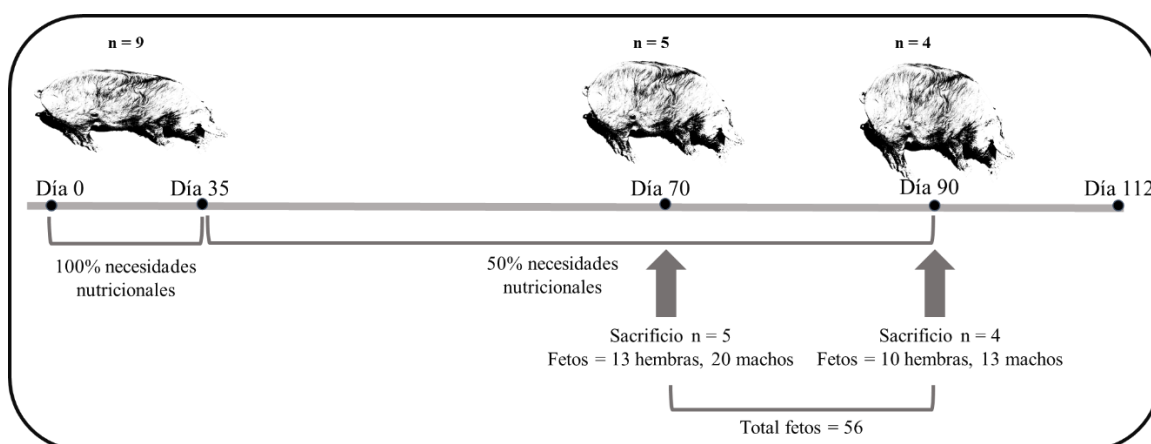


Figura 3.1. Diseño experimental I.

En el momento del muestreo se obtuvieron muestras de sangre materna con la finalidad de realizar la valoración de los parámetros bioquímicos indicativos del metabolismo glicémico (glucosa y fructosamina) y lipídico (colesterol total y fracciones de alta y baja densidad; HDL-c y LDL-c, respectivamente). Inmediatamente, se obtuvo el útero completo de cada cerda para las determinaciones morfométricas y el muestreo de los fetos. Una vez pesado el útero completo, se extrajo de manera individual líquido amniótico y alantoideo de cada bolsa fetal y sangre del corazón fetal. Estos fluidos, en paralelo a las determinaciones en sangre materna, se utilizaron para la valoración de los parámetros bioquímicos indicativos del metabolismo glicémico y lipídico y, en el caso de la sangre fetal, también para determinar el estado antioxidante/oxidativo de los fetos. Para ello, la capacidad antioxidante total fue calculada usando la medida del poder reductor del hierro o FRAP por sus siglas en inglés "*ferric reducing antioxidant power*", mientras que para calcular el estado oxidativo fetal se determinó la peroxidación lipídica mediante la concentración de malondialdehído (MDA).

Una vez obtenidas las muestras de sangre descritas, se determinó el sexo fetal y se extrajeron placenta y feto. La placenta fue pesada para establecer un índice de desarrollo y maduración placentaria mientras que en los fetos se determinaron varias medidas morfométricas como peso, longitud, corpulencia del cuerpo (circunferencia torácica y abdominal) y tamaño de la cabeza (longitud occipito-nasal y diámetro biparietal). Una vez hecho esto, se obtuvo el peso de la cabeza tras su separación del resto del cuerpo por la unión atlanto-occipital.

A continuación, se realizó una necropsia completa de todos los órganos fetales, los cuales se pesaron todos juntos (peso de las vísceras), y de la canal o carcasa vacía. Seguidamente se pesaron todos los órganos por separado (cerebro, hígado, corazón, pulmones, adrenales, páncreas, intestino, riñones y bazo) y se calcularon los pesos relativos de cada órgano en función del peso corporal. Finalmente, se obtuvieron

muestras de hígado y músculo (*longissimus dorsi*), así como de la canal completa, en las que se determinó el porcentaje de grasa total y el perfil de ácidos grasos (AG), tanto la fracción de lípidos polares (FLP) como la fracción de lípidos neutros (FLN). Las proporciones individuales de los diferentes AG se utilizaron para determinar el contenido en AG saturados (AGS), poliinsaturados (AGP) y monoinsaturados (AGM), así como los totales de omega-3 y omega-6 ($\Sigma n-6$ y $\Sigma n-3$ respectivamente), índices de insaturación y desaturación y el ratio $\Sigma n-6/\Sigma n-3$.

3.2. Diseño experimental II: Impact of Genotype, Body Weight and Sex on the Prenatal Muscle Transcriptome of Iberian Pig

En este experimento se usaron 7 cerdas ibéricas puras multíparas que fueron inseminadas con semen heterospérmico (mezcla de semen de verraco ibérico puro y Large White). A día 77 de gestación todas las cerdas fueron sacrificadas y se procedió al muestreo de los fetos.

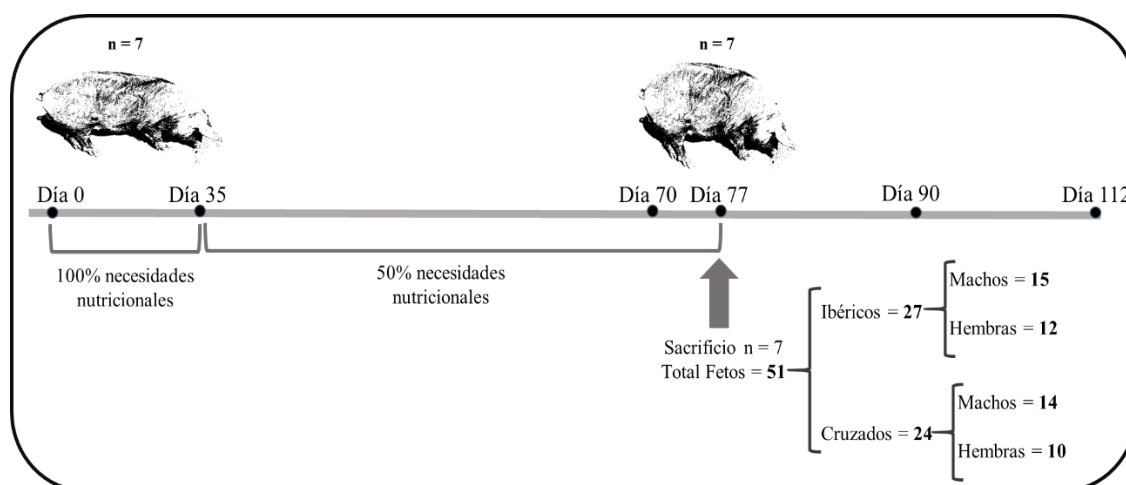


Figura 3.2. Diseño experimental II.

Al igual que en el experimento anterior, tras el sacrificio de las cerdas gestantes, se obtuvo el útero completo y todos los fetos fueron recogidos en función de su posición en el útero. De nuevo, el sexo fetal se determinó mediante inspección visual. Se obtuvieron muestras de líquido amniótico y alantoideo de cada feto para determinar parámetros metabólicos tanto lipídicos (colesterol, HDLc, LDLc y triglicéridos) como glicémicos (glucosa y fructosamina). Inmediatamente después de esto, se obtuvieron muestras de sangre del

corazón de cada feto para determinar los mismos parámetros metabólicos anteriormente descritos. Las mismas medidas morfométricas, pesadas y ratios descritas para el experimento I se tomaron para cada uno de los fetos obtenidos en este experimento. Muestras de hígado, de lomo y de la propia carcasa de cada feto se utilizaron para determinar el porcentaje de grasa total, así como la composición de AG de cada uno de estos tejidos. Además, se tomaron muestras de hígado para determinar el genotipo fetal mediante pirosecuenciación. La distribución final resultó en un total de 51 fetos, 27 ibéricos puros, de los cuales 12 fueron hembras y 15 fueron machos; y 24 fetos cruzados IBxLW, de los cuales 10 fueron hembras y 14 fueron machos.

Los resultados morfométricos y de composición en AG de éste experimento se recogieron en el artículo titulado *Effects of fetal genotype and sex on developmental response to maternal malnutrition*, el cual se publicó en la revista *Reproduction, Fertility and Development*. Este artículo no ha sido incluido dentro de la presente tesis doctoral.

Por otro lado, se seleccionaron un total de 32 fetos (16 de cada genotipo y cada sexo) con pesos extremos (tanto pesos altos como pesos bajos) para realizar un estudio transcriptómico completo en hígado y músculo mediante la técnica de RNA-seq. En el experimento II se recogen los resultados obtenidos en el estudio del transcriptoma muscular, mientras que los resultados del transcriptoma hepático se recogerán en un nuevo artículo que actualmente está en preparación.

Para llevar a cabo el análisis transcriptómico muscular, se extrajo el ARN de los 32 individuos seleccionados, se cuantificó y se evaluó la calidad del mismo.

Para la construcción de la librería se utilizó el kit de preparación de Illumina, y las librerías resultantes se secuenciaron con TruSeq SBS kit v-3HS (Illumina) en secuencias dobles pareadas con longitud de lectura de 2 x 76 pb, generando así los archivos FASTQ. El flujo de trabajo seguido a partir de obtener los archivos FASTQ es representado en la figura 3.3.

Con el objetivo de validar los resultados obtenidos mediante la técnica de RNA-seq se llevó a cabo una PCR cuantitativa o qPCR. Para ello, 7 de los

genes más importantes relacionados con metabolismo lipídico y desarrollo muscular como *FOS*, *TRIM63*, *APOE*, *INSR*, *PPARG*, *PLIN1* y *ADIPOQ*, que resultaron diferencialmente expresados (DE) en la secuenciación del ARN, fueron seleccionados para realizar la qPCR. La expresión génica se determinó mediante el método Cp (Pfaffl 2001), y los datos se normalizaron frente a los genes endógenos *GAPDH* y *ACTB*. Finalmente, los valores de expresión normalizados se compararon entre grupos usando un *t-test* y la correlación de Person's se utilizó para comparar los valores en FPKM obtenidos mediante RNA-seq y los valores obtenidos mediante qPCR.

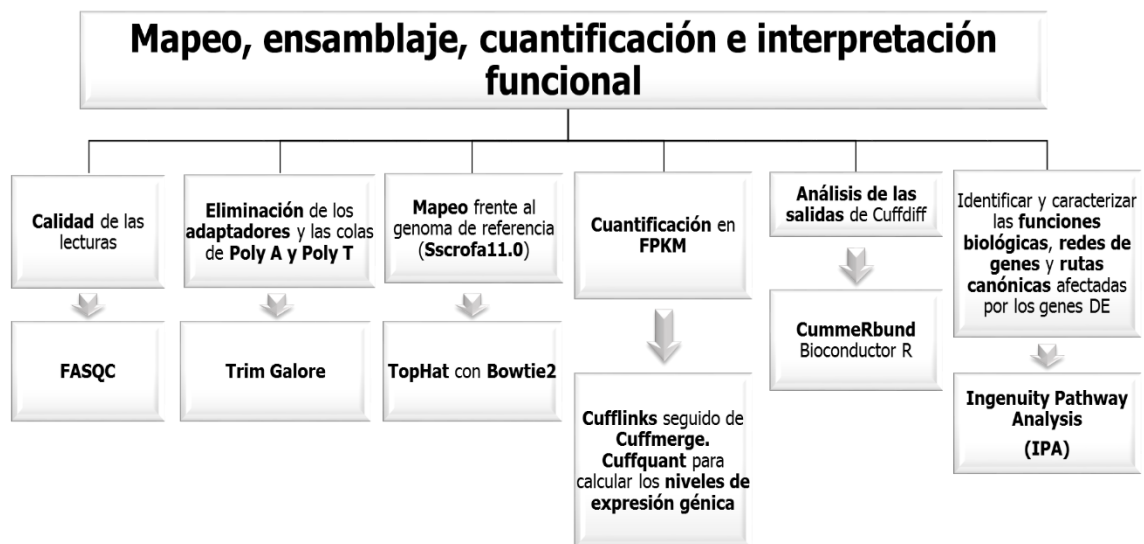


Figura 3.3. Flujo de trabajo seguido para obtener la expresión diferencial génica entre grupos y su interpretación funcional.

3.3. Diseño experimental III: Polyphenols and IUGR Pregnancies: Effects of Maternal Hydroxytyrosol Supplementation on Placental Gene Expression and Fetal Antioxidant Status, DNA-Methylation and Phenotype, y Polyphenols and IUGR Pregnancies: Effects of Maternal Hydroxytyrosol Supplementation on Hepatic Fat Accretion and Energy and Fatty Acids Profile of Fetal Tissues.

En este experimento se utilizaron 13 cerdas ibéricas puras primíparas, las cuales fueron inseminadas con semen de verraco ibérico puro. En el día 35 de gestación se establecieron dos grupos experimentales: un grupo control en el que se incluyeron 7 cerdas a las que no se les suplementó la alimentación con ningún tratamiento (grupo C); y un grupo tratado en el que se incluyeron 6 cerdas, a las que se les suministró diariamente 1.5 mg de hidroxitirosol por kg de pienso (grupo HTX) hasta el día del muestreo (día 100).

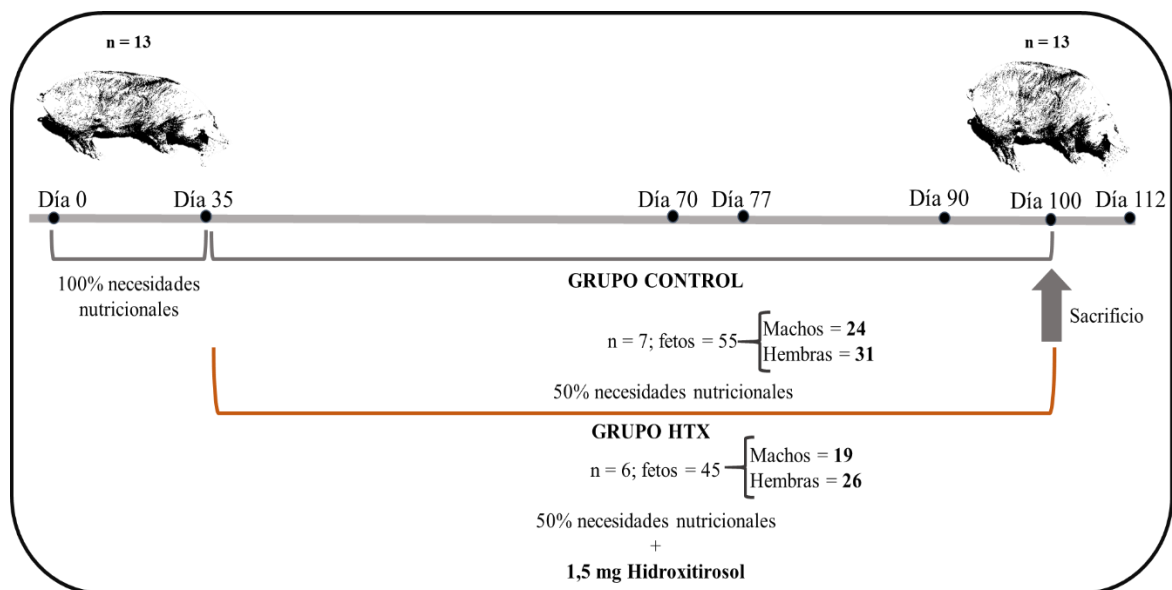


Figura 3.4. Diseño experimental III.

El día del muestreo, todas las cerdas fueron pesadas y se les midió la grasa dorsal mediante ultrasonografía. Seguidamente fueron sacrificadas y se obtuvieron muestras de sangre que permitieron analizar concentración plasmática de hidroxitirosol mediante HPLC. Las muestras de sangre además permitieron evaluar determinados biomarcadores de homeostasis como capacidad antioxidante o marcadores del metabolismo lipídico (colesterol total y sus fracciones HDL-c y LDL-c) y glicémicos (glucosa y fructosamina). Para determinar la capacidad antioxidante total, se realizó la

prueba "Trolox Equivalent Antioxidant Capacity" o TEAC. También se evaluaron los niveles de aminoácidos con capacidades antioxidantes como la taurina y el glutatión, así como los niveles de sus precursores glicina y serina. La metilación del ADN también fue evaluada en sangre mediante electroforesis capilar. El porcentaje de metilación de la cisteína total (mCyt/tCyt) fue calculado mediante la fórmula $\mu\text{mol mCyt} / (\mu\text{mol mCyt} + \mu\text{mol tCyt}) * 100$.

A continuación, se obtuvo el útero completo de cada cerda para las evaluaciones morfométricas y recogida de muestras. Antes de proceder al muestreo fetal, se anotó la posición en el útero de cada feto, así como el sexo de cada uno de ellos y se midió el diámetro del *ductus arteriosus* y de la aorta descendiente de cada feto mediante ultrasonografía. En este momento, se obtuvieron muestras de sangre fetal de corazón con el fin de analizar los mismos parámetros descritos para las muestras de sangre materna.

Por último, se registraron todos los datos morfométricos y de pesos descritos en los experimentos I y II y se tomaron muestras de placenta y de sangre, músculo e hígado fetales.

Para el análisis de expresión génica, primeramente, se tomaron muestras de cada una de las placentas fetales y se realizó una PCR cuantitativa (qPCR) o a tiempo real (RT-PCR). Los genes candidato seleccionados para este estudio fueron *SOD1*, *CAT*, *HIF1A*, *VEGFA*, *NOS2* y *UCP2*. El protocolo seguido para realizar la RT-PCR fue el mismo que el descrito en el experimento I, con la excepción de la elección de los genes endógenos, que en este caso fueron *ACTB* y *B2M*, ya que resultaron ser los más estables para este análisis.

Además, se tomaron muestras de sangre (en las que se realizaron las mismas determinaciones que en sangre materna) y de músculo (*l. dorsi*). Una parte del músculo fue fijada en paraformaldehído al 4% con el fin de evaluar la cantidad y la distribución de las fibras musculares; mientras que otra parte se utilizó para determinar el contenido total en grasa y el perfil de AG como se explica en el experimento I y II. Estas mismas determinaciones se realizaron sobre una muestra de hígado fetal, en el que también se determinó el contenido de energía bruta en una bomba calorimétrica adiabática.

Los resultados obtenidos tras evaluar el efecto de la suplementación materna sobre desarrollo fetal, marcadores biomoleculares de homeostasis, metilación del ADN, contenido y distribución de fibras musculares y expresión génica se recogen en el artículo *Polyphenols and IUGR Pregnancies: Effects of Maternal Hydroxytyrosol Supplementation on Placental Gene Expression and Fetal Antioxidant Status, DNA-Methylation and Phenotype*, publicado en *International Journal of Molecular Sciences*

de la presente Tesis Doctoral. Por otro lado, los resultados obtenidos de analizar el efecto de la suplementación materna con Hidroxitirosol sobre el contenido graso y perfil de AG en hígado y músculo, así como sobre el contenido en energía bruta en hígado, se recogen en el artículo *Polyphenols and IUGR Pregnancies: Effects of Maternal Hydroxytyrosol Supplementation on Hepatic Fat Accretion and Energy and Fatty Acids Profile of Fetal Tissues* publicado en *Nutrients*.



4. Resultados

4.1. Experimento I

Ontogeny of Sex-Related Differences in Foetal Developmental Features, Lipid Availability and Fatty Acid Composition

Consolacion Garcia-Contreras, Marta Vazquez-Gomez, Susana Astiz, Laura Torres-Rovira, Raul Sanchez-Sanchez, Ernesto Gomez-Fidalgo, Jorge Gonzalez, Beatriz Isabel, Ana Rey, Cristina Ovilo and Antonio Gonzalez-Bulnes

International Journal of Molecular Science. 2017

DOI: 10.3390/ijms18061171



Article

Ontogeny of Sex-Related Differences in Foetal Developmental Features, Lipid Availability and Fatty Acid Composition

Consolacion Garcia-Contreras ¹, Marta Vazquez-Gomez ², Susana Astiz ¹, Laura Torres-Rovira ¹, Raul Sanchez-Sanchez ¹, Ernesto Gomez-Fidalgo ¹, Jorge Gonzalez ³, Beatriz Isabel ², Ana Rey ², Cristina Ovilo ¹ and Antonio Gonzalez-Bulnes ^{1,*}

¹ Subdirección General de Investigación y Tecnología, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid 28040, Spain; consolacion@inia.es (C.G.-C.); astiz.susana@inia.es (S.A.); torres.laura@inia.es (L.T.-R.); raulss@inia.es (R.S.-S.); fidalgo@inia.es (E.G.-F.); ovilo@inia.es (C.O.)

² Faculty of Veterinary Sciences, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, Spain; mvgomez@ucm.es (M.V.-G.); bisabel@ucm.es (B.I.); anarey@ucm.es (A.R.)

³ Micros Veterinaria, Leon 24007, Spain; info@microsvet.com

* Correspondence: bulnes@inia.es; Tel.: +34-91-347-4022

Academic Editor: Marica Bakovic

Received: 13 February 2017; Accepted: 25 May 2017; Published: 31 May 2017

Abstract: Sex-related differences in lipid availability and fatty acid composition during swine foetal development were investigated. Plasma cholesterol and triglyceride concentrations in the mother were strongly related to the adequacy or inadequacy of foetal development and concomitant activation of protective growth in some organs (brain, heart, liver and spleen). Cholesterol and triglyceride availability was similar in male and female offspring, but female fetuses showed evidence of higher placental transfer of essential fatty acids and synthesis of non-essential fatty acids in muscle and liver. These sex-related differences affected primarily the neutral lipid fraction (triglycerides), which may lead to sex-related postnatal differences in energy partitioning. These results illustrate the strong influence of the maternal lipid profile on foetal development and homeorhesis, and they confirm and extend previous reports that female offspring show better adaptive responses to maternal malnutrition than male offspring. These findings may help guide dietary interventions to ensure adequate fatty acid availability for postnatal development.

Keywords: fatty-acids; foetus; lipids; metabolism; nutrition; sex

1. Introduction

Prenatal development of humans and animals requires adequate placental supply of oxygen and nutrients [1,2], which, in turn, requires adequate maternal nutrition and placental function. Inadequate placental nutrient supply leads to intrauterine growth restriction (IUGR), resulting in newborns that are small for their gestational age. Such offspring may be predisposed to perinatal morbidity and mortality [3] as well as lifelong chronic non-communicable disorders such as obesity, type II diabetes, hypertension and cardiovascular diseases [4–7].

Among humans, IUGR due to maternal malnutrition shows a much higher incidence in resource-challenged areas (15%) than in developed areas (6%) [8,9]. In recent years, incidence has been increasing in developed countries because of maternal eating disorders, voluntary intake restriction for aesthetic reasons [10] and abnormal placental development leading to placental insufficiency [11]. This abnormal placental development has been associated with postponement of childbearing, inadequate lifestyle and maternal and gestational factors [8,12,13].

Article

Ontogeny of Sex-Related Differences in Foetal Developmental Features, Lipid Availability and Fatty Acid Composition

Consolacion Garcia-Contreras¹, Marta Vazquez-Gomez², Susana Astiz¹, Laura Torres-Rovira¹, Raul Sanchez-Sanchez¹, Ernesto Gomez-Fidalgo¹, Jorge Gonzalez³, Beatriz Isabel², Ana Rey², Cristina Ovilo¹ and Antonio Gonzalez-Bulnes^{1,*}

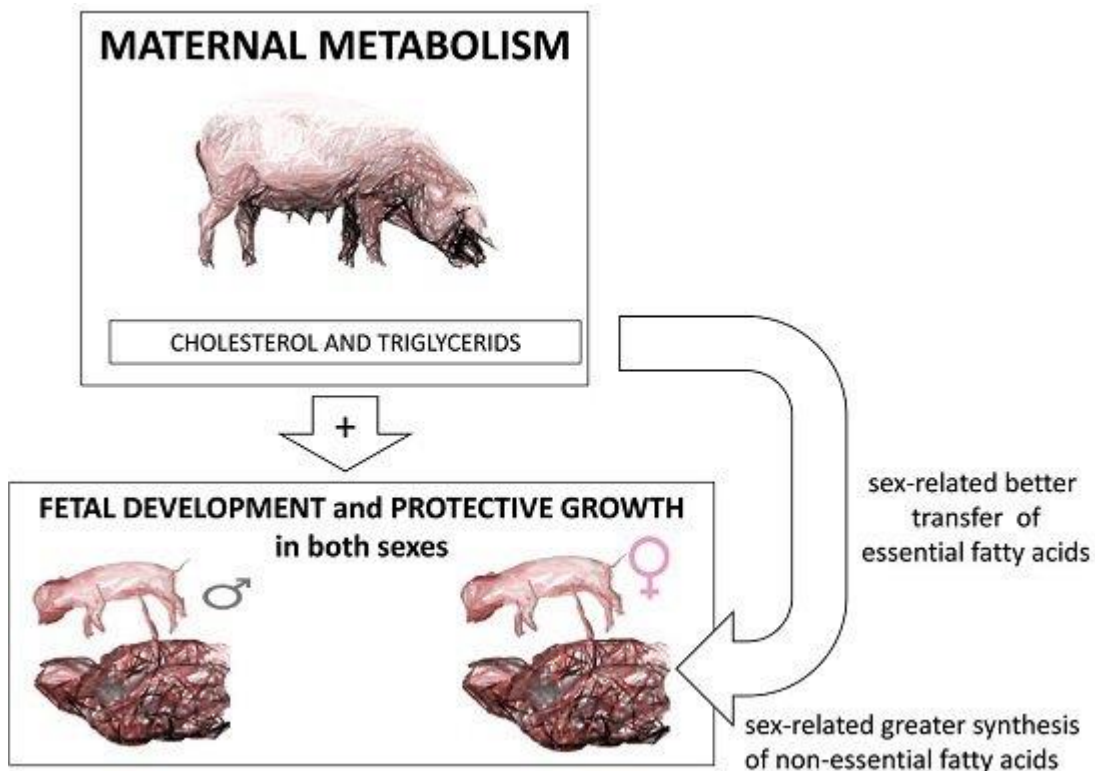
- ¹ Subdirección General de Investigación y Tecnología, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid 28040, Spain; consolacion@inia.es (C.G.-C.); astiz.susana@inia.es (S.A.); torres.laura@inia.es (L.T.-R.); raulss@inia.es (R.S.-S.); fidalgo@inia.es (E.G.-F.); ovilo@inia.es (C.O.)
- ² Faculty of Veterinary Sciences, Universidad Complutense de Madrid, Madrid 28040, Spain; mvgomez@ucm.es (M.V.-G.); bisabelr@ucm.es (B.I.); anarey@ucm.es (A.R.)
- ³ Micros Veterinaria, Leon 24007, Spain; info@microsvet.com

* Correspondence: bulnes@inia.es; Tel.: +34-91-347-4022

Academic Editor: Marica Bakovic

Received: 13 February 2017; Accepted: 25 May 2017; Published: 31 May 2017

Graphical Abstract



Abstract: Sex-related differences in lipid availability and fatty acid composition during swine foetal development were investigated. Plasma cholesterol and triglyceride concentrations in the mother were strongly related to the adequacy or inadequacy of foetal development and concomitant activation of protective growth in some organs (brain, heart, liver and spleen). Cholesterol and triglyceride availability was similar in male and female offspring, but female foetuses showed evidence of higher placental transfer of essential fatty acids and synthesis of non-essential fatty acids in muscle and liver. These sex-related differences affected primarily the neutral lipid fraction (triglycerides), which may lead to sex-related postnatal differences in energy partitioning. These results illustrate the strong influence of the maternal lipid profile on foetal development and homeorhesis, and they confirm and extend previous reports that female offspring show better adaptive responses to maternal malnutrition than male offspring. These findings may help guide dietary interventions to ensure adequate fatty acid availability for postnatal development.

Keywords: fatty-acids; foetus; lipids; metabolism; nutrition; sex

1. Introduction

Prenatal development of humans and animals requires adequate placental supply of oxygen and nutrients [1,2], which, in turn, requires adequate maternal nutrition and placental function. Inadequate placental nutrient supply leads to intrauterine growth restriction (IUGR), resulting in newborns that are small for their gestational age. Such offspring may be predisposed to perinatal morbidity and mortality [3] as well as lifelong chronic non-communicable disorders such as obesity, type II diabetes, hypertension and cardiovascular diseases [4–7].

Among humans, IUGR due to maternal malnutrition shows a much higher incidence in resource-challenged areas (15%) than in developed areas (6%) [8,9]. In recent years, incidence has been increasing in developed countries because of maternal eating disorders, voluntary intake restriction for aesthetic reasons [10] and abnormal placental development leading to placental insufficiency [11]. This abnormal placental development has been associated with postponement of childbearing, inadequate lifestyle and maternal and gestational factors [8,12,13].

Previous studies from our group using a swine model of IUGR have highlighted the importance of maternal nutrition for proper foetal development. Maternal malnutrition compromises foetal metabolism and development, causing growth retardation and triggering adaptive changes in the foetus to increase likelihood of survival [14]. Work from other groups has shown that the maternal lipid profile and placental efficiency are strongly related to cholesterol and triglyceride availability for human and other animal foetuses, which affects their viability and growth [15–20]. The developing foetus requires substantial amounts of lipids, mainly polyunsaturated fatty acids (PUFA), the availability of which is determined largely by maternal circulating levels and placental transfer [21]. Impaired placental transfer of PUFA causes or exacerbates IUGR [21–23] and may be caused by lipid peroxidation or other forms of oxidative stress [24,25].

Extensive research in humans and animal models has shown that the sex of the offspring can affect pre- and postnatal development in compromised pregnancies such as IUGR [14,26–31]. Less clear is whether this sex effect extends to lipid homeostasis. Therefore the present study exploited the power of the pig as a translational model [32] to investigate sex-related differences in lipid availability and fatty acid composition during foetal development. The pig, like humans, is omnivorous and prone to sedentary behaviour and obesity, and the metabolism, cardiovascular system and relative organ sizes in pigs are similar to those in humans [33–36]. A further advantage of studying swine

is that insights will impact not only research but also farm productivity. IUGR occurs often in swine because of inadequate maternal nutrition or placental insufficiency [2,37,38], and it limits farm profitability [14].

2. Results

Foetuses were obtained from five sows on Gestational Day (GD) 70 ($n = 33$) or from four sows on GD 90 ($n = 23$). The average number of foetuses per sow was 6.8 ± 3.8 on GD 70 and 5.8 ± 3.6 on GD 90. Of the 56 foetuses, 23 were female, of which 13 were recovered on GD 70 and 10 on GD 90; among the 33 male foetuses, 20 were recovered on GD 70 and 13 on GD 90. Hence, the sex ratio was close to 1:1, with males accounting for 57.7% of GD 70 foetuses and 56.5% of GD 90 foetuses. Evidence of IUGR was found in eight pregnancies, affecting four GD 70 foetuses (11%) and four GD 90 foetuses (17.4%).

2.1. Effects of Maternal Metabolic Status on Foetal Development

The size and weight of normal (non-IUGR) foetuses increased with gestational age (Table 1), as did development of the placenta, liver, kidney and intestine, based on histology (all $p < 0.0001$).

In these normal foetuses, body development correlated strongly with maternal lipid profile depicted in Figure 1. Specifically, lower maternal plasma cholesterol concentrations correlated with lower foetal body weight ($r = 0.777$, $p < 0.05$) and corpulence in terms of trunk length ($r = 0.832$), thoracic circumference ($r = 0.808$) and abdominal circumference ($r = 0.958$) (all $p < 0.01$). Lower maternal plasma cholesterol concentrations also correlated with higher ratios of organ-to-body weight for brain ($r = -0.774$), heart ($r = -0.752$), liver ($r = -0.679$), and spleen ($r = -0.712$) (all $p < 0.01$); these correlations reflect changes to improve foetal viability. Conversely, lower maternal plasma concentrations of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c) correlated with lower ratios of heart-to-body weight ($r = 0.677$, $p < 0.05$). Adaptive foetal growth mechanisms were observed already on GD 70, when lower maternal plasma cholesterol concentrations correlated with higher ratios of head-to-body weight ($r = -0.987$, $p < 0.005$) and heart-to-body weight ($r = -0.883$, $p < 0.05$). At the same time, maternal HDL-c concentrations correlated with higher ratios of brain-to-body weight ($r = -0.923$) and spleen-to-body weight ($r = -0.891$, both $p < 0.05$).

Table 1. Effect of age and sex on absolute weights and body measurements of male and female foetuses at Gestational Day (GD) 70 and 90. Mean values for morphometric measurements and absolute body and main organs weights at GD 70 and 90 in female (F) and male (M) foetuses.

					MSE ^a	p-Value				Age × Sex	
	70		90			Same Age		Same Sex			
	F	M	F	M		F vs. M	70 vs. 90	F	M		
Body morphometry	Body length (cm)	20.2	20.2	29.1	29.5	0.495	0.343	0.746	<0.001	<0.001	<0.001
	Occipito-nasal length (cm)	7.7	6.6	8.4	9.2	0.403	0.045	0.193	0.241	<0.001	<0.001
	Biparietal diameter (cm)	3.0	2.9	3.9	4.1	0.071	0.748	0.173	<0.001	<0.001	<0.001
	Trunk diameter (cm)	2.7	2.9	4.2	4.6	0.117	0.177	0.028	<0.001	<0.001	<0.001
	Trunk circumference (cm)	11.0	11.4	16.7	17.5	0.355	0.222	0.221	<0.001	<0.001	<0.001
	Abdominal circumference (cm)	9.3	9.8	14.5	15.3	0.439	0.294	0.277	<0.001	<0.001	<0.001
Body weight	Body weight (g)	171.9	180.1	542.0	616.4	18.969	0.453	0.09	<0.001	<0.001	<0.001
	Head weight (g)	46.8	46.6	130.4	138.9	4.086	0.948	0.340	<0.001	<0.001	<0.001
	Carcass weight (g)	91.3	99.1	309.2	362.7	12.160	0.268	0.06	<0.001	<0.001	<0.001
Viscerae and main organs weight	Brain weight (g)	6.5	6.5	19.9	19.9	0.378	0.968	0.996	<0.001	<0.001	<0.001
	Viscerae weight (g)	26.3	27.7	86.5	96.5	3.245	0.495	0.168	<0.001	<0.001	<0.001
	Heart weight (g)	1.4	1.5	4.7	5.2	0.193	0.616	0.233	<0.001	<0.001	<0.001
	Lungs weight (g)	6.1	6.3	17.4	20.4	0.691	0.662	0.072	<0.001	<0.001	<0.001
	Liver weight (g)	7.8	7.7	15.8	18.4	0.905	0.827	0.172	<0.001	<0.001	<0.001
	Intestine weight (g)	5.2	4.9	21.7	25.2	1.089	0.599	0.187	<0.001	<0.001	<0.001
	Spleen weight (g)	0.2	0.2	1.2	1.5	0.053	0.425	0.018	<0.001	<0.001	<0.001
Kidneys weight (g)	2.2	2.2	5.6	6.1	0.260	0.951	0.375	<0.001	<0.001	<0.001	

^a MSE = Mean square error.

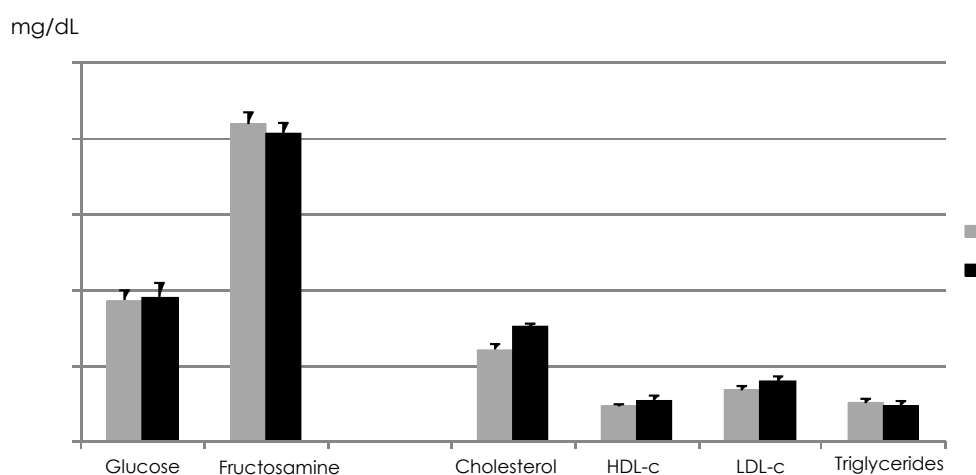


Figure 1. Metabolic profiles of sows, from which foetuses were harvested on Gestational Day (GD) 70 or 90. Mean fasting values (mg/dL) (\pm SEM) of glucose, fructosamine, total cholesterol, high-density and low-density lipoprotein-cholesterol (HDL-c and LDL-c, respectively) and triglycerides in maternal plasma on the day of harvest.

Maternal plasma concentrations of glucose and fructosamine did not affect weight of normal foetuses on GD 70, but they did show an influence on GD 90. Lower plasma fructosamine concentrations correlated with lower foetal body weight ($r = 0.964$) as well as

higher ratios of head-to-body weight ($r = -0.962$) and brain-to-head weight ($r = -0.969$, all $p < 0.05$). Similarly, lower maternal glucose levels correlated with higher ratios of head-to-body weight ($r = -0.959$) and brain-to-head weight ($r = -0.963$, both $p < 0.05$).

2.2. Effects of Foetal Sex on Developmental Trajectories during Pregnancy

No significant association was observed between offspring sex and foetal weight in normal foetuses (Table 1), although among male foetuses collected on GD 90, we observed a trend toward higher total body weight ($p = 0.09$) and carcass weight ($p = 0.06$) compared to female foetuses. Fat content of the carcass, the *longissimus dorsi* muscle or the liver did not vary significantly as a function of foetal sex or gestational age (Table 2).

Table 2. Effects of gestational time and sex on foetal adiposity. Mean values (%) for fat content in the *longissimus dorsi* muscle (LD) and liver at Gestational Day (GD) 70 and 90 in female (F) and male (M) foetuses.

	70		90		MSE ^a	p-Value			
	F	M	F	M		Same Age F vs. M		Same Sex 70 vs. 90	
						70	90	F	M
Fat in LD (%)	0.09	0.08	0.07	0.08	0.003	0.605	0.681	0.293	0.641
Fat in Liver (%)	0.14	0.14	0.14	0.14	0.002	0.434	0.522	0.814	0.294
Fat in carcass	0.08	0.09	0.08	0.09	0.002	0.107	0.070	0.069	0.660

^a MSE = Mean square error.

Male and female normal foetuses collected on GD 70 did not differ significantly in the relative weights or maturation states of several structures and organs. On GD 90, normal female foetuses showed a significantly higher degree of placental development ($p < 0.05$) and significantly higher ratios of head-to-body weight and brain-to-body weight (both $p < 0.05$; Figure 2).

The comparison, on both GD 70 and 90, of foetuses with severe growth restriction and normal foetuses, showed smaller values than their littermates for body weight (GD 70, 126.5 ± 14.3 g vs. 183.4 ± 4.1 g, $p < 0.05$; GD 90, 404.5 ± 30.9 g vs. 621.8 ± 14.5 g, $p < 0.005$), body length (GD 70, 17.6 ± 0.9 cm vs. 20.5 ± 0.2 cm; GD 90, 27.0 ± 0.9 cm vs. 29.8 ± 0.4 cm; both $p < 0.05$), head weight (GD 70, 35.3 ± 3.2 g vs. 48.2 ± 1 g, $p < 0.05$; GD 90, 103.5 ± 6.3 g vs. 141.9 ± 3.5 g, $p < 0.005$), carcass weight (GD 70, 66.2 ± 8.9 g vs. 100 ± 2.9 g, $p < 0.05$; GD 90, 222.3 ± 18.7 g vs. 364.1 ± 9.6 g, $p < 0.005$) and total weight of viscerae (GD 70, 18.2 ± 2 g vs. 28.3 ± 0.9 g, $p < 0.01$; GD 90, 64.3 ± 7.3 g vs. 98 ± 2.3 g, $p < 0.05$). However, the ratio of brain-to-body weight was significantly higher in foetuses with severe growth restriction than in littermates on GD 70 (0.048 ± 0.004 vs. 0.036 ± 0.001) and GD 90 (0.045 ± 0.004 vs. 0.033 ± 0.001 ; both $p < 0.01$). This was also observed when only female foetuses were examined ($p < 0.0005$ at both ages; Figure 3). On GD 90, the ratios of brain-to-body weight and brain-to-carcass weight

were significantly higher in fetuses with severe growth restriction (both $p < 0.0005$), as were the ratios of liver- and spleen-to-body weight (both $p < 0.05$; Figure 3).

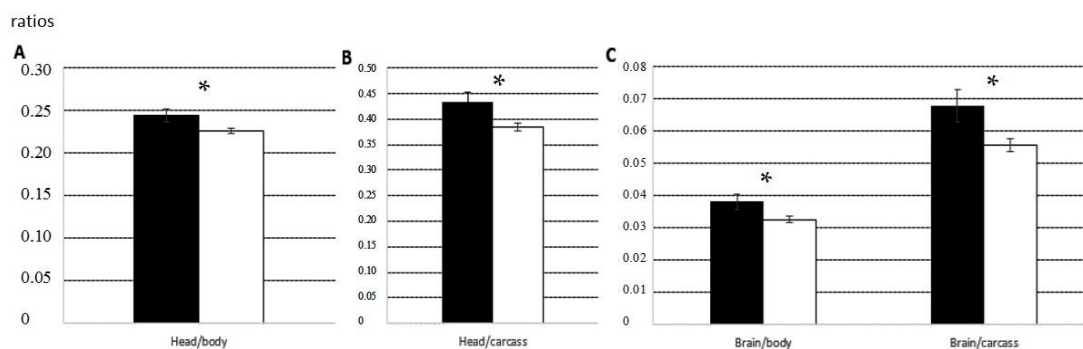


Figure 2. Mean ratios (\pm SEM) of head-to-body weight (A); head-to-carcass weight (B); and brain-to-body weight and brain-to-carcass weight (C) in female fetuses (black bars) and male fetuses (white bars) on Gestational Day (GD) 90. Asterisks indicate significant differences between males and females. * $p < 0.05$.

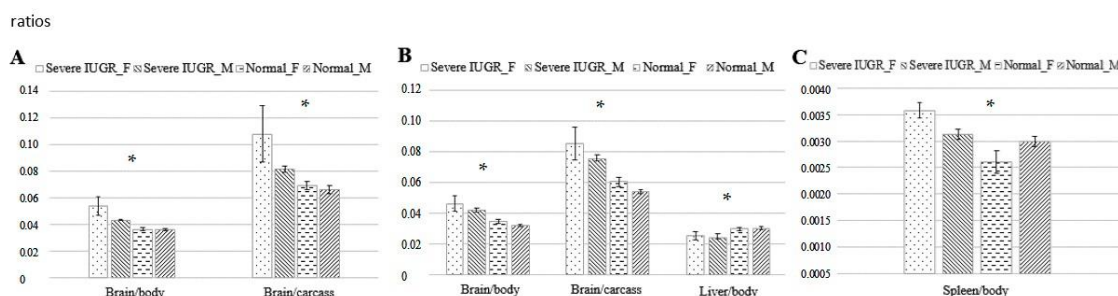


Figure 3. Influence of foetal sex on foetal development under conditions of normal growth or severe IUGR: mean ratios (\pm mean square error) of brain-to-body weight and brain-to-carcass weight on Gestational Day (GD) 70 (A); ratios of brain-to-body weight, brain-to-carcass weight and liver-to-body weight on GD 90 (B); and ratio of spleen-to-body weight on GD 90 (C). Bars indicate, from left to right, female and male fetuses with severe IUGR, then female and male fetuses showing normal growth. Asterisks indicate the p value associated with differences between the foetal sexes and between foetuses showing IUGR or normal growth. * $p < 0.05$.

2.3. Changes in Foetal Metabolism during Pregnancy and Sex-Related Effects

Table 3 shows measurements of indicators of glucose and lipid metabolism based on markers in plasma, allantoic and amniotic fluids from normal fetuses. Comparison of measurements on GDs 70 and 90 shows that the availability of foetal triglycerides significantly decreased in foetal blood ($p < 0.05$) and allantoic fluid ($p < 0.005$) during pregnancy. Over the same period, the availability of foetal triglycerides in amniotic fluid increased ($p < 0.05$). Low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) in foetal plasma decreased during pregnancy ($p < 0.005$), while HDL-c increased ($p < 0.001$). Total cholesterol decreased in amniotic fluid ($p < 0.0001$) but increased in allantoic fluid ($p < 0.005$). In both these compartments, HDL-c and LDL-c concentrations remained unchanged during pregnancy. Similar results were obtained for the two foetal sexes, except that LDL-c in blood decreased to a greater extent in females than males ($p < 0.05$).

Table 3. Effect of age and sex on foetal metabolism. Mean values for parameters of lipids and glucose metabolism at Gestational Day (GD) 70 and 90 in female (F) and male (M) foetuses.

		70		90		MSE *	p-Value					
		F	M	F	M		Same Age		Same Sex		Age × Sex	
							F vs. M	70 vs. 90	F	M		
Glucose metabolism	Glucose (mg/dL)	Foetal plasma	24.3	19.8	64.2	58.6	5.742	0.480	0.748	0.011	<0.001	<0.001
		Amniotic fluid	29.6	23.1	24.3	26.1	1.038	0.017	0.598	0.063	0.310	0.112
		Allantoic fluid	7.5	5.3	21.9	22.0	1.352	0.233	0.976	<0.001	<0.001	<0.001
	Fructosamine (mg/dL)	Foetal plasma	134.8	129.6	107.8	114.9	3.147	0.583	0.190	0.003	0.094	0.012
		Amniotic fluid	48.0	44.2	57.3	57.7	1.216	0.157	0.879	0.002	<0.001	<0.001
		Allantoic fluid	90.2	81.6	270.7	340.8	27.390	0.592	0.568	0.016	0.001	<0.001
Lipid metabolism	Triglycerides (mg/dL)	Foetal plasma	39.4	32.2	28.3	28.6	1.804	0.204	0.938	0.081	0.437	0.154
		Amniotic fluid	1.8	2.5	3.6	6.3	0.701	0.070	0.435	0.048	0.114	0.113
		Allantoic fluid	10.6	11.3	4.9	5.8	0.857	0.793	0.509	0.024	0.024	0.012
	Total cholesterol (mg/dL)	Foetal plasma	65.1	58.7	63.2	59.6	1.636	0.160	0.438	0.743	0.823	0.489
		Amniotic fluid	4.0	3.9	2.8	2.2	0.180	0.885	0.082	0.007	0.001	<0.001
		Allantoic fluid	2.7	2.5	4.5	6.3	0.417	0.636	0.310	0.051	0.004	0.003
	HDL-c (mg/dL)	Foetal plasma	12.8	13.8	21.2	18.7	0.624	0.482	0.072	<0.001	<0.001	<0.001
		Amniotic fluid	2.2	2.5	2.1	2.4	0.068	0.189	0.116	0.529	0.507	0.191
		Allantoic fluid	2.1	2.4	2.2	2.2	0.085	0.145	0.971	0.798	0.272	0.447
LDL-c (mg/dL)	Foetal plasma	45.4	41.0	33.3	35.7	1.261	0.225	0.252	0.005	0.07	0.004	
	Amniotic fluid	3.3	3.5	3.6	3.5	0.094	0.415	0.664	0.302	0.864	0.783	
	Allantoic fluid	3.1	3.4	3.2	4.3	0.233	0.257	348	0.833	0.256	0.349	

* MSE = Square Mean error.

Similar changes to these described in normal foetuses were observed in the subset of foetuses showing severe IUGR, and no sex effects were observed in this case. Foetuses with severe IUGR showed lower plasma LDL-c concentrations than littermates on GD 90 (29.7 ± 2.5 mg/dL vs. 35.8 ± 1.03 mg/dL, $p < 0.05$).

2.4. Changes in Foetal Antioxidant/Oxidative Status during Pregnancy and Sex-Related Effects

Ferric reducing antioxidant power (FRAP), an index of antioxidant capacity, decreased from GD 70 (10.8 ± 1.3 μ mol/mL) to GD 90 (9.9 ± 1.6 μ mol/mL, $p < 0.005$) in samples from normal foetuses, yet the concentration of malondialdehyde (MDA) in plasma, an index of total lipid oxidation, decreased during the same period from 20.6 ± 0.4 mmol/mL to 15.8 ± 0.6 mmol/mL ($p < 0.005$). Nevertheless, the ratio of MDA to cholesterol, which takes into account lipid availability, indicated less relative oxidation on GD 70 than GD 90 (2.8 ± 0.9 vs. 3.5 ± 0.7). Similar results were obtained for the ratio of MDA to LDL-c (4.1 ± 1.5 vs. 6.1 ± 1.2) and the ratio of MDA to triglycerides (5.1 ± 1.9 vs. 8.0 ± 2.8) (all $p < 0.05$; Figure 4).

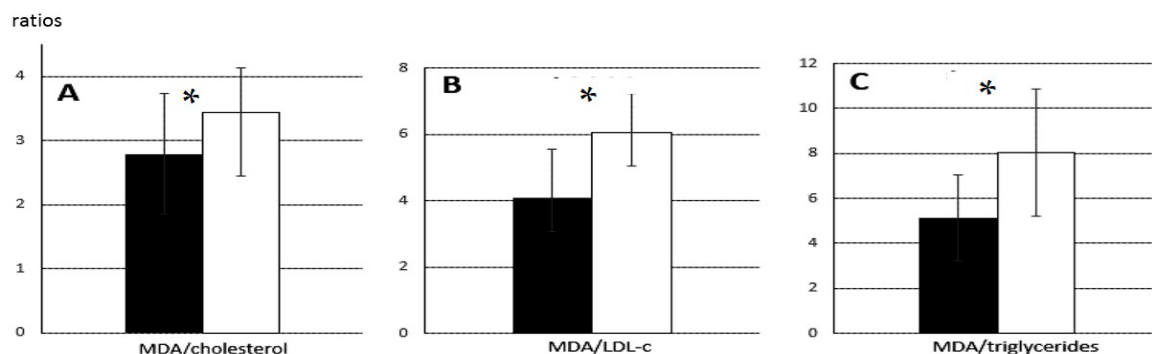


Figure 4. Ratios of MDA to cholesterol, LDL-c and triglycerides of foetuses on Gestational Day (GD) 70 and 90: Mean ratios (\pm SEM) of: MDA to cholesterol (**A**); MDA to LDL-c (**B**); and MDA to triglycerides (**C**) on GD 70 (black bars) or 90 (white bars). Asterisks indicate significant differences between GD 70 and 90. * $p < 0.05$.

2.5. Changes in Foetal Muscle Fatty Acid Composition during Pregnancy and Sex-Related Effects

The neutral and polar fatty acid fractions of the *longissimus dorsi* muscle in normal foetuses varied significantly with gestational age and foetal sex (Tables 4 and 5). On GD 70, the neutral fraction of female normal foetuses contained significantly more α -linolenic fatty acid (C18:3n-3) and total saturated fatty acids (SFA) than the neutral fraction of male normal foetuses (both $p < 0.05$), as well as less cis-vaccenic fatty acid (C18:1n-7) and lower ratios of

$\Sigma n-6/\Sigma n-3$ ($p < 0.01$) and monounsaturated fatty acids (MUFA) to SFA ($p < 0.05$). All these sex-related differences disappeared by GD 90.

During pregnancy, content of palmitoleic acid (C16:1n-7) and homo- γ -linolenic acid (C20:3n-6) increased in female normal fetuses (both $p < 0.001$), as did the ratios of $\Sigma n-6/\Sigma n-3$ ($p < 0.01$) and C18:1/C18:0 ($p < 0.005$). Similar results were observed for male normal fetuses ($\Sigma n-6/\Sigma n-3$ $p < 0.001$ and C18:1/C18:0 $p < 0.01$, respectively). The content of several fatty acids decreased significantly during pregnancy, including cis-7 hexadecenoic acid (C16:1n-9), heptadecanoic acid (C17:1) and eicosapentaenoic acid (C20:5n-3) (all $p < 0.001$ in males and $p < 0.05$ in females), as well as stearic acid (C18:0) and erucic acid (C22:1n-9) (all $p < 0.05$ in males and females).

Table 4. Effects of age and sex on foetal neutral fatty-acid composition of *longissimus dorsi* muscle. Mean values for neutral lipids in the *longissimus dorsi* muscle at Gestational Day (GD) 70 and 90 in female (F) and male (M) foetuses.

Fatty Acids (g/100 g Total Fatty Acids)	70		90		MSE ^A	Same Age		Same Sex		Age x Sex
	F	M	F	M		F vs. M		70 vs. 90		
						70	90	F	M	
C14:0	3.59	3.42	3.75	3.74	0.064	0.383	0.632	0.506	0.036	0.181
C16:0	28.97	26.79	29.33	29.25	0.375	0.069	0.549	0.809	0.001	0.021
C16:1n-9	4.22	4.35	3.46	3.38	0.102	0.625	0.46	0.018	<0.001	<0.001
C16:1n-7	3.78	4.3	7.33	7.28	0.251	0.198	0.563	<0.001	<0.001	<0.001
C17:0	0.35	0.45	0.27	0.28	0.031	0.245	0.73	0.333	0.072	0.107
C17:1	2.96	2.82	1.68	1.77	0.089	0.364	0.177	<0.001	<0.001	<0.001
C18:0	13.55	13	12.2	11.55	0.218	0.351	0.375	0.035	0.012	0.006
C18:1n-9	21.51	21.87	22.09	22.55	0.222	0.583	0.585	0.507	0.168	0.453
C18:1n-7	6.36	6.86	7.34	7.17	0.088	0.029	0.234	0.001	0.109	0.001
C18:2n-6	3.34	3.19	3.64	3.96	0.079	0.363	0.163	0.151	<0.001	0.001
C18:3n-3	0.26	0.17	0.11	0.15	0.015	0.016	0.386	0.004	0.478	0.003
C20:3n-9	0.57	0.63	0.56	0.54	0.010	0.063	0.147	0.757	<0.001	0.003
C20:3n-6	0.24	0.26	0.43	0.47	0.016	0.569	0.098	<0.001	<0.001	<0.001
C20:4n-6	5.23	6.49	4.09	4.19	0.317	0.19	0.499	0.223	0.007	0.012
C20:5n-3	0.29	0.28	0.2	0.19	0.008	0.718	0.605	<0.001	<0.001	<0.001
C22:1n-9	0.32	0.3	0.21	0.2	0.015	0.731	0.796	0.024	0.01	0.007
C22:4n-6	1.44	1.68	1.05	1.11	0.078	0.297	0.219	0.125	0.003	0.006
C22:5n-6	0.91	1.11	0.89	0.91	0.037	0.079	0.567	0.884	0.022	0.067
C22:5n-3	0.37	0.35	0.3	0.3	0.017	0.701	0.621	0.171	0.276	0.373
C22:6n-3	1.46	1.67	1.06	1.03	0.221	0.366	0.862	0.227	0.001	0.147
SFA¹	46.45	43.66	45.55	44.81	0.407	0.029	0.345	0.566	0.166	0.063
MUFA²	39.14	40.51	42.12	42.35	0.394	0.231	0.842	0.027	0.054	0.016
PUFA³	15.01	15.83	12.34	12.84	0.492	0.568	0.307	0.085	0.021	0.027
UI⁴	0.98	1.01	0.87	0.88	0.021	0.546	0.37	0.123	0.008	0.021
PUFAn-3⁵	3.27	2.48	1.67	1.67	0.232	0.3	0.686	0.143	0.001	0.057

PUFAn-6⁶	2.59	3.05	2.37	2.49	0.108	0.173	0.249	0.558	0.037	0.084
$\Sigma n-6/\Sigma n-3$	0.98	1.24	1.45	1.54	0.044	0.006	0.517	0.003	<0.001	<0.001
C18:1/C18:0	2.08	2.24	2.43	2.62	0.05	0.158	0.388	0.009	0.009	0.001
MUFA/SFA	0.85	0.93	0.93	0.95	0.013	0.046	0.618	0.135	0.488	0.052

^a MSE = Mean square error. ¹ SFA = Saturated fatty acids; Includes: C14:0, C16:0, C17:0 and C18:0. ² MUFA = Monounsaturated fatty acids; Includes: C16:1n-9, C16:1n-7, C17:1, C18:1n-9, C18:1n-7 and C22:1n-9. ³ PUFA = Polyunsaturated fatty acids; Includes: C18:2n-6, C18:3n-3, C20:3n-9, C20:3n-6, C20:4n-6, C20:5n-3, C22:4n-6, C22:5n-6, C22:5n-3 and C22:6n-3. ⁴ UI = Conversion index. ⁵ Includes: C18:2n-6, C20:4n-6 and C22:4n-6. ⁶ Includes: C18:3n-3, C20:5n-3 and C22:6n-3.

Table 5. Effects of age and sex on foetal polar fatty-acid composition of *longissimus dorsi* muscle. Mean values for polar lipids in the *longissimus dorsi* muscle at Gestational Day (GD) 70 and 90 in female (F) and male (M) foetuses.

Fatty Acids (g/100 g Total Fatty Acids)	70		90		MSE ^A	Same Age F vs. M		Same Sex 70 vs. 90		Age x Sex
	F	M	F	M		70	90	F	M	
	C14:0	1.99	1.83	1.83		1.84	0.067	0.396	0.944	
C16:0	23.69	23.68	23.79	23.15	0.103	0.967	0.082	0.747	0.062	0.113
C16:1n-9	2.75	2.69	2.05	1.95	0.077	0.724	0.618	0.001	<0.001	<0.001
C16:1n-7	2.92	3.2	3.12	3.03	0.058	0.053	0.645	0.193	0.327	0.308
C17:0	1.11	1.06	0.99	1.06	0.031	0.659	0.42	0.018	0.977	0.713
C17:1	2.34	2.34	1.45	1.55	0.061	0.944	0.088	<0.001	<0.001	<0.001
C18:0	11.15	11.04	11.77	11.82	0.083	0.591	0.801	0.013	<0.001	<0.001
C18:1n-9	21.16	21.46	21.63	21.77	0.127	0.433	0.989	0.14	0.413	0.415
C18:1n-7	6.7	6.63	6.28	6.13	0.058	0.606	0.273	0.001	0.002	<0.001
C18:2n-6	2.76	2.61	4.03	4.19	0.110	0.235	0.44	<0.001	<0.001	<0.001
C18:3n-3	0.14	0.17	0.12	0.13	0.007	0.127	0.512	0.102	0.065	0.036
C20:1n-9	0.7	0.76	0.84	0.85	0.016	0.229	0.804	0.004	0.024	0.003
C20:3n-9	0.58	0.63	0.63	0.56	0.010	0.015	0.016	0.068	0.007	0.012
C20:3n-6	0.23	0.25	0.57	0.67	0.030	0.382	0.14	<0.001	<0.001	<0.001
C20:4n-6	12.86	12.76	12.76	13.21	0.092	0.595	0.103	0.716	0.075	0.252
C20:5n-3	0.31	0.31	0.3	0.27	0.008	0.974	0.252	0.757	0.055	0.181
C22:1n-9	0.55	0.56	0.78	0.74	0.018	0.847	0.176	<0.001	<0.001	<0.001
C22:4n-6	3.02	2.97	2.01	2.11	0.070	0.541	0.074	<0.001	<0.001	<0.001
C22:5n-6	1.35	1.38	1.19	1.24	0.024	0.704	0.65	0.02	0.038	0.019
C22:5n-3	0.72	0.68	0.69	0.62	0.015	0.308	0.285	0.526	0.157	0.180
C22:6n-3	2.98	2.99	3.16	3.09	0.028	0.932	0.355	0.055	0.148	0.101
SFA ¹	37.94	37.63	38.39	37.87	0.692	0.447	0.261	0.216	0.568	0.467
MUFA ²	37.12	37.63	36.15	36.03	0.681	0.256	0.427	0.002	0.002	0.904
PUFA ³	24.95	24.74	25.47	26.09	0.477	0.401	0.215	0.219	0.002	0.195
UI ⁴	1.39	1.39	1.37	1.39	0.025	0.879	0.257	0.24	0.815	0.655
PUFAn-3 ⁵	4.15	4.15	4.27	4.11	0.083	0.993	0.268	0.329	0.725	0.568
PUFAn-6 ⁶	20.23	19.96	20.56	21.42	0.399	0.283	0.118	0.448	0.001	0.123

$\Sigma n-6/\Sigma n-3$	4.9	4.84	4.84	5.24	0.064	0.647	0.081	0.769	0.016	0.085
C18:1/C18:0	0.45	0.43	0.48	0.47	0.004	0.168	0.908	0.001	0.001	<0.001
MUFA/SFA	0.98	1	0.94	0.95	0.008	0.298	0.733	0.008	0.031	0.013

^a MSE = Mean square error. ¹ SFA = Saturated fatty acids; Includes: C14:0, C16:0, C17:0 and C18:0. ² MUFA = Monounsaturated fatty acids; Includes: C16:1n-9, C16:1n-7, C17:1. C18:1n-9, C18:1n-7, C20:1n-9 and C22:1n-9. ³ PUFA = Polyunsaturated fatty acids; Includes: C18:2n-6, C18:3n-3, C20:3n-9, C20:3n-6, C20:4n-6, C20:5n-3, C22:4n-6, C22:5n-6, C22:5n-3 and C22:6n-3. ⁴ UI = Conversion index. ⁵ Includes: C18:2n-6, C20:4n-6 and C22:4n-6. ⁶ Includes: C18:3n-3, C20:5n-3 and C22:6n-3.

During pregnancy, male normal foetuses showed increases in myristic acid (C14:0, $p < 0.05$), palmitic acid (C16:0, $p < 0.001$) and linoleic acid (C18:2n-6, $p < 0.001$), while female normal foetuses showed increases in cis-vaccenic acid (C18:1n-7, $p < 0.01$) and total MUFA ($p < 0.05$). During pregnancy, male foetuses showed decreases in mead acid (C20:3n-9, $p < 0.001$), adrenic acid (C22:4n6, $p < 0.005$), arachidonic acid (C20:4n-6, $p < 0.01$), docosapentaenoic acid (C22:5n-6, $p < 0.05$), total PUFA ($p < 0.05$), and the unsaturated index (UI; $p < 0.01$). Female foetuses showed a significant decrease in α -linolenic acid ($p < 0.005$).

Sex-specific differences were also observed in the composition of the polar fatty acid fraction of normal foetuses. Female foetuses had less palmitoleic, α -linolenic and mead acids than males (all $p < 0.05$) on GD 70 and 90. During pregnancy, several fatty acids increased significantly in both sexes, including stearic, α -linoleic, homo- γ -linolenic and erucic acids (all $p < 0.0001$); docosahexaenoic acid (C22:6n-3, $p < 0.05$); total PUFA ($p < 0.05$); n-6 PUFA ($p < 0.05$); and the C18:1/C18:0 ratio ($p < 0.0001$). Over the same period, several fatty acids decreased significantly in both sexes, including cis-7 hexadecenoic, heptadecanoic, cis-vaccenic, α -linolenic, adrenic and docosapentaenoic acids (all $p < 0.005$); and the MUFA/SFA ratio ($p < 0.001$). Female foetuses showed a significant decrease in heptadecanoic acid ($p < 0.05$), while males showed a significant decrease in mead acid ($p < 0.05$) and an increase in $\sum n-6/\sum n-3$ ratio ($p < 0.05$).

2.6. Changes in Foetal Liver Composition during Pregnancy and Sex-Related Effects

Like the intramuscular fatty acid composition, the neutral fatty acid composition of the liver of normal foetuses varied significantly with gestational age and foetal sex (Table 6). During pregnancy, several fatty acids increased in both sexes, including myristic, palmitic, palmitoleic, vaccenic and α -linoleic acids (all $p < 0.0001$); mead acid ($p < 0.005$); adrenic acid ($p < 0.001$); and the C18:1/C18:0 ratio ($p < 0.005$). Over the same period, several fatty acids decreased in both sexes: margaric (C17:0), heptadecanoic, stearic, and α -linolenic acids (all $p < 0.0001$), as well as erucic acid ($p < 0.0005$). In male foetuses, arachidonic and eicosapentaenoic acids decreased (both $p < 0.05$), while in females, total SFA decreased ($p < 0.01$).

On GD 70 and 90, female foetuses showed higher amounts of stearic acid and total SFA (both $p < 0.05$), but lower amounts of cis-7 hexadecenoic acid ($p < 0.005$), oleic acid ($p < 0.05$), and MUFA ($p < 0.01$), as well as lower ratios of C18:1/C18:0 ($p < 0.01$) and MUFA/SFA ($p < 0.005$). On GD 70, females showed higher content of heptadecanoic acid ($p < 0.05$)

and lower content of cis-vaccenic acid ($p < 0.01$) than males. On GD 90, females showed lower content of heptadecanoic acid ($p < 0.05$) than males.

In contrast, the composition of the polar fatty acid fraction did not vary significantly between male and female normal fetuses (Table 7), with the exception that α -linoleic acid content was higher in females than males on GD 70 ($p < 0.05$). During pregnancy, both sexes showed increases in arachidonic acid ($p < 0.0005$); margaric, stearic, linoleic, and mead acids (all $p < 0.0001$); myristic acid ($p < 0.05$); total PUFA and n-6 PUFA (both $p < 0.0001$); and UI ($p < 0.005$). During the same period, both sexes showed decreases in α -linolenic, erucic, cis-7 hexadecenoic and heptadecanoic acids (all $p < 0.0001$); oleic acid ($p < 0.005$); vaccenic acid ($p < 0.05$); total MUFA ($p < 0.0001$); and the ratios C18:1/C18:0 and MUFA/SFA (both $p < 0.0005$).

Table 6. Effects of age and sex on foetal neutral fatty-acid composition of liver. Mean values for neutral lipids in the liver at Gestational Day (GD) 70 and 90 in female (F) and male (M) foetuses.

Fatty Acids (g/100 g Total Fatty Acids)	70		90		MSEA ^A	Same Age		Same Sex		Age x Sex
	F	M	F	M		F vs. M		70 vs. 90		
						70	90	F	M	
C14:0	1.82	1.61	2.93	3.24	0.128	0.391	0.378	<0.001	<0.001	<0.001
C16:0	19.02	19.67	23.14	23.25	0.336	0.345	0.945	<0.001	<0.001	<0.001
C16:1n-9	1.58	2.03	1.84	2.08	0.063	0.016	0.153	0.101	0.77	0.016
C16:1n-7	6.8	7.31	8.66	9.34	0.196	0.192	0.289	<0.001	<0.001	<0.001
C17:0	3.5	3.06	1.6	1.59	0.125	0.028	0.887	<0.001	<0.001	<0.001
C17:1	2.19	2.29	1.22	1.36	0.072	0.392	0.049	<0.001	<0.001	<0.001
C18:0	22.89	18.94	16.22	14.77	0.656	0.031	0.191	0.001	0.008	<0.001
C18:1n-9	18.94	19.8	17.67	20.68	0.376	0.365	0.04	0.249	0.383	0.059
C18:1n-7	5.6	6.42	7.16	6.87	0.125	0.011	0.26	<0.001	0.166	<0.001
C18:2n-6	2.29	2.39	3.24	3.14	0.085	0.533	0.92	<0.001	<0.001	<0.001
C18:3n-3	0.37	0.36	0.26	0.26	0.010	0.783	0.808	<0.001	<0.001	<0.001
C20:1n-9	0.26	0.41	0.24	0.25	0.045	0.361	0.998	0.600	0.319	0.451
C20:3n-9	0.29	0.29	0.37	0.32	0.009	0.841	0.216	0.003	0.126	0.004
C20:4n-6	12.16	12.99	12.98	10.61	0.373	0.344	0.169	0.488	0.018	0.084
C20:5n-3	0.1	0.11	0.08	0.26	0.033	0.811	0.3	0.411	0.172	0.221
C22:1n-9	0.47	0.37	0.28	0.24	0.022	0.087	0.689	0.007	0.011	0.001
C22:4n-6	0.43	0.43	0.66	0.54	0.023	0.938	0.169	0.011	0.012	0.001
C22:5n-3	0.84	1.12	0.95	0.78	0.049	0.069	0.17	0.334	0.025	0.038
C22:6n-3	0.43	0.4	0.51	0.4	0.018	0.519	0.194	0.152	0.918	0.164
SFA¹	47.23	43.28	43.89	42.85	0.467	0.009	0.029	0.009	0.726	0.002
MUFA²	35.84	38.63	37.07	40.83	0.564	0.04	0.107	0.445	0.138	0.014
PUFA³	16.93	18.09	19.04	16.32	0.469	0.314	0.215	0.157	0.164	0.234
UI⁴	1	1.08	1.08	1.01	0.016	0.087	0.253	0.093	0.128	0.145
SUMN3⁵	1.75	1.99	1.8	1.7	0.063	0.155	0.793	0.697	0.138	0.267
SUMN6⁶	14.89	15.81	16.88	14.3	0.422	0.362	0.204	0.151	0.179	0.220
N6/N3	8.58	8.23	9.41	8.77	0.199	0.463	0.453	0.108	0.357	0.225
SUMC18:1/C18:0	1.12	1.47	1.57	1.93	0.063	0.011	0.103	0.003	0.006	<0.001

MUFA/SFA	0.77	0.91	0.85	0.95	0.019	0.007	0.067	0.096	0.321	0.002
-----------------	------	------	------	------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

^a MSE = Mean square error. ¹ SFA = Saturated fatty acids; Includes: C14:0, C16:0, C17:0 and C18:0. ² MUFA = Monounsaturated fatty acids; Includes: C16:1n-9, C16:1n-7, C17:1, C18:1n-9, C18:1n-7 and C22:1n-9. ³ PUFA = Polyunsaturated fatty acids; Includes: C18:2n-6, C18:3n-3, C20:3n-9, C20:3n-6, C20:4n-6, C20:5n-3, C22:4n-6, C22:5n-6, C22:5n-3 and C22:6n-3. ⁴ UI = Conversion index. ⁵ Includes: C18:2n-6, C20:4n-6 and C22:4n-6. ⁶ Includes: C18:3n-3, C20:5n-3 and C22:6n-3.

100. Constance CM, Morgan Jlt, Umek RM. C/EBPalpha regulation of the growth-arrest-associated gene gadd45. *Mol Cell Biol.* 1996;16(7):3878-83. Epub 1996/07/01. PubMed PMID: 8668205; PubMed Central PMCID: PMCPMC231384.
101. Zhang RP, Shao JZ, Xiang LX. GADD45A protein plays an essential role in active DNA demethylation during terminal osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Biol Chem.* 2011;286(47):41083-94. Epub 2011/09/16. doi: 10.1074/jbc.M111.258715. PubMed PMID: 21917922; PubMed Central PMCID: PMCPMC3220515.
102. Geifman-Holtzman O, Xiong Y, Holtzman EJ. Gadd45 stress sensors in preeclampsia. *Adv Exp Med Biol.* 2013;793:121-9. Epub 2013/10/10. doi: 10.1007/978-1-4614-8289-5_7. PubMed PMID: 24104476.
103. Dennery PA. Oxidative stress in development: nature or nurture? *Free Radic Biol Med.* 2010;49(7):1147-51. Epub 2010/07/27. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.011. PubMed PMID: 20656021.
104. Han F, Hu L, Xuan Y, Ding X, Luo Y, Bai S, et al. Effects of high nutrient intake on the growth performance, intestinal morphology and immune function of neonatal intra-uterine growth-retarded pigs. *Br J Nutr.* 2013;110(10):1819-27. Epub 2013/04/20. doi: 10.1017/S0007114513001232. PubMed PMID: 23596997.
105. Al-Azemi M, Raghupathy R, Azizieh F. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine profiles in fetal growth restriction. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 2017;44(1):98-103. Epub 2017/01/01. PubMed PMID: 29714875.
106. Fan B, Onteru SK, Nikkila MT, Stalder KJ, Rothschild MF. The COL9A1 gene is associated with longissimus dorsi muscle area in the pig. *Anim Genet.* 2009;40(5):788. Epub 2009/04/29. doi: 10.1111/j.1365-2052.2009.01885.x. PubMed PMID: 19397507.
107. Fan B, Onteru SK, Mote BE, Serenius T, Stalder KJ, Rothschild MF. Large-scale association study for structural soundness and leg locomotion traits in the pig. *Genet Sel Evol.* 2009;41:14. Epub 2009/03/17. doi: 10.1186/1297-9686-41-14. PubMed PMID: 19284518; PubMed Central PMCID: PMCPMC2657774.
108. Buckingham M. Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11(4):440-8. Epub 2001/07/13. PubMed PMID: 11448631.
109. Miller JB, Everitt EA, Smith TH, Block NE, Dominov JA. Cellular and molecular diversity in skeletal muscle development: news from in vitro and in vivo. *Bioessays.* 1993;15(3):191-6. Epub 1993/03/01. doi: 10.1002/bies.950150308. PubMed PMID: 8387785.
110. Picard B, Lefaucheur L, Berri C, Duclos MJ. Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reprod Nutr Dev.* 2002;42(5):415-31. Epub 2003/01/23. PubMed PMID: 12537254.

111. Bedi KS, Birzgalis AR, Mahon M, Smart JL, Wareham AC. Early life undernutrition in rats. 1. Quantitative histology of skeletal muscles from underfed young and refeed adult animals. *Br J Nutr.* 1982;47(3):417-31. Epub 1982/05/01. PubMed PMID: 7082615.
112. Glore SR, Layman DK. Cellular development of skeletal muscle during early periods of nutritional restriction and subsequent rehabilitation. *Pediatr Res.* 1983;17(7):602-5. Epub 1983/07/01. doi: 10.1203/00006450-198307000-00017. PubMed PMID: 6194504.
113. Dwyer CM, Stickland NC. The effects of maternal undernutrition on maternal and fetal serum insulin-like growth factors, thyroid hormones and cortisol in the guinea pig. *J Dev Physiol.* 1992;18(6):303-13. Epub 1992/12/01. PubMed PMID: 1307382.
114. Ward SS, Stickland NC. Why are slow and fast muscles differentially affected during prenatal undernutrition? *Muscle Nerve.* 1991;14(3):259-67. Epub 1991/03/01. doi: 10.1002/mus.880140310. PubMed PMID: 2041547.
115. Dwyer CM, Madgwick AJ, Ward SS, Stickland NC. Effect of maternal undernutrition in early gestation on the development of fetal myofibres in the guinea-pig. *Reprod Fertil Dev.* 1995;7(5):1285-92. Epub 1995/01/01. PubMed PMID: 8848601.
116. Alfonso Pecchio AR, Cardozo Gizzi AM, Renner ML, Molina-Calavita M, Caputto BL. c-Fos activates and physically interacts with specific enzymes of the pathway of synthesis of polyphosphoinositides. *Molecular biology of the cell.* 2011;22(24):4716-25.
117. Curran T, Morgan JI. Fos: an immediate-early transcription factor in neurons. *Journal of neurobiology.* 1995;26(3):403-12.
118. Silvestre DC, Gil GA, Tomasini N, Bussolino DF, Caputto BL. Growth of peripheral and central nervous system tumors is supported by cytoplasmic c-Fos in humans and mice. *PloS one.* 2010;5(3):e9544.
119. Li B, Weng Q, Dong C, Zhang Z, Li R, Liu J, et al. A Key Gene, PLIN1, Can Affect Porcine Intramuscular Fat Content Based on Transcriptome Analysis. *Genes (Basel).* 2018;9(4). Epub 2018/04/05. doi: 10.3390/genes9040194. PubMed PMID: 29617344; PubMed Central PMCID: PMC5924536.
120. Li JZ, Ye J, Xue B, Qi J, Zhang J, Zhou Z, et al. Cideb regulates diet-induced obesity, liver steatosis, and insulin sensitivity by controlling lipogenesis and fatty acid oxidation. *Diabetes.* 2007;56(10):2523-32. Epub 2007/07/25. doi: 10.2337/db07-0040. PubMed PMID: 17646209.
121. Puri V, Ranjit S, Konda S, Nicoloso SM, Straubhaar J, Chawla A, et al. Cidea is associated with lipid droplets and insulin sensitivity in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(22):7833-8. Epub 2008/05/30. doi: 10.1073/pnas.0802063105. PubMed PMID: 18509062; PubMed Central PMCID: PMC2409392.

122. Zhou Z, Yon Toh S, Chen Z, Guo K, Ng CP, Ponniah S, et al. Cidea-deficient mice have lean phenotype and are resistant to obesity. *Nat Genet.* 2003;35(1):49-56. Epub 2003/08/12. doi: 10.1038/ng1225. PubMed PMID: 12910269.
123. Xu L, Zhou L, Li P. CIDE proteins and lipid metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32(5):1094-8. Epub 2012/04/21. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.241489. PubMed PMID: 22517368.
124. Xu Y, Gu Y, Liu G, Zhang F, Li J, Liu F, et al. Cidec promotes the differentiation of human adipocytes by degradation of AMPKalpha through ubiquitin-proteasome pathway. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1850(12):2552-62. Epub 2015/09/15. doi: 10.1016/j.bbagen.2015.09.008. PubMed PMID: 26367078.
125. Cryer A, Riley SE, Williams ER, Robinson DS. Effect of nutritional status on rat adipose tissue, muscle and post-heparin plasma clearing factor lipase activities: their relationship to triglyceride fatty acid uptake by fat-cells and to plasma insulin concentrations. *Clin Sci Mol Med.* 1976;50(3):213-21. Epub 1976/03/01. PubMed PMID: 1253531.
126. Spooner PM, Chernick SS, Garrison MM, Scow RO. Insulin regulation of lipoprotein lipase activity and release in 3T3-L1 adipocytes. Separation and dependence of hormonal effects on hexose metabolism and synthesis of RNA and protein. *J Biol Chem.* 1979;254(20):10021-9. Epub 1979/10/25. PubMed PMID: 489580.
127. Bos G, Scheffer PG, Vieira D, Dekker JM, Nijpels G, Diamant M, et al. The relationship of lipoprotein lipase activity and LDL size is dependent on glucose metabolism in an elderly population: the Hoorn Study. *Diabetes Care.* 2004;27(3):796-8. Epub 2004/02/28. PubMed PMID: 14988305.
128. Lamarche B, Tchernof A, Moorjani S, Cantin B, Dagenais GR, Lupien PJ, et al. Small, dense low-density lipoprotein particles as a predictor of the risk of ischemic heart disease in men. Prospective results from the Quebec Cardiovascular Study. *Circulation.* 1997;95(1):69-75. Epub 1997/01/07. PubMed PMID: 8994419.
129. Munshi A, Babu MS, Kaul S, Rajeshwar K, Balakrishna N, Jyothy A. Association of LPL gene variant and LDL, HDL, VLDL cholesterol and triglyceride levels with ischemic stroke and its subtypes. *J Neurol Sci.* 2012;318(1-2):51-4. Epub 2012/05/01. doi: 10.1016/j.jns.2012.04.006. PubMed PMID: 22541364.
130. Hong S, Cho YW, Yu LR, Yu H, Veenstra TD, Ge K. Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(47):18439-44. Epub 2007/11/16. doi: 10.1073/pnas.0707292104. PubMed PMID: 18003914; PubMed Central PMCID: PMC2141795.
131. Lan F, Bayliss PE, Rinn JL, Whetstone JR, Wang JK, Chen S, et al. A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. *Nature.* 2007;449(7163):689-94. Epub 2007/09/14. doi: 10.1038/nature06192. PubMed PMID: 17851529.

132. Wang JK, Tsai MC, Poulin G, Adler AS, Chen S, Liu H, et al. The histone demethylase UTX enables RB-dependent cell fate control. *Genes Dev.* 2010;24(4):327-32. Epub 2010/02/04. doi: 10.1101/gad.1882610. PubMed PMID: 20123895; PubMed Central PMCID: PMCPMC2816731.
133. Hemming S, Cakouros D, Isenmann S, Cooper L, Menicanin D, Zannettino A, et al. EZH2 and KDM6A act as an epigenetic switch to regulate mesenchymal stem cell lineage specification. *Stem Cells.* 2014;32(3):802-15. Epub 2013/10/15. doi: 10.1002/stem.1573. PubMed PMID: 24123378.
134. Gibson CE, Boodhansingh KE, Li C, Conlin L, Chen P, Becker SA, et al. Congenital Hyperinsulinism in Infants with Turner Syndrome: Possible Association with Monosomy X and KDM6A Haploinsufficiency. *Horm Res Paediatr.* 2018;89(6):413-22. Epub 2018/06/15. doi: 10.1159/000488347. PubMed PMID: 29902804; PubMed Central PMCID: PMCPMC6067979.
135. Berletch JB, Yang F, Xu J, Carrel L, Disteche CM. Genes that escape from X inactivation. *Hum Genet.* 2011;130(2):237-45. Epub 2011/05/27. doi: 10.1007/s00439-011-1011-z. PubMed PMID: 21614513; PubMed Central PMCID: PMCPMC3136209.
136. Quintana-Murci L, Fellous M. The Human Y Chromosome: The Biological Role of a "Functional Wasteland". *J Biomed Biotechnol.* 2001;1(1):18-24. Epub 2002/12/19. doi: 10.1155/S1110724301000080. PubMed PMID: 12488622; PubMed Central PMCID: PMCPMC79676.
137. Kleiman SE, Bar-Shira Maymon B, Hauser R, Botchan A, Paz G, Yavetz H, et al. Histone H4 acetylation and AZFc involvement in germ cells of specimens of impaired spermatogenesis. *Fertil Steril.* 2008;89(6):1728-36. Epub 2007/11/16. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.05.068. PubMed PMID: 18001726.
138. Lu Y, Hanada T, Fujiwara Y, Nwankwo JO, Wieschhaus AJ, Hartwig J, et al. Gene disruption of dematin causes precipitous loss of erythrocyte membrane stability and severe hemolytic anemia. *Blood.* 2016;128(1):93-103. Epub 2016/04/14. doi: 10.1182/blood-2016-01-692251. PubMed PMID: 27073223; PubMed Central PMCID: PMCPMC4937361.
139. Cox TC, Bottomley SS, Wiley JS, Bawden MJ, Matthews CS, May BK. X-linked pyridoxine-responsive sideroblastic anemia due to a Thr388-to-Ser substitution in erythroid 5-aminolevulinic synthase. *N Engl J Med.* 1994;330(10):675-9. Epub 1994/03/10. doi: 10.1056/NEJM199403103301004. PubMed PMID: 8107717.
140. Pevny L, Lin CS, D'Agati V, Simon MC, Orkin SH, Costantini F. Development of hematopoietic cells lacking transcription factor GATA-1. *Development.* 1995;121(1):163-72. Epub 1995/01/01. PubMed PMID: 7867497.
141. Weiss MJ, Orkin SH. Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(21):9623-7. Epub 1995/10/10. PubMed PMID: 7568185; PubMed Central PMCID: PMCPMC40854.
142. Shivdasani RA, Fujiwara Y, McDevitt MA, Orkin SH. A lineage-selective knockout establishes the critical role of transcription factor GATA-1 in megakaryocyte growth and platelet

development. *EMBO J.* 1997;16(13):3965-73. Epub 1997/07/01. doi: 10.1093/emboj/16.13.3965. PubMed PMID: 9233806; PubMed Central PMCID: PMC1170020.

143. Orkin SH. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood.* 1992;80(3):575-81. Epub 1992/08/01. PubMed PMID: 1638017.

144. Tallack MR, Perkins AC. KLF1 directly coordinates almost all aspects of terminal erythroid differentiation. *IUBMB Life.* 2010;62(12):886-90. Epub 2010/12/31. doi: 10.1002/iub.404. PubMed PMID: 21190291.

145. Desgardin AD, Abramova T, Rosanwo TO, Kartha S, Shim EH, Jane SM, et al. Regulation of delta-aminolevulinic acid dehydratase by kruppel-like factor 1. *PloS one.* 2012;7(10):e46482. Epub 2012/10/12. doi: 10.1371/journal.pone.0046482. PubMed PMID: 23056320; PubMed Central PMCID: PMC3463598.

146. Kralisch S, Hoffmann A, Lossner U, Kratzsch J, Bluher M, Stumvoll M, et al. Regulation of the novel adipokines/ hepatokines fetuin A and fetuin B in gestational diabetes mellitus. *Metabolism.* 2017;68:88-94. Epub 2017/02/12. doi: 10.1016/j.metabol.2016.11.017. PubMed PMID: 28183456.

147. Mori K, Emoto M, Yokoyama H, Araki T, Teramura M, Koyama H, et al. Association of serum fetuin-A with insulin resistance in type 2 diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes Care.* 2006;29(2):468. Epub 2006/01/31. PubMed PMID: 16443916.

148. Aroner SA, Mukamal KJ, St-Jules DE, Budoff MJ, Katz R, Criqui MH, et al. Fetuin-A and Risk of Diabetes Independent of Liver Fat Content: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis. *Am J Epidemiol.* 2017;185(1):54-64. Epub 2016/11/20. doi: 10.1093/aje/kww095. PubMed PMID: 27856445; PubMed Central PMCID: PMC5209585.

149. Laughlin GA, Barrett-Connor E, Cummins KM, Daniels LB, Wassel CL, Ix JH. Sex-specific association of fetuin-A with type 2 diabetes in older community-dwelling adults: the Rancho Bernardo study. *Diabetes Care.* 2013;36(7):1994-2000. Epub 2013/01/15. doi: 10.2337/dc12-1870. PubMed PMID: 23315604; PubMed Central PMCID: PMC3687317.

150. Stanimirov B, Stankov K, Mikov M. Pleiotropic functions of bile acids mediated by the farnesoid X receptor. *Acta Gastroenterol Belg.* 2012;75(4):389-98. Epub 2013/02/14. PubMed PMID: 23402081.

4.3. Experimento III

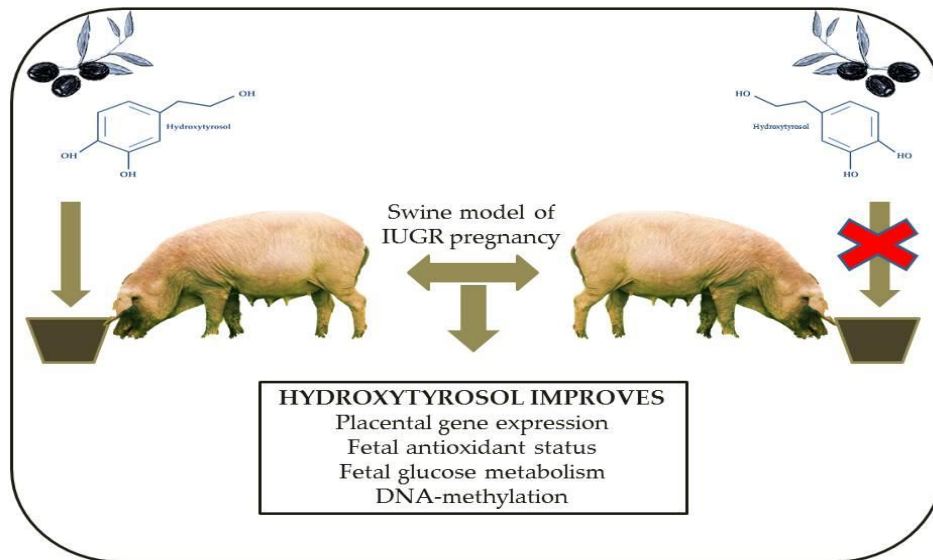
Polyphenols and IUGR Pregnancies: Effects of Maternal Hydroxytyrosol Supplementation on Placental Gene Expression and Fetal Antioxidant Status, DNA-Methylation and Phenotype

Consolación García-Contreras, Marta Vazquez-Gomez, Alicia Barbero, José Luis Pesantez, Angelo Zinellu, Fiammetta Berlinguer, Pedro Gonzalez-Añover, Jorge Gonzalez, Teresa Encinas, Laura Torres-Rovira, Yolanda Nuñez, Jaime Ballesteros, Miriam Ayuso, Susana Astiz, Beatriz Isabel, Cristina Ovilo and Antonio Gonzalez-Bulnes.

International Journal of Molecular Science. 2019

DOI: 10.3390/ijms20051187.

Graphical Abstract



Abstract: The use of polyphenols is a promising strategy for preventing or alleviating intrauterine growth restriction (IUGR) because polyphenol supplementation increases plasma antioxidant capacity and improves oxidative stress at the fetoplacental unit; which are recognized as main issues in IUGR. However, there is a scarcity of experimental data on both realistic benefits and potential hazards of polyphenol supplementation during gestation. Hence, we aimed to use a swine model of IUGR pregnancy to determine possible effects of maternal supplementation with polyphenols (hydroxytyrosol) on placental expression of genes involved in antioxidant homeostasis, vascularization and fetal growth and thus on antioxidant status, DNA-methylation and phenotypic traits (morphology and homeostasis) of the fetus. Hydroxytyrosol improves placental gene expression and fetal antioxidant status and glucose metabolism in a sex-dependent manner, in which males were favored in spite of developmental failures. Concomitantly, hydroxytyrosol prevented hypomethylation of DNA associated with oxidative stress. Finally, no major deleterious effects of hydroxytyrosol supplementation on constriction of the ductus arteriosus, a possible secondary effect of polyphenols during pregnancy, were found.

Keywords: antioxidants; intrauterine-growth-restriction; pregnancy; swine-model

Table 2. Fetal antioxidant status at day of sampling (Day 100 of pregnancy). Mean values (\pm SEM) and differences for sexes in treated (Hydroxytyrosol; Group HTX) and control fetuses (Group C). TEAC accounts for Trolox Equivalent Antioxidant Capacity. Superscript letters indicate significant differences between groups: a \neq b: $p < 0.05$, c \neq d: $p < 0.05$, e \neq f: $p < 0.01$, g \neq h: $p < 0.005$.

Parameter	HTX			C		
	Mean	Female	Male	Mean	Female	Male
TEAC (mmol/L)	2.2 \pm 0.05 ^g	2.1 \pm 0.07	2.3 \pm 0.08	2.1 \pm 0.04 ^h	2.2 \pm 0.06	2.1 \pm 0.07
Glutathione (μ mol/L)	390.2 \pm 15.9 ^a	389.7 \pm 19.1	395.7 \pm 23.5	354.7 \pm 17.9 ^a	374.6 \pm 25.6	338.4 \pm 38.7
Glycine (μ mol/L)	691.9 \pm 32.1 ^c	718.3 \pm 14.1	661.3 \pm 17.4	770.5 \pm 26.6 ^d	797.3 \pm 50.8	730.4 \pm 62.3
Serine (μ mol/L)	262.9 \pm 8.1	281.4 \pm 10.8	237.9 \pm 9.5	291.1 \pm 17.7	306.1 \pm 28.7	271.7 \pm 16.4
Taurine (μ mol/L)	304.1 \pm 21.5	311.7 \pm 19.3	286.9 \pm 23.8	320.9 \pm 17.8	314.1 \pm 31.7	320.6 \pm 38.2

Plasma concentrations of glutathione, glycine, serine and taurine were similar in both groups. There were no significant effects from sex in the group C, but males in group HTX showed a numerically higher glutathione concentrations ($p = 0.07$) and significantly lower concentrations of serine ($p < 0.001$) and glycine ($p < 0.05$) than their female counterparts.

2.4. Fetal Development

The comparison of body measurements between fetuses in control and treated groups showed no significant differences in lengths and widths of body and head (Table 3). On the other hand, fetuses in the group HTX showed lower mean body weight ($p < 0.005$) and lower mean weights of total viscerae, lungs, liver, pancreas and intestine ($p < 0.05$) than fetuses in the group C.

presentaron menores niveles de fructosamina, colesterol o LDL, pero mayores niveles de triglicéridos que sus hermanos de camada de pesos altos (HBW). Estos resultados indican la importancia de la disponibilidad de lípidos y azúcares para el correcto desarrollo fetal. De hecho, en los fetos ibéricos puros, estos datos son respaldados por los encontrados en el análisis transcriptómico, de modo que en fetos LBW ibéricos puros se observó una menor expresión de genes relacionados con la adipogénesis y la acumulación de grasa intramuscular, como por ejemplo *PLIN1* o *CIDEA* (Zhou *et al.* 2003; Li *et al.* 2007; Puri *et al.* 2008; Li *et al.* 2018). De nuevo, la interpretación funcional de los datos de expresión apoya estos resultados, ya que tanto las rutas moleculares (*Adipogénesis, Degradación del Triacilglicerol*) como las funciones biológicas (*Acumulación de lípidos, Cantidad de tejido adiposo*) reguladas negativamente en los fetos ibéricos LBW, señalan una alteración del metabolismo lipídico en estos individuos.

Sin embargo, en los fetos cruzados no se observó este efecto en el transcriptoma muscular debido, probablemente, al bajo nivel de expresión de estos genes relacionados con el metabolismo lipídico y la adipogénesis en los fetos cruzados. En estos fetos, lo que sí se pudo observar es una posible alteración del estado inmunitario en fetos LBW cruzados. En este sentido se observó una sobreexpresión del gen *GADD45A* y de su parálogo *GADD45B*. Ambos actúan en la desmetilación del ADN durante la diferenciación de los adipocitos (Geifman-Holtzman *et al.* 2013). Además, estos genes tienen un papel importante en la respuesta del organismo ante situaciones de estrés oxidativo durante la gestación (en el presente estudio, estrés oxidativo inducido por desnutrición materna), pudiendo actuar como sensores de preclamsia (Geifman-Holtzman *et al.* 2013). Por tanto, estos resultados son consistentes con los encontrados en la bibliografía en los que se describe un aumento del estrés oxidativo y una disminución de la capacidad antioxidante en fetos afectados por IUGR (Dennerly 2010); así como con los resultados fenotípicos encontrados a día 90 de gestación, en los que se observa una afección del estado oxidativo/antioxidante fetal debido a una desnutrición materna prolongada. La interpretación funcional relacionada con las diferencias de expresión encontradas entre fetos cruzados LBW y HBW, apoya estos resultados; de modo que rutas moleculares (*señalización de GADD45, de IL-6 o de IL-12*), funciones biológicas (*inflamación y muerte del organismo*) y la activación de potenciales reguladores transcripcionales (*IL1B y TNF*) relacionados con procesos inflamatorios sugieren una afección del sistema inmunitario en fetos LBW.

Por otro lado, también se detectó una menor expresión de genes relacionados con el crecimiento del músculo *longissimus dorsi* en cerdo, como por ejemplo *COL9A2* y *MATN1* (Fan *et al.* 2009) en fetos LBW, tanto ibéricos como cruzados. Estos resultados sugieren que ambos genes podrían tener un papel importante en el desarrollo muscular

prenatal en el cerdo, independientemente de su genotipo, siendo por tanto interesantes genes candidato para crecimiento prenatal.

5.2. Efecto de la suplementación materna con hidroxitirosol sobre desarrollo prenatal del cerdo ibérico

Los fenómenos de IUGR que ocurren en la especie porcina, y más concretamente en la raza ibérica que ocupa el presente estudio, hacen necesaria la implementación de estrategias para minimizar su incidencia y/o disminuir los efectos negativos que tienen sobre el desarrollo pre- y postnatal del individuo. En realidad, actualmente, no existe ningún tratamiento efectivo que prevenga o contrarreste los efectos del IUGR en ninguna especie. En el trabajo experimental desarrollado durante la realización de esta Tesis Doctoral y, en general en los trabajos desarrollados por nuestro grupo en los últimos años, se ha optado por el uso de un agente antioxidante para abordar este objetivo. Esta elección se basó en las evidencias encontradas en un estudio del grupo acerca de menor capacidad antioxidante y mayor estrés oxidativo en fetos de raza ibérica que en fetos de razas blancas (Gonzalez-Anover *et al.* 2018). Estos resultados podrían relacionarse con la resistencia a la leptina propia de la raza ibérica ya que, algunos estudios señalan que la leptina podría actuar a nivel mitocondrial a través de los factores de transcripción AMPK y el factor nuclear-KB (NF- κ B) y, por tanto, actuar en la regulación de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y el estrés oxidativo (Sebert *et al.* 2011). En consecuencia, se puede hipotetizar que las deficiencias en el sistema redox encontradas en el estudio citado podrían estar relacionadas con la resistencia a la leptina. Estos resultados fueron respaldados por los encontrados en la presente Memoria de Tesis Doctoral, ya que el estudio del transcriptoma muscular reveló una posible desregulación del sistema AMPK en la raza ibérica.

En segundo lugar, entre los posibles agentes antioxidantes que podían ser útiles para mejorar las condiciones en las que se desarrollan los fetos en gestaciones comprometidas, se eligió un polifenol, el hidroxitirosol. Esta elección se basó en los resultados obtenidos en el primer experimento de esta tesis; en ellos, se establecía el efecto determinante del perfil metabólico materno y de la transferencia placentaria de lípidos, principalmente AG esenciales, sobre el desarrollo fetal. Además, como ya se había descrito en otros trabajos (Gupta *et al.* 2004; Kamath *et al.* 2006; Biri *et al.* 2007), fetos afectados por IUGR tienen comprometida su capacidad antioxidante y, por tanto,

Una vez escogido el HT como agente antioxidante, se realizó un primer experimento durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral (Vazquez-Gomez *et al.* 2017), para valorar la posible utilidad de la administración del compuesto durante los dos últimos tercios de gestación. Los resultados mostraron un aumento del peso al nacimiento medio de la camada y la consiguiente disminución de la incidencia de neonatos de bajo peso. Estos efectos positivos se mantuvieron durante la época postnatal temprana y durante el periodo de lactación. De este modo, los lechones procedentes de madres tratadas con HT durante la gestación presentaron mayores ganancias diarias de peso y consecuentemente, un mayor peso en el momento del destete. Además, resultados de un estudio complementario del anterior, aún no publicado, muestran que estos efectos persisten durante el desarrollo prepupal, hasta los seis meses de edad; los lechones procedentes de madres tratadas continúan teniendo mayores ganancias diarias de peso y mayor peso y mayor desarrollo corporal y específicamente muscular.

En base a estos efectos positivos sobre las características fenotípicas, se decidió realizar un estudio detallado de los posibles mecanismos de actuación del HT sobre la unidad feto-placentaria, que se corresponden con los Experimentos III y IV de la presente Memoria de Tesis Doctoral. Estos estudios no sólo valoraban posibles mecanismos y efectos beneficiosos sino también posibles riesgos del uso de hidroxitirosol, a raíz de lo observado en la suplementación de madres gestantes con otros polifenoles (Chango & Pogribny 2015).

Los resultados obtenidos en ambos experimentos mostraron que los efectos de la suplementación materna con HT estaban fuertemente modulados por el sexo fetal. Los efectos beneficiosos de la suplementación con HT fueron más evidentes en fetos machos, aquellos más afectados en gestaciones comprometidas de acuerdo con los resultados obtenidos en el Experimento 1 de la presente Memoria. En este sentido, se observa que los fetos machos presentan mejores índices de capacidad antioxidante y metabolismo glucídico, una mejor activación de genes relacionados con el balance antioxidante y desarrollo a nivel placentario, mejores patrones de desarrollo compensatorio y mejores características de desarrollo de las fibras musculares que las hembras.

En el primero de los experimentos realizados con HT, Experimento III, observamos un efecto positivo del hidroxitirosol sobre la expresión placentaria, en fetos machos, de los genes *SOD1* (cuya proteína está relacionada con la destrucción de radicales superóxido libres) y *HIF1A* (cuya proteína juega un papel esencial en la vascularización y angiogenesis embrionaria/fetal y placentaria y en el metabolismo energético, la



6. Conclusiones



7. Bibliografía

