



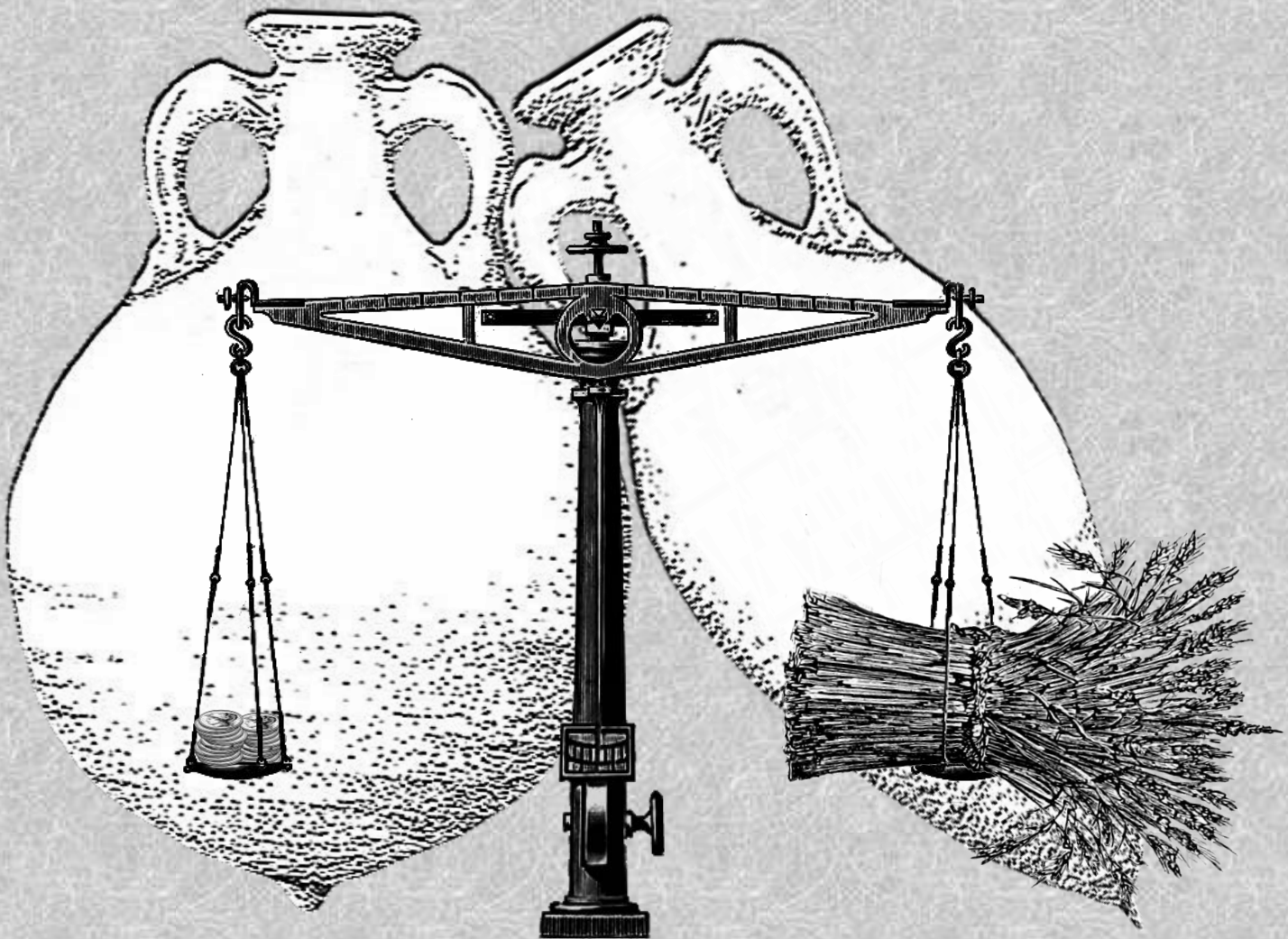
Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

Estudio proteómico y neurofisiológico
del estrés psicosocial y metabólico
en un modelo porcino



Tesis Doctoral
Daniel Valent López
Julio de 2018

UAB

Universitat Autònoma de Barcelona



Universitat Autònoma de Barcelona

**Estudio proteómico y neurofisiológico
del estrés psicosocial y metabólico en
un modelo porcino**

Tesis Doctoral

Daniel Valent López

Directora

Anna Bassols i Teixidó

Doctorat en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Facultat de Veterinària

Universitat Autònoma de Barcelona

2018



Universitat Autònoma de Barcelona

Estudio proteómico y neurofisiológico del estrés psicosocial y metabólico en un modelo porcino

Memoria realizada por
Daniel Valent López
para optar al título de Doctor

Tesis realizada bajo la dirección de la catedrática Anna Bassols i Teixidó en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona, dentro del programa de Doctorado en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina.

Daniel Valent López

Anna Bassols i Teixidó

Bellaterra, Julio de 2018

Parecía que nunca iba a llegar este momento, pero aquí está. Echando la vista atrás te das cuenta de todo el tiempo y experiencias vividas durante el doctorado, de que has ido absorbiendo conocimientos tanto activa como pasivamente, del criterio adquirido para juzgar acertadamente y de la capacidad adquirida para resolver problemas de distinta índole y severidad. El temor de no haber trabajado suficiente va desapareciendo mientras escribes los resultados y te das cuenta realmente de todo lo que han cundido estos años. Además, te das cuenta de que no podrías haber realizado todo este trabajo sin la ayuda ni el apoyo de un montón de personas que te han acompañado durante este tiempo. Finalmente, te das cuenta de que verdaderamente esto es lo más importante que te da el doctorado, es algo que ningún currículum podrá contener ni que nadie que no haya pasado por ello podrá entender completamente. Sin embargo, en este apartado se da un pequeño homenaje a todas esas personas que me han acompañado y ayudado. Así pues, sin más demora empezamos con ello.

La primera persona a la que tengo que agradecer es la Dra. Anna Bassols, ella me aceptó en su grupo confiando en mí para realizar este trabajo. Me enseñó cómo funciona el intrincado mundo de la investigación y todo el procedimiento que hay que seguir para conseguir resultados fructíferos. Por todo ello le doy sinceramente las gracias.

No me puedo olvidar de las personas que me acogieron durante mis estancias al extranjero, la Dra. Emøke Bendixen que, a pesar de su apretada agenda, me ilustró en la vanguardia de las técnicas proteómicas.

Toda la gente que compone y que compuso el departamento de bioquímica de la facultad de veterinaria merece sobradamente ser nombrada aquí. Anna Marco es la primera persona que me recibió y empezó a enseñarme todo el funcionamiento del laboratorio, mostrando una paciencia e implicación ejemplares a pesar de tener que ocuparse de escribir su propia tesis, te agradezco todo ese tiempo que invertiste en mí. A Rosa, la primera persona que ves al llegar por las mañanas y que te da los buenos días con un sinfín de tonalidades distintas.

A Anna Vilalta la mejor técnica que mis ojos han visto, siempre preocupada por el correcto funcionamiento del departamento y de las personas que trabajan en él. Dispuesta a hacerte cualquier solución sin objeción ninguna, teniendo, además, el don único de hacer que los tiempos de incubación pasen volando mediante conversaciones cronometradas por timer.

A Susana Benítez nuestra técnica/fontanera del HPLC, esa máquina sacada del rincón más oscuro del sótano más inmundo del averno con el único fin de enloquecer, torturar y desasosegar a la humanidad. Por toda su ayuda en la durísima puesta a punto de un método para HPLC, dispuesta a echar una mano incluso en fin de semana y teniendo siempre una perspectiva optimista ante los cromatogramas que iban apareciendo en la tele.

Agradecimientos

A Laura, compañera de doctorado y amiga desde que tengo memoria. Sin ti no me hubiera metido en este embolado animándome a empezar y sólo por eso ya mereces más agradecimiento del que se puede expresar. Pero, por si eso no fuera suficiente, siempre me has ofrecido tu ayuda incondicional, me has guiado, soportado y te has preocupado por mi salud física y mental. Además, todos los días te has molestado en alegrar el día a la gente llegando por las mañanas con una sonrisa y una canción por mal que hubiera empezado el tuyo. No se puede obviar el jolgorio que provocas involuntariamente ocurriendo multitud de eventos tu alrededor, siendo algo que sólo los más observadores pueden disfrutar. Todos los cafés, comidas, meriendas, cervezas, cubatas, anécdotas, infortunios y conversaciones que hemos tenido durante este tiempo te aseguro que son algo que no olvidaré jamás. Así que sólo me queda darte las gracias de corazón por ello.

A todos los estudiantes que han pasado por el departamento y han estado bajo mi supervisión, en especial a Lourdes, Francesca, Albertito, Alison, Sergio y Natalia. Quiero pensar que durante el tiempo que pasamos juntos ambos aprendimos y vivimos experiencias enriquecedoras. Natalia, sobre ti recae todo el peso del grupo. Te deseo toda la paciencia y entereza del mundo para capear los vientos de levante que azotarán sin cesar el grupo y para sobrellevar los problemas inherentes al doctorado, pero no todo tiene que ser malo y espero que sepas disfrutar de todo lo bueno que te puede ofrecer.

A las Raqueles Pato y Peña del Servei de Bioquímica Clínica Veterinaria, por su disposición para ayudar en las determinaciones de los estudios a pesar de estar sometidas bajo el yugo de todo el trabajo que llevan encima.

Al Dr. Néstor Gómez nuestro Capo de departamento, sin él nada de esto hubiera sido lo mismo. Agradezco su misantropía, sus repertorios, gustos musicales y sentido del humor. Ha ejercido de psicólogo, consejero y asesor científico/técnico sin pedir nada a cambio, convirtiéndose en nuestro Oráculo de Delfos particular.

A los técnicos de IRTA por el soporte en las granjas y los sacrificios, en especial a Albert y Agustí por su paciencia en el muestreo durante los sacrificios.

Al personal del bar de la facultad de Veterinaria, Juani, Ester y Santi por el buen humor que desprenden y contagian, sin vosotros habría muerto de inanición por desidia mucho antes de acabar el doctorado. Sois sin duda alguna en el mejor bar de toda la Universitat Autònoma de Barcelona.

Hay gente fuera de la facultad que me ha apoyado a lo largo de este camino. Todas las personas con las que he convivido y me han aguantado, que las fuerzas hidrofóbicas del destino tuvieron a bien juntarnos cual gotas de aceite en agua. Francesc, la primera persona al que realmente pude llamar amigo, un compañero de batalla con el que los vínculos creados perdurarán para siempre. Carlos y Eduardo, genios camuflados que me ilustraron a fuerza de largas conversaciones

bañadas con whisky. Guillem, el paradigma de locura y diversión. Juan Carlos, el hípster andaluz cinéfilo. Arnau nuestra RAE particular con conocimientos informáticos. Daniela, consejera argentina sin ser psicóloga. Por escrito está la importancia de vuestra presencia en mi vida.

Mi equipo completo de balonmano Handbol Empordà, especialmente a Màrius, Jota, David V y Agus. Me recogisteis cuanto estaba a la deriva y me disteis una razón para cortarme las uñas junto con una pura y natural amistad.

No puedo obviar las personas más importantes, mi familia. Gracias a mis padres y hermana por haberme apoyado incondicionalmente sin comprender del todo en lo que consiste un doctorado. Lamento también haberos preocupado en algunos momentos y haceros sentir impotentes ante situaciones que no podíais remediar, pero creedme cuando os digo que ha merecido la pena. Os debo todo lo que soy hoy en día y por ello este mero párrafo no podrá nunca hacer justicia por todo lo que habéis hecho por mí.

A título personal, quiero agradecer al 1916, trozo de paraíso en la tierra regentado por seres divinos con una piedad infinita que se convirtió en un eje importante de mi vida. También por sosegar los impulsos alcohólicos galopantes inherentes en cualquier doctorando que se precie, reafirmando la máxima de que no es necesario divertirse para beber.

A John Johnston por su ilimitada paciencia y entereza empíricamente demostrada multitud de veces, sin esas cualidades de las que hacía gala a golpe de botella el mundo sería un lugar peor.

A la policía local de Cerdanyola del Vallés, por su gran labor policial que a menudo es incomprendida.

Por último, A-diós.

Este trabajo ha sido parcialmente financiado por el proyecto AGL2011-30598-C03-02 del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad.

Índice:

Índice	I
Índice de Figuras y Tablas	V
Resúmenes	1
Introducción	9
1. Bienestar Animal	11
2. Estrés	12
3. Sistema Nervioso Central y Estrés	14
3.1. Metabolismo de catecolaminas	16
3.2. Metabolismo de indolaminas	18
3.3. Sistema dopaminérgico	19
3.4. Sistema noradrenérgico	21
3.5. Sistema serotoninérgico	23
4. Respuestas endocrinas al estrés	25
4.1. Eje HPA y SAM	25
4.2. Regulación de la homeostasis energética	27
4.2.1. Hormonas reguladoras de la homeostasis energética	27
4.2.2. Neuropeptidos reguladores de la homeostasis energética ..	29
5. Aportaciones de la proteómica al estudio del estrés	31
6. Biomarcadores de estrés	32
Antecedentes y Objetivos	35
Antecedentes	37
Objetivos	38
Material y Métodos	41
Material	43
1. Soluciones y Tampones	43
2. Determinaciones de parámetros bioquímicos	44
3. ELISAs comerciales	44
4. Anticuerpos	44
Métodos	45
1. Recogida de muestras	45
1.1. Saliva	45
1.2. Pelo	45
1.3. Sangre	45
1.4. PBMC	46
1.5. Áreas cerebrales	46

2. Preparación de extractos y homogenados	46
2.1. Extracción del cortisol del pelo	46
2.2. Preparación de extractos de PBMC para actividad enzimática ...	47
2.3. Preparación de extractos proteicos de PBMC para aplicaciones proteómicas	47
2.4. Homogenados de tejido cerebral	47
3. Cuantificación de la concentración de proteína	48
3.1. Método de Bradford	48
3.2. Método RcdC	48
3.3. Método BCA	48
4. Determinaciones por HPLC	49
4.1. Sistema HPLC	49
4.2. Procesado de homogenados cerebrales para HPLC	49
4.3. Separación y cuantificación de neurotransmisores	49
4.4. Procesado de plasmas sanguíneos para HPLC	50
4.4.1. Determinación de monoaminas en plasma	50
4.4.1.1. Activación de alúmina	50
4.4.1.2. Extracción de monoaminas del plasma	50
4.4.2. Determinación de aminoácidos en plasma	50
4.4.2.1. Reacción de derivatización de los aminoácidos	51
4.4.2.2. Separación y cuantificación de aminoácidos	52
5. <i>Western Blot</i> y <i>Oxyblot</i>	53
5.1. Electroforesis SDS-PAGE	53
5.2. <i>Western Blot</i>	53
5.3. <i>Oxyblot</i> mediante Slot Blot	54
6. Técnicas proteómicas	55
6.1. Differential in gel electrophoresis (DIGE)	55
6.1.1. Marcaje de muestras	55
6.1.2. Primera dimensión (Isoelectroenfoque)	56
6.1.3. Segunda dimensión (SDS-PAGE)	56
6.1.4. Visualización	56
6.1.5. Análisis y cuantificación estadística	56
6.1.6. Selección y tripsinización de <i>spots</i>	57
6.1.7. Espectrometría de masas e identificación de proteínas ...	57
6.2. SWATH-MS DIA	58
6.2.1. Procesado de las muestras	58
6.2.2. Creación de la Librería a partir de ensayos DDA	59
6.2.3. Detección en SWATH-MS DIA	60
6.2.4. Análisis de datos	60
6.3. Análisis bioinformático	61

Resultados	63
Capítulo 1: Efecto del estrés y la relación humano-animal en la inmunofisiología y el proteoma de PBMC del cerdo.....	65
1. Diseño experimental	65
2. Análisis estadístico de datos bioquímicos y neurotransmisores	66
3. Concentración de cortisol, proteínas de fase aguda y GPx	67
4. Análisis del proteoma de PBMC	68
5. Análisis funcional de las proteínas identificadas	71
6. Validación de proteínas identificadas	76
7. Marcadores de estrés oxidativo	77
8. Perfil de neurotransmisores	78
Capítulo 2: Efecto de los cambios en la dieta sobre la señalización por neurotransmisores y neuropéptidos en el sistema nervioso central....	79
Estudio 1.....	79
1. Diseño experimental.....	79
2. Análisis estadístico.....	80
3. Resultados productivos.....	80
4. Perfil de neurotransmisores.....	81
5. Perfil de neuropéptidos en hipotálamo.....	83
6. Correlaciones entre variables.....	84
6.1. Hipotálamo.....	84
6.2. Hipocampo Ventral.....	85
Estudio 2.....	88
1. Diseño experimental.....	88
2. Análisis estadístico.....	89
3. Resultados productivos.....	89
4. Perfil de neurotransmisores.....	90
4.1. Efecto de la dieta materna en lechones tratados con Placebo..	91
4.2. Efecto de la dieta materna en lechones tratados con Metformina	92
4.3. Tratamientos durante la lactancia.....	93
5. Cuantificación del Neuropéptido Y en el hipotálamo	95
6. Determinaciones en plasma	96
6.1. Catecolaminas en plasma.....	96
6.2. Aminoácidos libres en plasma.....	97
Capítulo 3: Alteraciones en el perfil de neurotransmisores y en el proteoma producidas por la restricción del crecimiento intrauterino en un modelo porcino.....	99
Estudio 1.....	99

1. Diseño experimental	99
2. Análisis estadístico	100
3. Perfil de neurotransmisores	100
3.1. Efectos de la restricción intrauterina	100
3.2. Efectos de la restricción intrauterina y el sexo	102
Estudio 2	104
1. Diseño experimental	104
2. Análisis estadístico	105
3. Identificación de proteínas por SWATH-MS DIA en lisados de hipocampo	106
3.1. Expresión diferencial de proteínas en función del sexo	108
3.2. Expresión diferencial de proteínas por efectos del peso y sexo	111
Discusión	117
Capítulo 1	119
1. Efecto del estrés debido a la mezcla de animales a lo largo del tiempo	119
2. Efectos de los tratamientos de manejo	124
Capítulo 2	125
1. Efecto de una dieta rica en grasas y de su combinación con probióticos y ácidos grasos ω -3 en hipotálamo e hipocampo	125
2. Efecto de la dieta materna sobre distintas áreas del sistema nervioso central de lechones	128
3. Dietas maternas y tratamiento en la lactancia	130
Capítulo 3	133
1. Efectos de la restricción intrauterina en el perfil de neurotransmisores del hipocampo y la amígdala	133
2. Efectos del sexo sobre la restricción intrauterina en el perfil de neurotransmisores y el proteoma del hipocampo	135
Conclusiones	139
Referencias	143
Apéndices	159
Artículos	167

Índice de Figuras y Tablas:

Índice de Figuras:

Introducción:

Figura 1: Los conceptos que describen el bienestar animal y cómo se relacionan entre ellos.....	11
Figura 2: Ruta metabólica de la síntesis de las catecolaminas DA, NA y Adren junto con los metabolitos de degradación.....	17
Figura 3: Ruta metabólica de la síntesis de las indolaminas 5-HT junto con los metabolitos de degradación.....	18
Figura 4: Las diferentes proyecciones del sistema dopaminérgico en el SNC..	20
Figura 5: Las diferentes proyecciones del sistema noradrenérgico en el SNC.....	22
Figura 6: Las diferentes proyecciones del sistema serotoninérgico en el SNC.....	24
Figura 7: Esquema del funcionamiento del eje HPA y SAM.....	27
Figura 8: Esquema de las acciones de las hormonas insulina, ghrelina y leptina en el SNC.....	29
Figura 9: Proyecciones neuronales de los neuropéptidos en el SNC.....	30

Material y Métodos:

Figura 10: Esquema de la reacción de derivatización de los aminoácidos.....	51
--	----

Resultados:

Capítulo 1:

Figura 11: Cronograma experimental donde se muestra la edad de los animales, inicio de los tratamientos, muestreos y sacrificio.....	66
Figura 12: Imagen representativa del gel bidimensional teñido con Flamingo® del DIGE.....	68
Figura 13: Diagramas circulares que clasifican las proteínas por su GO.....	72
Figura 14: Efecto del tratamiento de manejo a lo largo del tiempo sobre los FC de las proteínas identificadas en el DIGE clasificadas por grupos de GO.	74
Figura 15: Red de interacción que muestra las asociaciones entre las proteínas identificadas en el DIGE creada por el programa informático STRING.....	75
Figura 16: Westerns Blots de MYLC2 y Fg de los lisados de PBMC que se usaron para el DIGE.....	76
Figura 17: Efecto del tratamiento de manejo a lo largo del tiempo sobre los marcadores de estrés oxidativo en los lisados de PBMC usados en el DIGE....	77

Capítulo 2:

Figura 18: Efecto de la dieta sobre las concentraciones de neurotransmisores o metabolitos cerebrales.....	82
---	----

Figura 19: Efecto de la dieta sobre las concentraciones de los neuropéptidos cerebrales OrexA, NPY y POMC. 83

Figura 20: Representaciones gráficas de las correlaciones en formato *heatmap* del hipotálamo 86

Figura 21: Representaciones gráficas de las correlaciones en formato *heatmap* del hipocampo ventral 87

Figura 22: Esquema del diseño experimental 89

Figura 23: Efecto del tratamiento postnatal con metformina sobre el peso de los lechones según la dieta materna 90

Figura 24: Efecto de la dieta materna sobre la concentración de neurotransmisores o metabolitos en lechones tratados con Placebo 91

Figura 25: Efecto de la dieta materna sobre la concentración de neurotransmisores o metabolitos en lechones tratados con Metformina 92

Figura 26: Efecto del tratamiento con Metformina durante la lactancia sobre la concentración de neurotransmisores o metabolitos según la dieta materna . 93

Figura 27: Efecto del tratamiento con Metformina durante la lactancia sobre la concentración de NPY en el hipotálamo según la dieta materna 95

Figura 28: Efecto del tratamiento con Metformina durante la lactancia sobre la concentración de Adren plasmática según la dieta materna 96

Capítulo 3:

Figura 29: Efecto de la IUGR sobre la concentración de neurotransmisores o metabolitos en el hipocampo y la amígdala 101

Figura 30: Efecto de la IUGR sobre la concentración de neurotransmisores o metabolitos en el hipocampo y la amígdala según el sexo 103

Figura 31: Cromatograma representativo de un péptido analizado mediante SWATH-MS 106

Figura 32: Histograma representativo de las sumas de intensidades de las transiciones de un péptido identificado en todos los animales del estudio y en la librería 107

Figura 33: Diagrama de Venn con el número de proteínas identificadas en todas las comparaciones por sexo, peso y sus interacciones cruzadas 108

Figura 34: Proteínas diferenciales en la comparación por sexo clasificadas por su GO 108

Figura 35: Diagrama de Venn con el número de proteínas identificadas en las comparaciones por sexo y peso*sexo 111

Figura 36: Diagrama de Venn con el número de proteínas identificadas en las comparaciones entre hembras/machos LBW y hembras/machos NBW 111

Figura 37: Diagrama circular con la cantidad de proteínas diferenciales en las comparaciones entre hembras/machos LBW y hembras/machos NBW clasificadas por su GO 114

Figura 38: Red de interacción que muestra las asociaciones entre las proteínas identificadas en el SWATH-MS creada por el programa informático STRING 115

Discusión:

Figura 39: Ruta de señalización de adhesiones focales de la base de datos KEGG.....	121
Figura 40: Figura integrativa de los resultados del capítulo 1.....	123
Figura 41: Proyecciones neuronales entre núcleos hipotalámicos con las acciones de los neuropéptidos sobre ellos mismos, el VTA y la hipófisis...	127
Figura 42: Cascada de señalización celular del receptor de leptina Ob-Rb junto con el efecto de la metformina sobre la célula.....	131
Figura 43: Figura integrativa de los efectos de la IUGR y el sexo.....	137

Apéndices:

Figura 44: Cromatograma de HPLC de la elución de aminoácidos usando la fase móvil comercial de Waters.....	162
Figura 45: Cromatograma de HPLC de la elución de aminoácidos usando la fase móvil optimizada.....	163

Índice de Tablas:

Tabla A: Listado de abreviaturas.....	IX
--	----

Material y Métodos

Tabla 1: Soluciones y tampones usados en la metodología.....	43
Tabla 2: Reactivos y kits usados en el analizador automático Olympus AU400 para determinar parámetros bioquímicos.....	44
Tabla 3: Moléculas determinadas mediante ELISAs y las casas comerciales....	44
Tabla 4: Los distintos anticuerpos usados en la metodología, su tipo y su casa comercial.....	44
Tabla 5: Método del gradiente entre fases móviles para la separación cromatográfica de los aminoácidos.....	52
Tabla 6: Diluciones de los anticuerpos primarios y secundarios en BSA 5 % (p/v) con <i>TBS-T</i> usadas en <i>Western Blot</i>	53

Resultados:**Capítulo 1:**

Tabla 7: Concentraciones de los marcadores de estrés determinados en suero, pelo y saliva.....	67
Tabla 8: Listado de las proteínas identificadas en los 64 <i>spots</i> seleccionados del DIGE.....	69
Tabla 9: Concentraciones de neurotransmisores y sus metabolitos determinadas en las distintas áreas cerebrales.....	78

Capítulo 2:

Tabla 10: Composición básica de las cuatro dietas con las que se alimentaron a los lechones del estudio.....	80
---	----

Tabla 11: Datos productivos de peso y consumo durante el periodo experimental de los animales alimentados con las dietas T1, T2, T3 y T4	81
Tabla 12: Concentración de neurotransmisores y metabolitos en las distintas áreas cerebrales de los animales alimentados con las dietas T1, T2, T3 y T4	82
Tabla 13: Concentración de neuropéptidos cuantificados en los lisados de HPT de los animales alimentados con las dietas T1, T2, T3 y T4	83
Tabla 14: Diseño de las tres dietas maternas	88
Tabla 15: Datos productivos del peso de los lechones en función del tratamiento durante la lactancia y la dieta materna durante el periodo experimental	90
Tabla 16: Concentración de neurotransmisores y metabolitos de las distintas áreas cerebrales en función del tratamiento durante la lactancia y la dieta materna	94
Tabla 17: Concentración de neuropéptido Y en el hipotálamo en función del tratamiento durante la lactancia y la dieta materna	95
Tabla 18: Concentraciones de NA y Adren en el plasma según el tratamiento durante la lactancia y la dieta materna	96
Tabla 19: Concentraciones de aminoácidos libres en el plasma según el tratamiento durante la lactancia y la dieta materna	97

Capítulo 3:

Tabla 20: Concentraciones de neurotransmisores y metabolitos del hipocampo y la amígdala según el peso de los lechones al nacer	101
Tabla 21: Concentraciones de neurotransmisores y metabolitos del hipocampo y la amígdala según el sexo y el peso de los lechones al nacer	102
Tabla 22: Media de los pesos de los lechones en función del sexo dentro de una misma camada	104
Tabla 23: Pesos de los lechones seleccionados para el ensayo proteómico SWATH-MS DIA	105
Tabla 24: Proteínas diferenciales entre hembras y machos	109
Tabla 25: Proteínas diferenciales entre hembras/machos NBW y hembras/machos LBW	112
Tabla 26: Sinónimos entre las siglas del gen y las siglas en STRING de las proteínas	113

Apéndices:

Tabla 27: Método del gradiente optimizado entre fases móviles para la separación cromatográfica de los aminoácidos	161
Tabla 28: Identificación por espectrometría de masas de los spots diferenciales analizados en el DIGE del capítulo 1 usando la base de datos UniProt de <i>Sus scrofa</i>	164

Abreviaturas:

Tabla A: Listado de abreviaturas.

Abreviatura	Significado
3-MT	3-Metoxitiramina
5-HIAA	Ácido 5-Hidroxiindolacético
5-HT	Serotonina (5-Hidroxitriptamina)
5-HTR	Receptor de serotonina
AADC	L-aminoácido aromático descarboxilasa
ABRF	Azul de Bromofenol
ACN	Acetonitrilo
ACTH	Corticotropina
AD	Aldehído Deshidrogenasa
ADG	del inglés <i>Average Daily Gain</i>
Adren	Adrenalina
AgRP	Proteína R-Agouti
AMP	Adenosín Monofosfato
AMPK	del inglés <i>AMP-activated protein kinase</i>
AMQ	6-Aminoquinolina
APP	Proteínas de fase aguda
AQC	6-Aminoquinolil-N-Hidroxisuccinimidil Carbamato
ARAS	del inglés <i>Ascending Reticular Activating System</i>
ATP	Adenosín Trifosfato
BSA	Albúmina Sérica Bovina
cAMP	Adenosín Monofosfato cíclico
CART	del inglés <i>Cocaine and Amphetamine-Regulated Transcript</i>
CES	Cuerpo Estriado
CMet	Dieta materna Control y tratamiento con Metformina
COMT	Catecol-O-Metiltransferasa
CPF	Corteza Prefrontal
CPla	Dieta materna Control y tratamiento con Placebo
CRH	Factor Liberador de Corticotropina
CRP	Proteína C-Reactiva
D2	Día 2
D28	Día 28
DA	Dopamina
DAMP	del inglés <i>Damage-associated Molecular Pattern</i>
DDA	del inglés <i>Data Dependent Acquisition</i>
DIA	del inglés <i>Data Independent Acquisition</i>
DIGE	del inglés <i>Difference Gel Electrophoresis</i>
DNP	2,4-Dinitrofenilhidrazona
DNPB	2,4-Dinitrofenilhidrazina
DOPAC	Ácido 3,4-Dihidroxiifenilacético
DPTN	Desproteínización
DR	Receptor de dopamina
DTT	Ditiotreitól

Abreviaturas

EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
ELISA	del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
FC	del inglés <i>Fold-Change</i>
FDR	del inglés <i>False Discovery Rate</i>
Fg	Fibrinógeno
FoxO1	del inglés <i>Forkhead box protein O1</i>
FWHM	del inglés <i>Full Width at Half Maximum</i>
GABA	Ácido γ -Aminobutírico
GC	Glucocorticoide
GHSR	Receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento
GMP	Guanosín Monofosfato
GO	del inglés <i>Gene Ontology</i>
GPx	Glutatiión Peroxidasa
GTP	Guanosín Trifosfato
H	Hembras
HCD	Hipocampo Dorsal
HCV	Hipocampo Ventral
HFD	del inglés <i>High Fat Diet</i>
HP	Haptoglobina
HPA	Hipotálamo-Pituitario-Adrenal
HPLC	del inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPT	Hipotálamo
HSP	Proteínas de choque térmico
HVA	Ácido Homovanílico
IAA	2-Yodoacetamida
IACUC	del inglés <i>Institutional Animal Care and Use Committee</i>
IEF	Isoelectroenfoque
INIA	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
INSR	Receptor de insulina
IP3	Inositol Trifosfato
iRT	del inglés <i>indexed Retention Time</i>
IRTA	Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària
iTRAQ	del inglés <i>isobaric Tag for Relative Quantification</i>
IUGR	del inglés <i>Intrauterine Growth Restriction</i>
JAK	Janus quinasa
LBW	del inglés <i>Low Birth Weight</i>
LC	Cromatografía Líquida
L-DOPA	L-3,4-Dihidroxifenilalanina
LHA	Área Lateral del Hipotálamo
LTA	Área Tegmental Lateral
M	Machos
MAO	Monoamina Oxidasa
MAPK	del inglés <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MC	Mineralocorticoide
MHPG	3-Metoxi-4-Hidroxifenilglicol
MS	del inglés <i>Mass Spectrometry</i>

mTORC1	del inglés <i>mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1</i>
MYLC2	del inglés <i>Myosin Light Chain 2</i>
NA	Noradrenalina
NARC	Núcleo Arcuato
NBW	del inglés <i>Normal Birth Weight</i>
ND	No Determinado
NH	del inglés <i>Negative Handling</i>
NHS	N-Hidroxisuccinimida
NPY	Neuropéptido Y
NR	No Representado
NT	Neurotransmisores
Ob-Rb	Receptor de leptina
ON	del inglés <i>Over Night</i>
OrexA	Orexina A
PAGE	del inglés <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
PBMC	del inglés <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PH	del inglés <i>Positive Handling</i>
PI3K	Fosfoinositol-3 quinasa
Pig-MAP	del inglés <i>Pig-Major Acute Phase Protein</i>
PLC	Fosfolipasa C
PNMT	del inglés <i>Phenylethanolamine-N-Methyltransferase</i>
POMC	Proopiomelanocortina
PSA	Persulfato de Amonio
PVN	Núcleo Paraventricular
RMet	Dieta materna de Reducción y tratamiento con Metformina
ROS	del inglés <i>Reactive Oxygen Species</i>
RPla	Dieta materna de Reducción y tratamiento con Placebo
RT	del inglés <i>Room Temperature</i>
S18	Semana 18
S6K	Proteína Ribosomal S6 quinasa
S9	Semana 9
SAM	Sistema Simpático Adrenomedular
SDS	Dodecilsulfato sódico
SE	Error estándar de la media
SMet	Dieta materna de Sobrealimentación y tratamiento con Metformina
SNC	Sistema Nervioso Central
SOD	Superóxido Dismutasa
SOS	Octilsulfato sódico
SPla	Dieta materna de Sobrealimentación y tratamiento con Placebo
STAT	del inglés <i>Signal Transducer and Activator of Transcription proteins</i>
SWATH-MS	del inglés <i>Sequential Window Acquisition of All Theoretical Mass Spectra</i>
T1	Tratamiento 1 Dieta Control
T2	Tratamiento 2 Dieta rica en grasas
T3	Tratamiento 3 Dieta rica en grasas más <i>Bifidobacterium breve</i>
T4	Tratamiento 4 Dieta rica en grasas más <i>Bifidobacterium breve</i> y ácidos grasos ω -3
TEA	Trietilamina

Abreviaturas

TEMED	Tetrametiletilendiamina
TFA	Ácido Trifluoroacético
TOF	del inglés <i>Time Of Flight</i>
TotalCAT	Suma de todas las catecolaminas
TotalDA	Suma de metabolitos de la vía dopaminérgica
TRH	Hormona Liberadora de la Tirotropina
VMA	Ácido 3-Metoxi-4-Hidroximandélico
VMAT	del inglés <i>Vesicular Monoamine Transporter</i>
VTA	Área Tegmental Ventral
α -MSH	Hormona estimuladora de melanocitos
β -Met	β -Mercaptoetanol

Resúmenes

"Aprender es cuando de repente entiendes algo que has entendido toda tu vida, pero de una nueva forma". **Doris Lessing**

Resumen:

El bienestar animal en la industria ganadera es un tema de una importancia esencial. Un bienestar animal pobre puede provocar grandes pérdidas económicas debidas a una baja productividad, y a la poca aceptación en el mercado por problemas éticos y de opinión pública. Por lo tanto, resulta imperativo su estudio para detectar de manera fiable el estado en que se encuentra un animal.

Un bienestar óptimo es aquel estado que no causa ningún coste biológico para el animal, mientras que si el coste resulta muy elevado y la adaptación al entorno no es posible el resultado puede ser un daño, enfermedad e incluso la muerte. Sin embargo, existe un término medio en el cual el individuo consigue adaptarse al entorno adverso a expensas de cierto coste biológico, los animales que se encuentran en esa situación se considera que están sujetos a un estrés.

Este trabajo se compone de tres capítulos centrados en analizar los efectos de los estresores psicosociales, producidos por la interacción con individuos ajenos y la relación humano-animal, y los estresores metabólicos, específicamente el estrés nutricional por sobrealimentación o restricción alimentaria, y por la restricción del crecimiento intrauterino (IUGR) por parte de la madre. Los efectos se estudiaron mediante la determinación de marcadores de estrés, la determinación de neurotransmisores (NTs) y sus metabolitos y mediante ensayos de proteómicos. Los tejidos estudiados fueron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y diversas áreas cerebrales.

La variación en los niveles de cortisol en pelo y las proteínas de fase aguda sugieren que los cambios durante el periodo experimental se debieron principalmente a la disminución del grado de estrés de los animales al readaptarse después de la mezcla de individuos. Los cambios en el proteoma de las PBMC reflejan las consecuencias de la variación del cortisol endógeno y del grado de estrés de los animales. Sin embargo, los tratamientos de manejo aplicados a los animales no fueron lo bastante contundentes como para observar un cambio claro en la fisiología porcina. Todos los resultados descritos en este estudio evidencian una relación compleja entre el estrés, el manejo de los animales y las células del sistema inmune.

Cuando se alimentan a los animales durante 10 semanas con una dieta *High Fat Diet* (HFD) se producen cambios en la concentración de neuropéptidos hipotalámicos implicados en la ingesta y la de los NTs en el hipocampo ventral e hipotálamo, principalmente los de la vía dopaminérgica. Mientras que al incluir *Bifidobacterium breve* y ácidos grasos omega-3 o la combinación de ambos en la dieta HFD se revierten parcialmente los efectos de la dieta HFD sobre los neuropéptidos y los NTs.

Al reducir la dieta materna al 70 % o sobrealimentar a las madres hasta el 130 % de calorías también se observan alteraciones en el perfil de los NTs en el hipocampo e hipotálamo de los lechones. Por otro lado, al tratar a estos lechones

con metformina se induce una señal anorexigénica en el sistema nervioso central (SNC) mediante cambios en el perfil de NTs. Además, se inhibe el sistema nervioso simpático reduciendo la respuesta de "lucha y huida" del organismo.

Si se reduce al 50 % la dieta materna a partir del primer mes de gestación se produce un efecto IUGR en la camada de lechones, lo que provoca que algunos individuos nazcan con un peso inferior y un subdesarrollo asimétrico que mantiene un tamaño craneal normal en detrimento del resto del cuerpo (LBW). El efecto IUGR altera de igual manera en hembras y machos los NTs de la vía dopaminérgica en el hipocampo, especialmente la ratio de degradación de la dopamina. Según los resultados del análisis proteómico el hipocampo de lechones hembra de peso normal (NBW) muestra evidencias de un mayor desarrollo estructural y neuronal y actividad metabólica que el de los machos de peso normal. No obstante, el estrés producido por IUGR atenúa estas diferencias en el desarrollo estructural y neuronal del hipocampo entre hembras y machos. Además, las neuronas hembra hipocampales afectadas por IUGR muestran evidencias de una mayor resistencia que las neuronas macho ante estresores metabólicos como la falta de nutrientes.

Estos estudios revelan algunos de los mecanismos de respuesta ante estresores psicosociales o metabólicos por parte de las células del sistema inmune y el sistema nervioso central, completando el conocimiento existente sobre los mecanismos moleculares subyacentes.

Resum:

El benestar animal a la indústria ramadera és un tema d'una importància essencial. Un benestar animal pobre pot provocar grans pèrdues econòmiques degudes a una baixa productivitat, i a la poca acceptació en el mercat per problemes ètics i d'opinió pública. Per tant, resulta imperatiu el seu estudi per detectar de manera fiable l'estat en què es troba un animal.

Un benestar òptim és aquell estat que no causa cap cost biològic a l'animal, mentre que si el cost resulta molt elevat i l'adaptació a l'entorn no és possible el resultat pot ser un dany, malaltia i fins i tot la mort. No obstant, hi ha un terme mitjà en el qual l'individu aconsegueix adaptar-se a l'entorn advers a costa de cert cost biològic. Els animals que es troben en aquesta situació es considera que estan subjectes a un estrès.

Aquest treball es compon de tres capítols centrats en analitzar els efectes dels estressors psicosocials, produïts per la interacció amb individus aliens i la relació humà-animal, i els estressors metabòlics, específicament l'estrès nutricional per sobrealimentació o restricció alimentària, i per la restricció del creixement intrauterí (IUGR) en garrins. Els efectes es van estudiar mitjançant la determinació de marcadors d'estrès, la determinació de neurotransmissors (NTs) i els seus metabòlits i mitjançant tècniques de proteòmiques. Els teixits estudiats van ser les cèl·lules mononuclears de sang perifèrica (PBMC) i diverses àrees cerebrals.

La variació en els nivells de cortisol en pèl i les proteïnes de fase aguda suggereixen que els canvis durant el període experimental es van deure principalment a la disminució del grau d'estrès dels animals al readaptar-se després de la barreja d'individus. Els canvis en el proteoma de les PBMC reflecteixen les conseqüències de la variació del cortisol endogen i del grau d'estrès dels animals. No obstant, els tractaments de maneig aplicats als animals no van ser prou contundents com per observar un canvi clar en la fisiologia porcina. Tots els resultats descrits en aquest estudi evidencien una complexa relació entre l'estrès, el maneig dels animals i les cèl·lules del sistema immune.

Quan s'alimenten els animals durant 10 setmanes amb una dieta *High Fat Diet* (HFD) es produeixen canvis en la concentració dels neuropèptids hipotalàmics implicats en la ingesta i dels NTs en l'hipocamp ventral i hipotàlem, principalment els de la via dopaminèrgica. A l'incloure *Bifidobacterium breve* i àcids grassos omega-3 o la combinació de tots dos en la dieta HFD, es reverteixen parcialment els efectes de la dieta HFD sobre els neuropèptids i els NTs.

Al reduir la dieta materna al 70 % o sobrealimentar a les mares fins al 130 % de calories també s'observen alteracions en el perfil dels NTs en l'hipocamp i hipotàlem dels garrins. D'altra banda, en tractar a aquests garrins amb

metformina s'indueix un senyal anorexigènic en el sistema nerviós central (SNC) mitjançant canvis en el perfil de NTs. A més a més, s'inhibeix el sistema nerviós simpàtic reduint la resposta de "lluita i fugida" de l'organisme.

Si es redueix al 50 % la dieta materna a partir del primer mes de gestació es produeix un efecte IUGR a la ventrada de garrins, el que provoca que alguns individus neixin amb un pes inferior i un subdesenvolupament asimètric que manté una mida cranial normal en detriment de la resta del cos (LBW). L'efecte IUGR altera d'igual manera en femelles i mascles els NTs de la via dopaminèrgica en l'hipocamp, especialment la ràtio de degradació de la dopamina. Segons els resultats de l'anàlisi proteòmica l'hipocamp de garrins femella de pes normal (NBW) mostra evidències d'un major desenvolupament estructural i neuronal i activitat metabòlica que el dels mascles de pes normal. No obstant, l'estrès produït per IUGR atenua aquestes diferències proteòmiques de desenvolupament estructural i neuronal de l'hipocamp entre femelles i mascles. A més a més, les neurones femella hipocampals afectades per IUGR mostren evidències d'una major resistència que les neurones mascle davant estressors metabòlics com la falta de nutrients.

Aquests estudis revelen alguns dels mecanismes de resposta davant estressors psicosocials o metabòlics per part de les cèl·lules del sistema immune i el sistema nerviós central, completant el coneixement existent sobre els mecanismes moleculars subjacents.

Summary:

Animal welfare in the livestock industry is an issue of essential importance. Poor animal welfare can cause large economic losses due to low productivity, and low acceptance in the market for ethical issues and public opinion. Therefore, its study is imperative to reliably detect the welfare state of an animal.

An optimal welfare is a state that does not cause any biological cost for the animal, while if the cost is very high and adaptation to the environment is not possible the result can be damage, disease and even death. However, there is a medium term in which the individual manages to adapt to the adverse environment at the expense of a certain biological cost, the animals that are in that situation are subjected to stress.

This work consists of three chapters focused on analyzing the effects of psychosocial stressors produced by the interaction with other individuals and the human-animal relationship, and metabolic stressors, specifically the nutritional stress due to overfeeding or food restriction and by intrauterine growth restriction (IUGR). The effects were studied by determining stress markers, neurotransmitters (NTs) and their metabolites in the brain and by proteomic approaches. The tissues were peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and several brain areas.

The variation in hair cortisol levels and serum acute phase proteins suggests that these changes during the experimental period were mainly due to the decrease of stress by readaptation of the animals after mixing. Changes in the PBMC proteome reflects the consequences of the variation of endogenous cortisol and the degree of stress. However, handling treatments applied to the animals were not strong enough to provoke clear changes in porcine physiology. All results described in this study show a complex relationship between stress, animals management and immune cells.

Animals fed for 10 weeks with a High Fat Diet (HFD) presents changes in the concentration of hypothalamic neuropeptides involved in food intake and NTs in ventral hippocampus and hypothalamus, mainly from the dopaminergic pathway. While adding *Bifidobacterium breve*, omega-3 fatty acids or the combination of both in the HFD diet partially reverses the effects of the HFD diet on neuropeptides and NTs.

Reducing maternal diet to 70 % or overfeeding the mothers up to 130 % caloric intake, provoke alterations in the NTs profile in the hippocampus and hypothalamus of the piglets. On the other hand, treating these piglets with metformin, an anorexigenic signal is induced in the central nervous system (CNS) by changes in the NTs profile. In addition, the sympathetic nervous system is inhibited by reducing organism "fight and flight" response.

If maternal diet is reduced to 50 % from the first month of gestation, an IUGR effect occurs in the litter of piglets, which some individuals born with lower weight and asymmetric underdevelopment, which maintains a normal cranial size in detriment of the rest of the body (LBW). The IUGR effect specially alters in females and males the NTs of the dopaminergic pathway in the hippocampus, especially the degradation ratio of dopamine. Hippocampus of normal-weight female (NBW) piglets shows evidences of greater structural and neuronal development and metabolic activity than normal-weight males, according to the results of the proteomic analysis. However, stress produced by IUGR attenuates these differences in hippocampus structural and neuronal development between females and males. In addition, hippocampal female neurons affected by IUGR show evidences of greater resistance than male neurons to metabolic stressors such as lack of nutrients.

These studies reveal some of the mechanisms of response to psychosocial or metabolic stressors by immune cells and the central nervous system, increasing the knowledge about the underlying molecular mechanisms.

Introducción

"La ciencia que sirve para hacernos orgullosos y que degenera en pedantería no vale más que para deshonrarnos". **Francisco de Sales**

Introducción:

1. Bienestar animal:

El bienestar animal en la industria ganadera es un tema de una importancia esencial. Un bienestar animal pobre puede provocar grandes pérdidas económicas debidas a una baja productividad, y la poca aceptación en el mercado por problemas éticos y de opinión pública¹⁻³. Por lo tanto, resulta imperativo su estudio para detectar de manera fiable el estado en que se encuentra un animal.

Como su nombre indica, el bienestar animal hace referencia a un estado inherente al propio animal, aunque por supuesto está influenciado por el entorno en el que se encuentra, el cual afecta directamente, ya sea positiva o negativamente, a su bienestar⁴. Al ser el bienestar animal un concepto relacionado con la condición del animal, Fraser⁴ propuso que dependía de tres conceptos, relacionados entre ellos, que determinan a grandes rasgos el grado de bienestar del animal. Estos tres factores son el estado de salud, sus emociones y su comportamiento (Figura 1).

La salud, claramente, es un factor esencial a tener en cuenta cuando se evalúa el bienestar ya que afecta directamente al animal y su capacidad para adaptarse al entorno.

El comportamiento que presentan los animales varía en función el bienestar de los mismos, mostrando conductas diferentes si su bienestar está comprometido ante situaciones que se presentan en su entorno.

Finalmente, el bienestar viene determinado por la intensidad, duración y tipo de las emociones básicas que sienten los animales, siendo éstas positivas como confort, seguridad o placer, y negativas como miedo, ansiedad o dolor.

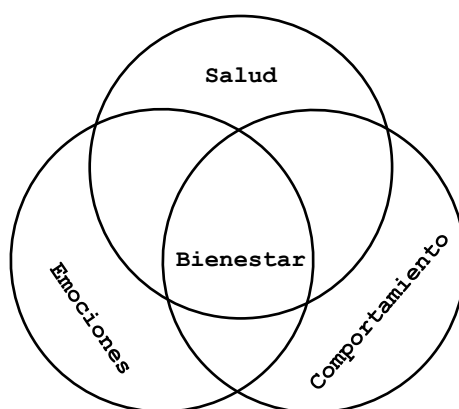


Figura 1: Los conceptos que describen el bienestar animal y cómo se relacionan entre ellos. Adaptado de Fraser (2008)⁴.

El bienestar animal se puede definir como la capacidad del animal para adaptarse a las situaciones que se plantean en su entorno. El grado de bienestar se puede determinar por el coste biológico que requiere sobrevivir a dichas situaciones.

Así pues, se entiende un bienestar óptimo como aquel estado que no causa ningún coste biológico para el animal, mientras que si el coste resulta muy elevado y la adaptación al entorno no es posible el resultado puede ser un daño, enfermedad e incluso la muerte. Sin embargo, existe un término medio en el cual el individuo consigue adaptarse al entorno adverso a expensas de cierto coste biológico, los animales que se encuentran en esa situación se considera que están sujetos a un estrés⁵.

2. Estrés:

A lo largo de la historia la definición del concepto del estrés ha ido cambiando conforme avanzaban los conocimientos científicos en el campo. Los hallazgos más relevantes fueron la implicación en la respuesta al estrés de secreciones endocrinas por parte del sistema simpático adrenomedular (SAM) y del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA)⁶. Por lo tanto, teniendo en cuenta los descubrimientos sobre los efectos del estrés, su definición más moderna se refiere a una amenaza que compromete la homeostasis sistémica y la respuesta del organismo para recuperar dicha homeostasis. La respuesta que se genera es específica y depende de distintos factores: el tipo de estímulo estresor que la provoca, cómo se percibe y se entiende el estímulo, la capacidad de hacerle frente⁷.

Existen varios tipos de estrés clasificados en función de su duración y tipo de estímulo. Dependiendo del tipo de estrés el sistema reaccionará de distintas formas para poder recuperar la homeostasis perdida.

Así pues, según su duración el estrés se puede catalogar en un estrés agudo que se caracteriza por tener una corta duración. El estrés agudo genera una respuesta conductual inmediata provocada por la secreción hormonal y liberación de monoaminas. La secreción de estas hormonas, además, prepara al sistema para afrontar al estímulo agresor⁸.

En contraposición, el estrés crónico es un estresor que se prolonga en el tiempo o se da repetidamente. Este tipo de estrés puede causar efectos más permanentes en el organismo que se pueden prolongar incluso más allá de que el estímulo estresor haya cesado.

Si tenemos en cuenta el tipo de estresor se pueden catalogar en cuatro grupos⁸. El primero es un estresor físico que está relacionado con cambios ambientales, como temperaturas y ruidos, o efectos físicos, como el dolor o los refuerzos negativos. En cerdos los estresores físicos se presentan comúnmente durante el transporte y el sacrificio de los animales, sufriendo cambios de temperatura, confinamiento, manejos bruscos y agresiones.

El segundo es un estresor metabólico que provoca cambios en el metabolismo del organismo, los cuales pueden ser producidos por ejemplo el ejercicio físico o la administración de fármacos y drogas.

Mención aparte debe darse al estrés nutricional, ya sea debido a una dieta restringida o excesiva. Existen distintos tipos de restricción que producen un estrés metabólico dependiendo de si se aplica directamente al individuo o a las madres, de la intensidad de la restricción o de las sustancias a restringir (alimentos, oxígeno, oligoelementos, etc.). Aunque en el caso de experimentación con animales éticamente se deben controlar las restricciones alimentarias, se pueden exponer a los sujetos de experimentación desde a un ayuno total a distintos porcentajes de restricción o reducción. La duración de la restricción también afectará a la severidad del estrés metabólico y a los cambios metabólicos que se presentarán en el organismo. Por otro lado, cuando la restricción se aplica a madres gestantes se habla de restricción intrauterina del crecimiento (IUGR) ya que afectará directamente a los fetos en gestación provocando un subdesarrollo de los mismos^{9,10}. Este subdesarrollo fetal se presenta de manera asimétrica, manteniendo el tamaño craneal en detrimento del resto del cuerpo. Este efecto se conoce como *brain sparing* y su objetivo es proteger el desarrollo cerebral para asegurar funciones autonómicas necesarias una vez se dé el nacimiento¹¹⁻¹⁴. Las condiciones de IUGR se pueden dar de manera natural por malformaciones placentarias con una incidencia del 6 % o por gestaciones en regiones elevadas, donde la hipoxia puede afectar al desarrollo fetal^{15,16}. No obstante, se pueden provocar las condiciones de IUGR restringiendo la alimentación materna hasta el 50 % o mediante ligación del cordón umbilical¹⁷. Sin embargo, la cirugía para ligar el cordón umbilical implica un alto riesgo además de provocar una alta mortalidad en los fetos gestantes. El modelo porcino se ha reconocido como un buen modelo para estudiar las condiciones de IUGR, ya que sus prolíficas camadas permiten el estudio tanto de malformaciones placentarias como comparaciones entre individuos con un desarrollo normal e individuos subdesarrollados dentro de una misma camada¹⁷⁻¹⁹.

En tercer lugar, el estrés social consiste en el conflicto de interacciones entre individuos o el aislamiento. Obviamente el factor de este estresor dependerá de las características sociales de la especie animal a la que se le aplique. En el caso porcino, al ser animales jerárquicos²⁰, se genera un alto estrés social, que incluso deriva en físico, al establecerse la jerarquía entre los animales que comparten un mismo corral^{21,22}. El nivel jerárquico tiene implicaciones como el acceso a la comida o al agua que se traducen en disparidad de pesos dentro de un mismo corral o incluso marginamientos de animales²³. Además, si se mezclan los animales en los corrales repetidamente este estresor puede pasar de agudo a crónico.

Por último, el estresor psicológico que induce cambios etológicos mediante emociones negativas como miedo, ansiedad o frustración^{24,25}. En ganado porcino

el estrés psicológico está estrechamente relacionado con el manejo y la relación humano-animal²⁶⁻²⁸. Si el animal recibe un trato humano negativo como gritos, agresiones o restricciones de movilidad éstos tendrán respuestas de miedo y aversión ante la presencia humana, provocando un estrés que afectará a su bienestar y a la productividad^{2,28,29}. Mientras que si el animal es tratado positivamente responderá con asociaciones positivas que producirán tranquilidad ante otras situaciones de manejo más invasivos como pesajes, inseminaciones, palpaciones e incluso ataduras².

Todos estos tipos de estresores generarán una respuesta sistémica en el individuo que provocará cambios encaminados a una posterior adaptación al entorno. Las respuestas que el organismo genera ante un estímulo estresor no tienen especificidad frente al tipo de estímulo, por lo que distintos estímulos generan la misma respuesta sistémica³⁰. No obstante, sí que se desencadenan perturbaciones en niveles de distintos metabolitos según la intensidad y la duración del estímulo estresor, además, parámetros inherentes al animal como la edad y el sexo también pueden modular su respuesta al estrés^{31,32}.

El proceso para generar la respuesta al estrés se inicia mediante la percepción del estímulo estresor. En la percepción siempre está implicado el sistema nervioso central (SNC) que recibe las señales procedentes del entorno o del propio sistema y será el primer responsable de generar una posterior respuesta.

3. Sistema Nervioso Central y Estrés:

Distintos modelos animales se han usado para estudiar procesos neurológicos relacionados con estresores psicológicos, sociales o metabólicos. La mayoría de esos estudios han usado modelos murinos debido a su fácil estabulado y cría. Sin embargo, debido a las diferencias entre cerebros humanos y murinos, una extrapolación de resultados al ser humano se hace dificultosa e inexacta. En el caso del modelo porcino dichas diferencias se mitigan ya que el cerebro porcino es mucho más parecido al humano en peso, volumen, área cortical, mielinización, desarrollo y actividad eléctrica³³. Por lo tanto, el modelo porcino es una alternativa que tiene grandes ventajas para el estudio de procesos neuronales y comportamentales ante situaciones estresantes o patológicas.

El cerebro es el encargado de percibir y procesar el estímulo estresor para, posteriormente, responder a él mediante la liberación y secreción de distintos metabolitos señalizadores que acabarán produciendo una respuesta en todo el sistema del organismo. Las principales áreas cerebrales involucradas en el procesamiento del estímulo estresor son la amígdala, el hipocampo, la corteza prefrontal y el hipotálamo^{34,35}.

La amígdala se encarga de la recepción y la posterior interconexión entre las distintas áreas cerebrales con el fin de obtener la respuesta al estresor. La recepción de información cuando el animal se enfrenta a estresores psicológicos o sociales se da en la amígdala^{35,36}. Ésta recibe información sensorial por parte del tálamo y la corteza cerebral, mientras que la información contextual de la situación se recibe a través del hipocampo³⁶.

Una vez recibida la información, la amígdala devuelve la señal al hipocampo, la corteza prefrontal y el cuerpo estriado con el fin de aprender a evitar el estímulo, memorizarlo y atenuar su efecto³⁷.

Por otro lado, la amígdala también recibe señales provenientes del tronco encefálico iniciadas por estímulos debidos a estresores físicos. Al llegar esta señal en la amígdala, ésta la devuelve al hipotálamo que, a su vez, la transmitirá a través del SAM y el eje HPA al resto del sistema para producir una reacción del organismo ante el estímulo estresor.

El hipotálamo, a su vez, es el principal sensor de la homeostasis energética del organismo por lo que recibe señales del sistema que pueden ser activadas por estresores metabólicos como una restricción alimenticia o una sobrealimentación³⁸. Estos estímulos se transmiten al hipocampo mediante hormonas como la leptina, la insulina, la ghrelina o el glucagón³⁹⁻⁴¹. Según sea el tipo de hormona que transmite la señal el hipotálamo transmitirá una señal orexigénica o anorexigénica al resto del cerebro y a la pituitaria para provocar una respuesta al estímulo.

Las distintas áreas cerebrales están conectadas entre ellas con proyecciones neuronales que se inervan sinápticamente. La transmisión de la señal se produce mediante la secreción presináptica de neurotransmisores en los espacios sinápticos que activa la neurona postsináptica mediante receptores específicos para cada neurotransmisor.

Además, las proyecciones neuronales generan sistemas de transmisión en todo el SNC y SNP involucrando distintas áreas cerebrales y médula espinal para integrar los estímulos externos e internos y producir así una respuesta a éstos. Uno de los grupos principales de neurotransmisores que regulan esta transmisión de señal se conoce como monoaminas transmisoras y se diferencian en dos tipos básicos, las catecolaminas y las indolaminas⁴². Existen tres sistemas de transmisión, el sistema dopaminérgico, el sistema noradrenérgico y el sistema serotoninérgico, diferenciados según el neurotransmisor que transmite la señal neuronal.

3.1. Metabolismo de catecolaminas:

Las monoaminas pertenecientes a este grupo son la dopamina (DA), la noradrenalina (NA) y la adrenalina (Adren). Las tres se sintetizan siguiendo una misma ruta metabólica, por lo que parten de un mismo precursor, el aminoácido L-Tirosina (Figura 2). La primera reacción de la ruta catalizada por la tirosina hidroxilasa es también la limitante para la síntesis de la DA y la NA. La tirosina hidroxilasa reduce a la L-Tirosina formándose L-3,4-Dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Seguidamente, la L-DOPA se descarboxila por la actividad de L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC) generando DA. A medida que la DA se sintetiza se va almacenando en vesículas sinápticas mediante proteínas transportadores vesiculares de monoaminas (VMAT) hasta su liberación al espacio sináptico⁴².

La formación de NA a partir de DA sólo se da en neuronas noradrenérgicas que son las que expresan la enzima que cataliza esta reacción, la dopamina β -hidroxilasa. Además, la reacción tiene lugar dentro de la vesícula sináptica ya que la dopamina β -hidroxilasa se encuentra unida a la membrana vesicular⁴².

Siguiendo con la ruta metabólica, la NA se metila para formar Adren mediante la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT). Esta reacción se da específicamente en las glándulas adrenales o suprarrenales ya que este tejido expresa la enzima necesaria para catalizar la reacción⁴². La metabolización de la DA y la NA es uno de los mecanismos neuronales para extinguir la señal sináptica producida por los neurotransmisores. La monoamino oxidasa (MAO) oxida la DA para formar ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) que a su vez es metilado por la catecol-O-metiltransferasa (COMT) formando ácido homovanílico (HVA). No obstante, el orden de las reacciones se puede invertir, primero O-metilando la DA formando 3-metoxitiramina (3-MT) y después oxidando la 3-MT para formar, finalmente, HVA. Las enzimas que metabolizan la NA son las mismas que las que metabolizan la DA (MAO y COMT), sólo que al catalizar sus reacciones generan 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) y ácido 3-metoxi-4-hidroxi-mandélico (VMA).

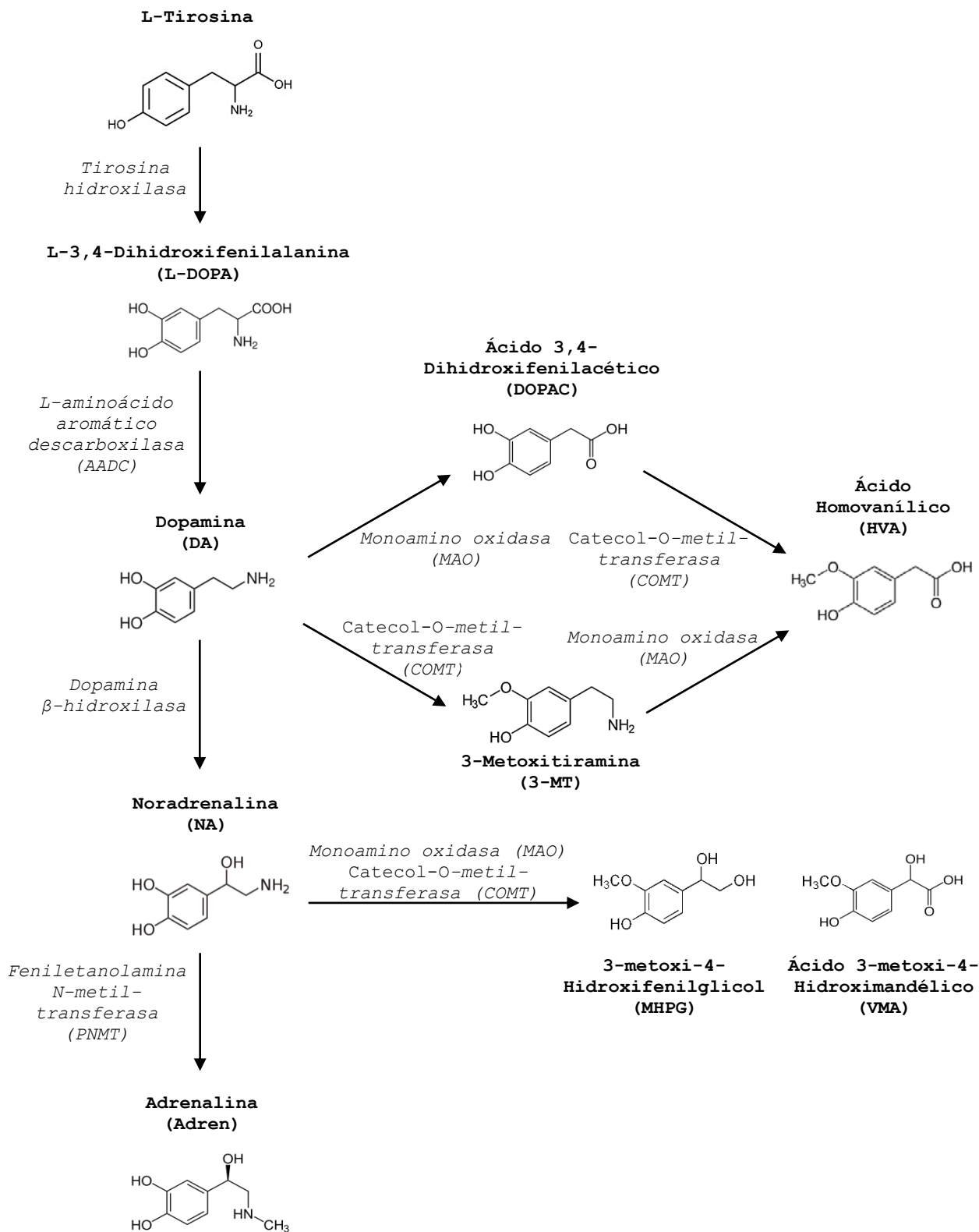


Figura 2: Ruta metabólica de la síntesis de las catecolaminas DA, NA y Adren junto con los metabolitos de degradación. En cursiva se muestran las enzimas que catalizan de cada reacción. Adaptado de Nester et al. (2015)⁴².

3.2. Metabolismo de indolaminas:

Las monoaminas transmisoras formadas por compuestos aromáticos conocidos como indoles se sintetizan usando el aminoácido L-Triptófano como precursor. La serotonina (5-HT, 5-hidroxitriptamina) pertenece a este grupo.

La ruta metabólica se inicia con la reducción del L-Triptófano por la enzima triptófano hidroxilasa dando lugar a 5-hidroxitriptófano, esta reacción es la limitante de la toda la ruta (Figura 3). Seguidamente, el metabolito anterior se descarboxila mediante la enzima AADC produciendo la serotonina que se almacenará en las vesículas sinápticas usando el transportador VMAT⁴².

Mediante la catabolización de la 5-HT se consigue extinguir la transmisión de la señal sináptica. El primer paso para metabolizar la 5-HT es oxidarla mediante la enzima MAO formando 5-hidroxiacetaldehído. Rápidamente, este metabolito será oxidado de nuevo por la enzima aldehído deshidrogenasa (AD) dando lugar al ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA)⁴².

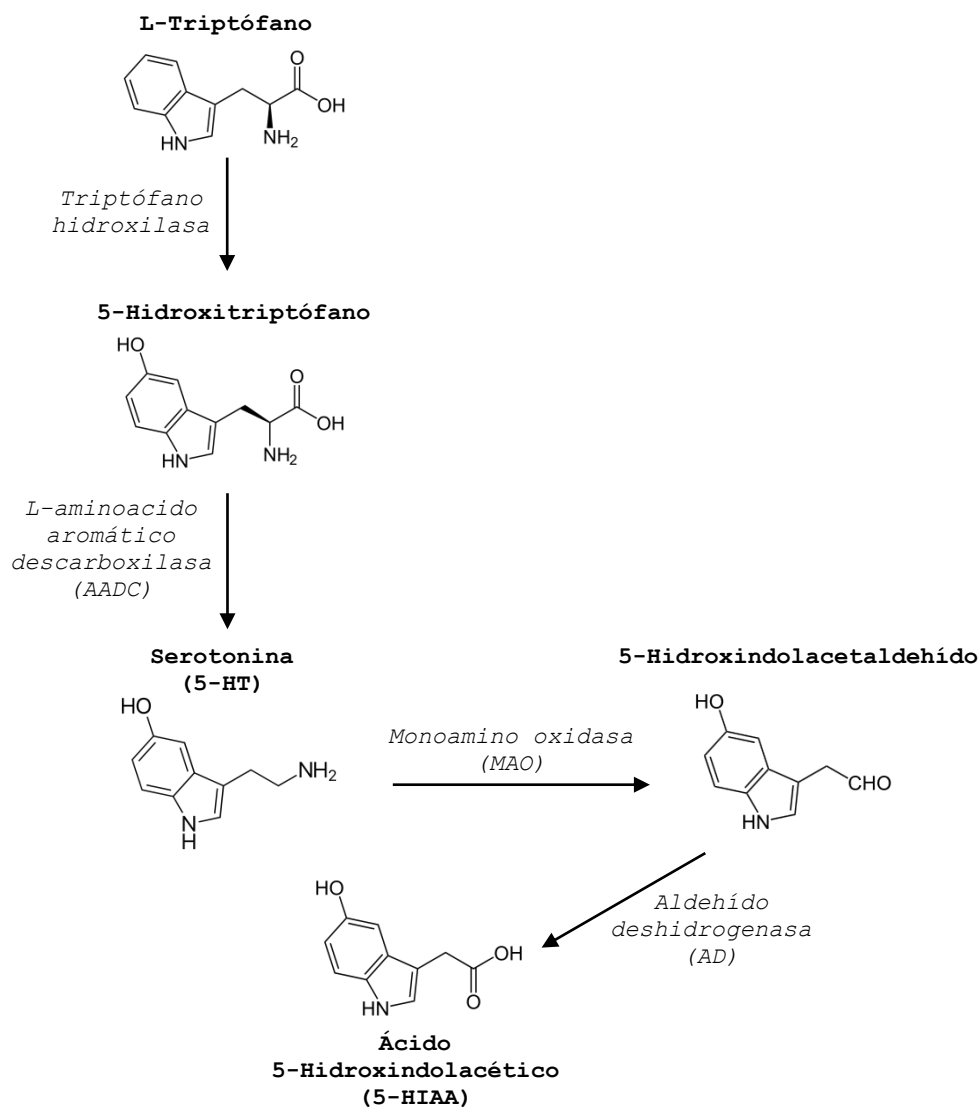


Figura 3: Ruta metabólica de la síntesis de las indolaminas 5-HT junto con los metabolitos de degradación. En cursiva se muestran las enzimas que catalizan de cada reacción. Adaptado de Nester et al. (2015)⁴².

3.3. Sistema dopaminérgico:

El sistema dopaminérgico está involucrado en la respuesta a estrés, mecanismos de recompensa, adicción y depresión. La actividad dopaminérgica basal es indispensable para un funcionamiento correcto en la respuesta al estrés, puesto que alteraciones, ya sean por niveles altos o bajos, de DA afectarán a la correcta funcionalidad de distintas áreas cerebrales. De ese modo, los niveles de DA aumentan en la corteza frontal y el hipocampo cuando el organismo es sometido a un estrés agudo, pero cuando ese estrés se vuelve crónico los niveles de DA recuperan su estado basal, imposibilitando una correcta respuesta a la situación estresante^{43,44}. Por otro lado, las proyecciones dopaminérgicas al núcleo accumbens o el cuerpo estriado (regiones mesolímbicas) provocan respuestas motivacionales, mecanismos de recompensa y adicción cuando están activadas, mientras que una disminución de DA en estas mismas proyecciones tienen efectos de anhedonia y depresivos^{43,44}.

Además, la DA tiene efectos anorexigénicos en el hipotálamo, mientras que en las regiones mesolímbicas tiene efectos en la ingesta hedónica de alimentos sabrosos⁴⁵.

La transmisión de la señal dopaminérgica se da a través de receptores transmembrana situados en la neurona postsináptica. Los receptores dopaminérgicos se dividen en dos tipos, los DR1 y los DR2, con varias isoformas cada uno. Los del tipo DR1 incluyen las isoformas 1 y 5, este tipo de receptor está acoplado a proteína Gs, por lo que activan la adenilato ciclasa, y se encuentran repartidos por el sistema límbico (hipocampo, amígdala, núcleo accumbens, tálamo, hipotálamo y cuerpo estriado)⁴⁶. Sin embargo, la isoforma 5 del receptor dopaminérgico se encuentra mayoritariamente en el hipocampo y en los distintos núcleos que forman el tálamo.

Los receptores del tipo DR2 comprenden las isoformas 2, 3 y 4. Este tipo de receptores están acoplados a proteínas G inhibitoras de la adenilato ciclasa (Gi) y se encuentran distribuidos por todo el cerebro, aunque cada isoforma se encuentra en áreas concretas. Así pues, en el núcleo estriado, la sustancia negra y el área tegmental ventral (VTA) se encuentra la isoforma 2. La isoforma 3 se encuentra en el hipotálamo, la sustancia negra y el cerebelo. Finalmente, la isoforma 4 se encuentra en la corteza frontal, el hipocampo, la amígdala y el hipotálamo^{46,47}.

El sistema dopaminérgico consta de grupos de neuronas dopaminérgicas distribuidas en el mesencéfalo, teniendo un origen en el VTA, sustancia negra y núcleo arcuato (NARC) del hipotálamo. Mediante distintas vías, estos grupos neuronales envían señales ascendentes a los ganglios basales y la corteza cerebral⁴². Además, el conjunto de neuronas dopaminérgicas del hipotálamo tiene un papel en la regulación endocrina y metabólica del organismo (Figura 4).

Las vías dopaminérgicas cerebrales más importantes son:

- **Vía Mesocortical:** Las neuronas dopaminérgicas del VTA proyectan a la corteza frontal y temporal. Estas áreas están implicadas en motivación y adicciones.
- **Vía Mesolímbica:** Las neuronas dopaminérgicas del VTA proyectan a estructuras límbicas, amígdala, hipocampo y núcleo accumbens. Estas áreas están implicadas en emociones, atención, mecanismos de recompensa, memoria y aprendizaje.
- **Vía Negroestriada:** Las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra inervan al cuerpo estriado, estando éste involucrado en reacciones motoras a estímulos, funciones motoras y aprendizaje.
- **Vía Tuberoinfundibular:** Las neuronas dopaminérgicas del NARC en el hipotálamo transmiten señales a la hipófisis y médula espinal. Estas áreas están implicadas en la homeóstasis energética del organismo, regulándola mediante secreciones endocrinas de distintas hormonas.

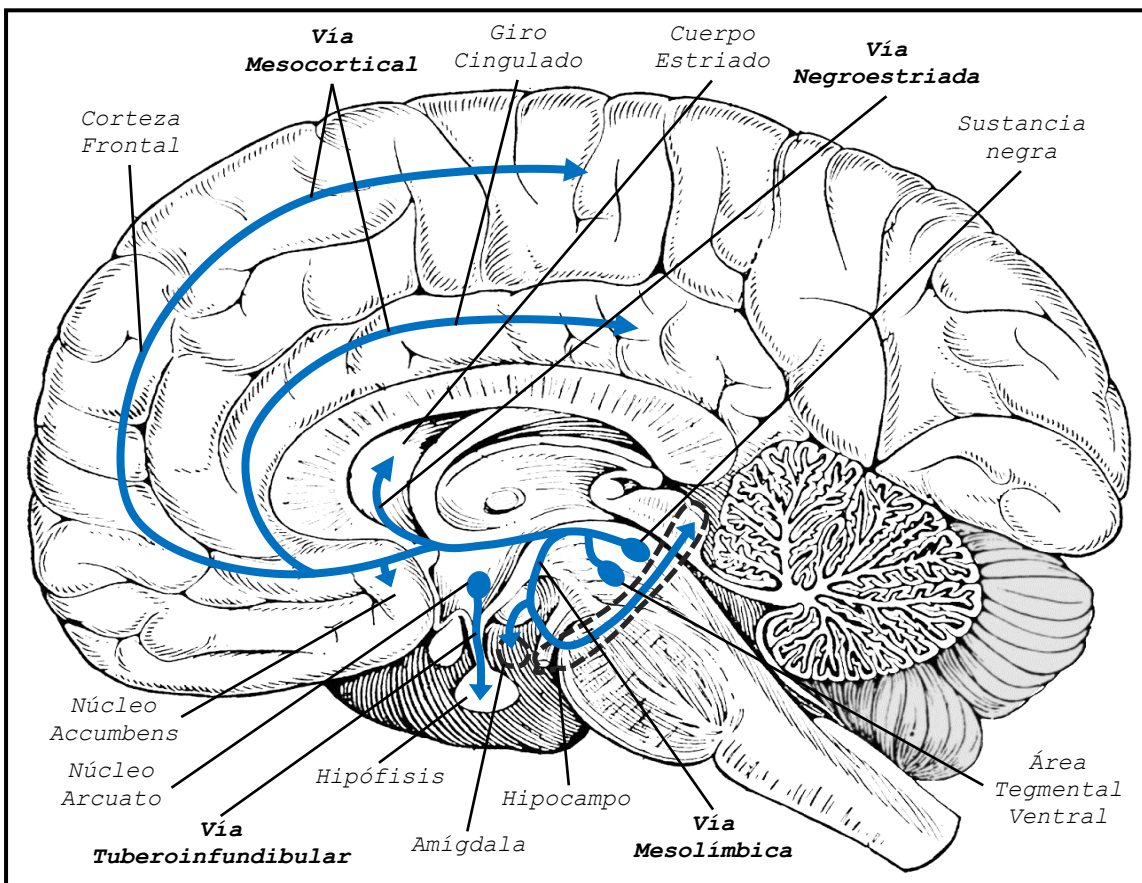


Figura 4: Las diferentes proyecciones del sistema dopaminérgico en del SNC. En negrita se especifican las cuatro vías principales. Adaptado de Nester et al. (2015)⁴².

3.4. Sistema noradrenérgico:

El sistema noradrenérgico está directamente involucrado en el procesamiento de la respuesta al estrés a nivel del SNC. Varios tipos de estrés activan el sistema noradrenérgico partiendo del tronco encefálico que proyectan a regiones mesolímbicas, produciendo tanto respuestas físicas como emocionales y cognitivas (Figura 5). Además, ante estresores agudos el sistema noradrenérgico activa el eje HPA traduciéndose en una respuesta sistémica. Si el estresor se cronifica el sistema noradrenérgico puede presentar alternaciones permanentes que inducirá un estado de hiperactividad^{48,49}. Por otro lado, la NA también tiene funciones orexigénicas en el hipotálamo activando estímulos alimenticios mediante la secreción de neuropéptidos⁴⁵.

Las proyecciones noradrenérgicas hacia la médula espinal están directamente relacionadas con el SAM. Por lo que ante situaciones estresantes el hipotálamo enviará señales noradrenérgicas hacia el locus cerúleo y éste transmitirá la señal de NA en la médula espinal hacia las glándulas adrenales que, a su vez, secretarán Adren provocando, finalmente, la activación del efecto "lucha o huida" a nivel sistémico^{48,49}.

Mediante receptores adrenérgicos se transmite la señal noradrenérgica a través del cerebro y se producen los efectos de la adrenalina en todo el organismo. Los receptores adrenérgicos se clasifican en tres tipos principales, α_1 , α_2 y β . Los receptores α_1 adrenérgicos cerebrales se encuentran en la corteza cerebral, el hipocampo y el núcleo estriado. Este tipo de receptores transmembrana están acoplados a proteína Gq, por lo que transmiten una señal intracelular mediada por la fosfolipasa C (PLC) e inositol trifosfato (IP3) como mensajero secundario que provocará un aumento del Ca^{2+} citosólico.

Los receptores α_2 adrenérgicos se distribuyen en el hipocampo, la amígdala, la corteza cerebral, el locus cerúleo y la médula espinal. A diferencia de los α_1 , los receptores α_2 están acoplados a proteína Gi que inhibe la adenilato ciclasa.

Finalmente, los receptores β adrenérgicos se localizan en el hipocampo, la corteza cerebral, el cerebelo. Estos receptores están acoplados a proteína Gs que activa la vía de señalización de AMP cíclico.

Los somas de las neuronas noradrenérgicas se sitúan en el tronco encefálico, formando dos áreas diferenciadas, el locus cerúleo y el área tegmental lateral (LTA). Ambas áreas se proyectan por todo el encéfalo formando tres rutas distintas⁴².

Estas rutas son:

- Ruta Locus Cerúleo: Las neuronas noradrenérgicas del locus cerúleo proyectan difusamente por toda la corteza cerebral, cerebelo y médula espinal. Esta difusión permite mantener estados de vigilia, percepción sensitiva y respuestas motoras a estímulos sorprendidos.
- Ruta Hipotálamo Tegmental Lateral: Un subgrupo de neuronas noradrenérgicas del LTA proyectan al hipotálamo. Esta conexión permite regular funciones vegetativas como las cardiovasculares mediante secreciones endocrinas.
- Ruta Tegmental Lateral Espinal: Otro subgrupo de neuronas noradrenérgicas del LTA proyectan en la médula espinal. Esta proyección está directamente involucrada en los reflejos autónomos y la sensibilidad al dolor.

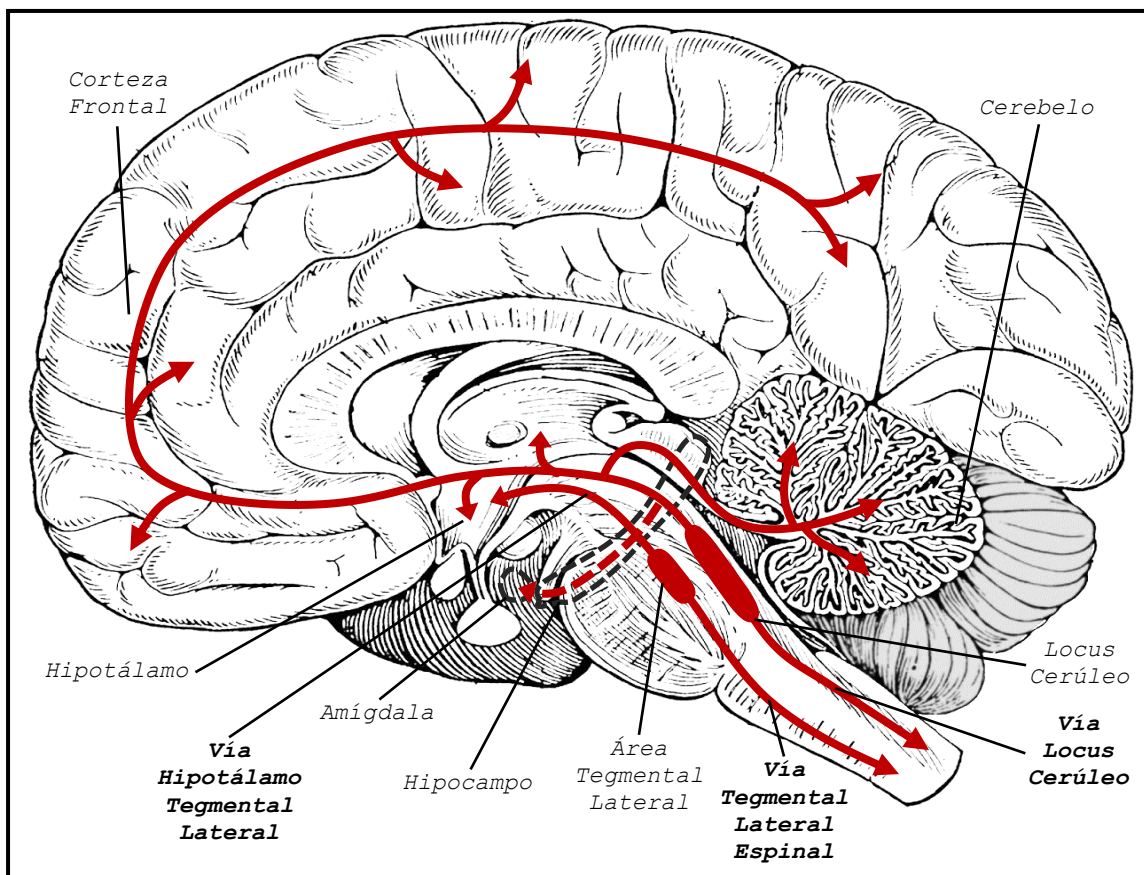


Figura 5: Las diferentes proyecciones del sistema noradrenérgico en del SNC. En negrita se especifican las tres rutas principales. Adaptado de Nester et al. (2015)⁴².

3.5. Sistema serotoninérgico:

El sistema serotoninérgico está asociado con trastornos obsesivos, depresión y ansiedad, además de estar implicado en la regulación de funciones neuroendocrinas en la respuesta al estrés. Así pues, las proyecciones de los núcleos del rafe hacia distintas áreas límbicas como la corteza frontal, hipocampo o amígdala se activan ante estresores psicológicos o sociales provocando ansiedad y miedo (Figura 6). Por otro lado, una disminución en la 5-HT en estas mismas áreas conllevan a situaciones de depresión^{50,51}. La 5-HT en el hipocampo induce la expresión de receptores de glucocorticoides (GC) que, a su vez, regulan mediante una retroinhibición la respuesta al estrés del eje HPA⁵¹. Este efecto se ha relacionado con la respuesta a estresores crónicos ya que permite restaurar las funciones neuronales provocando la adaptación al estrés y reduciendo los efectos ansiogénicos del estímulo estresor. Por otro lado, en el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo la 5-HT activa directamente el eje HPA, además de estar relacionada con disminuciones en la ingesta de alimentos⁵².

La transmisión serotoninérgica está mediada por receptores de serotonina de las neuronas postsinápticas. Los receptores de serotonina se clasifican en siete familias (5-HTR1-7). Los receptores de las familias 1 y 5 están acoplados a proteína Gi y se encuentran distribuidos por el SNC, destacando áreas como el hipocampo, los núcleos del rafe, la corteza cerebral, la amígdala, el hipotálamo y el cuerpo estriado⁵³.

Los 5-HTR2 están acoplados a proteínas Gq y se localizan principalmente en los ganglios basales^{53,54}.

Por otro lado, la familia de receptores 5-HTR3 son los únicos receptores que no están acoplados a proteína G, sino que están ligados a canales catiónicos de Na⁺ y K⁺. Los receptores 5-HTR3 se encuentran en el hipocampo, la corteza cerebral y la médula espinal^{53,54}.

El resto de familias (4, 6 y 7) son receptores transmembrana acoplados a proteína Gs que activarán la adenilato ciclasa. La distribución de estos receptores es difusa en el SNC. Sin embargo, se concentran en el núcleo accumbens, el hipocampo, el hipotálamo y la corteza cerebral^{53,54}.

Los principales grupos neuronales secretores de serotonina se sitúan en el tronco encefálico. El conjunto de estos grupos se conoce como núcleos del rafe y se dividen en siete subgrupos. Los núcleos que se sitúan en la parte más rostral del tronco encefálico son el núcleo del rafe linearis, dorsal, medial y pontis (en orden de descensión caudal), mientras que los núcleos más caudales en el tronco encefálico son el núcleo del rafe magnus, pallidus y obscurus. El grupo de núcleos más rostral forman dos rutas de proyección cerebral, mientras que el grupo de núcleos más caudal forma una sola ruta de proyección⁴².

Estas rutas son:

- Ruta Límbica: Las neuronas serotoninérgicas del núcleo del rafe dorsal proyectan a los núcleos dopaminérgicos de la sustancia negra y el VTA, el cuerpo estriado, la amígdala y la corteza cerebral. El núcleo del rafe medial inerva la región hipotalámica del núcleo paraventricular (PVN) y el hipocampo. Todas estas proyecciones están implicadas en conducta, ciclos de sueño o vigilia e ingesta de alimentos.
- Ruta Cerebelar: Los núcleos del rafe más rostrales proyectan difusamente al cerebelo regulando así los sistemas motores.
- Ruta Espinocerebelar: Los núcleos del rafe más caudales inervan el cerebelo y la médula espinal teniendo implicaciones en la percepción del dolor y respuestas motoras.

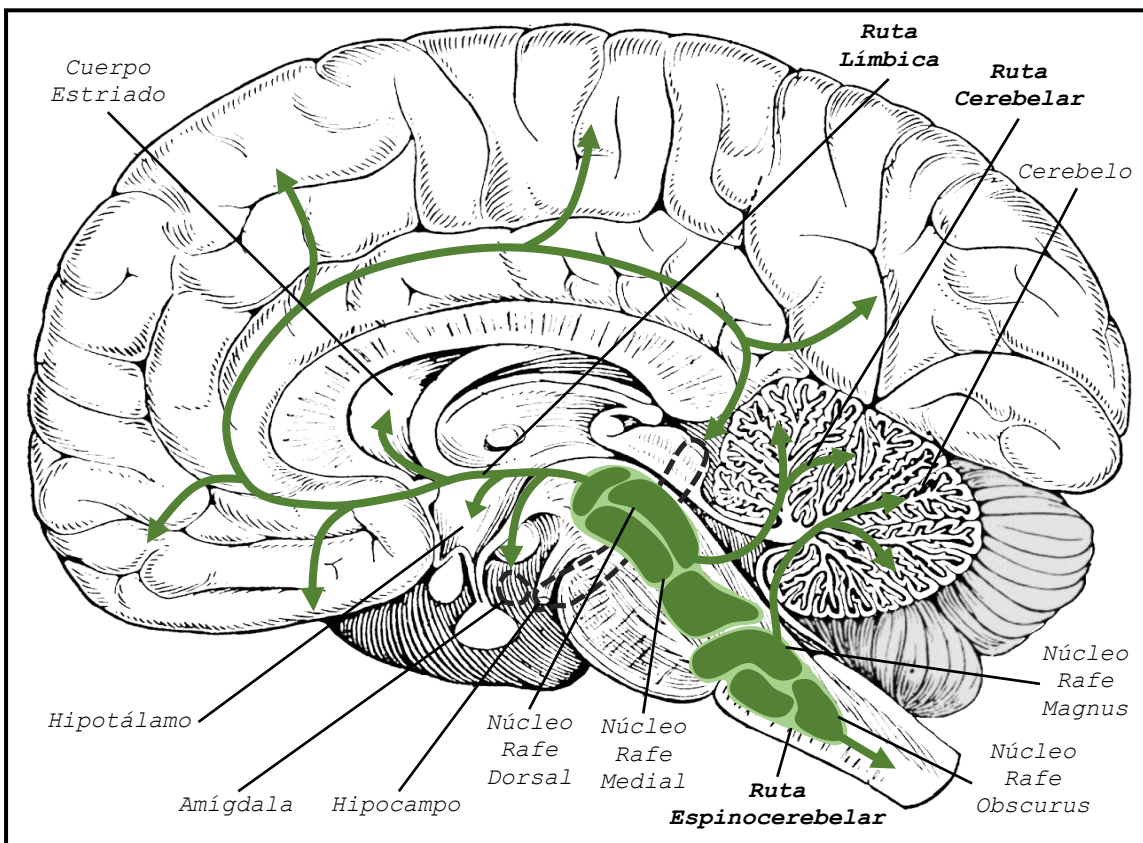


Figura 6: Las diferentes proyecciones del sistema serotoninérgico en del SNC. En negrita se especifican las tres rutas principales. Adaptado de Nester et al. (2015)⁴².

4. Respuestas endocrinas al estrés:

La integración de la respuesta al estrés, independientemente de su tipo y procesamiento en el SNC, se da en el hipotálamo, específicamente en el núcleo paraventricular (PVN)^{30,31}. Este núcleo secreta hormonas y neurotransmisores que transmitirán la señal del estímulo estresor por todo el sistema incluyendo otras áreas cerebrales. Además, el hipotálamo también actúa como sensor de la homeostasis energética del organismo recibiendo señales hormonales del tejido adiposo, estómago y páncreas.

Por lo tanto, existen dos grandes rutas por las cuales se consiguen respuestas sistémicas a los factores estresantes, estando el hipotálamo involucrado en ambas.

4.1. Eje HPA y SAM:

La recepción del estímulo estresante por parte del hipotálamo provoca una respuesta noradrenérgica que se transmite por la médula espinal hasta llegar a las glándulas adrenales. Este sistema se conoce como sistema simpático adrenomedular (SAM). Así pues, el PVN del hipotálamo transmite la señal noradrenérgica al locus cerúleo, que la seguirá transmitiendo por los nervios postganglionares de la médula espinal hasta las glándulas adrenales⁵⁵. Cuando las glándulas adrenales reciben la señal noradrenérgica liberarán al torrente sanguíneo Adren y NA que, mediante receptores α adrenérgicos situados en los tejidos diana, producirán efectos para una respuesta de "lucha o huida" a nivel sistémico, siendo estos un aumento de la frecuencia cardíaca, vasoconstricción y movilización de las reservas energéticas⁵⁵.

El eje HPA también inicia la señal en el PVN del hipotálamo que se transmitirá a la hipófisis mediante la secreción del factor liberador de corticotropina (CRH). La hipófisis, al recibir esta señal, secretará al torrente sanguíneo la corticotropina (ACTH) que tiene como diana las glándulas adrenales. Mediante receptores específicos acoplados a proteína Gs, la ACTH promueve la síntesis y la liberación de glucocorticoides (GC) y mineralocorticoides (MC) al torrente sanguíneo por parte de las cortezas de las glándulas adrenales^{30,31} (Figura 7).

Los GC, sintetizados a partir del colesterol en las glándulas adrenales, promueven cambios en el organismo para una adaptación al estímulo estresor con el objetivo de restaurar la homeostasis. Entre estos cambios se encuentran la inhibición del crecimiento óseo y muscular, movilización energética, degradación de lípidos y proteínas, y vasoconstricción. Además, existe una estrecha interacción moduladora entre el sistema inmune y el sistema neuroendocrino, tanto es así que ante un estrés agudo el sistema inmune induce procesos inflamatorios para mantener una activación del eje HPA⁵⁶. Sin embargo, ante un estrés crónico los GC inhiben la respuesta inmune celular manteniéndose la respuesta inmune humoral con el fin de evitar daños por la sobreactivación del sistema inmune⁵⁶. No obstante, este efecto vuelve al organismo susceptible a infecciones nuevas o latentes.

El eje HPA se encuentra regulado mediante una retroinhibición por parte de los GC, lo que conlleva a una disminución de la secreción de CRH y de ACTH por parte del PVN y la hipófisis. Existen receptores de GC y MC en distintas áreas cerebrales entre ellas el mismo hipotálamo y la hipófisis, el hipocampo y la corteza prefrontal^{30,31}.

Además de esta regulación por retroinhibición también existe un complejo sistema de modulación del eje HPA por parte de distintas áreas cerebrales y sistemas de neurotransmisores que proyectan al hipotálamo. El sistema serotoninérgico, mediante las innervaciones al PVN por parte de los núcleos del rafe, estimula la secreción de CRH y, por lo tanto, de ACTH. La amígdala también activa el eje HPA promoviendo la liberación de CRH y, finalmente, de GC aumentando la respuesta al estrés a nivel sistémico^{30,31}.

Por otro lado, los receptores de GC situados en el hipocampo promueven su estimulación. Al estimularse el hipocampo mediante proyecciones al PVN reduce su actividad y, por lo tanto, inhibe la liberación de GC. El hipocampo tiene un importante papel en la finalización de la respuesta al estrés por parte del eje HPA y se sugiere que la disminución de la actividad del PVN se produce mediante innervaciones GABAérgicas del hipocampo⁵⁷. Los receptores de GC hipocámpales se han relacionado con efectos en la consolidación de la memoria.

La gran cantidad de receptores de GC presente en la corteza prefrontal evidencian su importancia en la modulación del eje HPA. Existen proyecciones de la corteza prefrontal a las regiones GABAérgicas del PVN hipotalámico, por lo que una activación de la corteza prefrontal inhibiría la activación del eje HPA⁵⁷. La activación de la corteza prefrontal se puede dar mediante los receptores de GC, por el sistema noradrenérgico o el dopaminérgico. Todas estas proyecciones sugieren una integración de la señal estresante en la corteza prefrontal que actuaría modulando e extinguendo la respuesta al estrés.

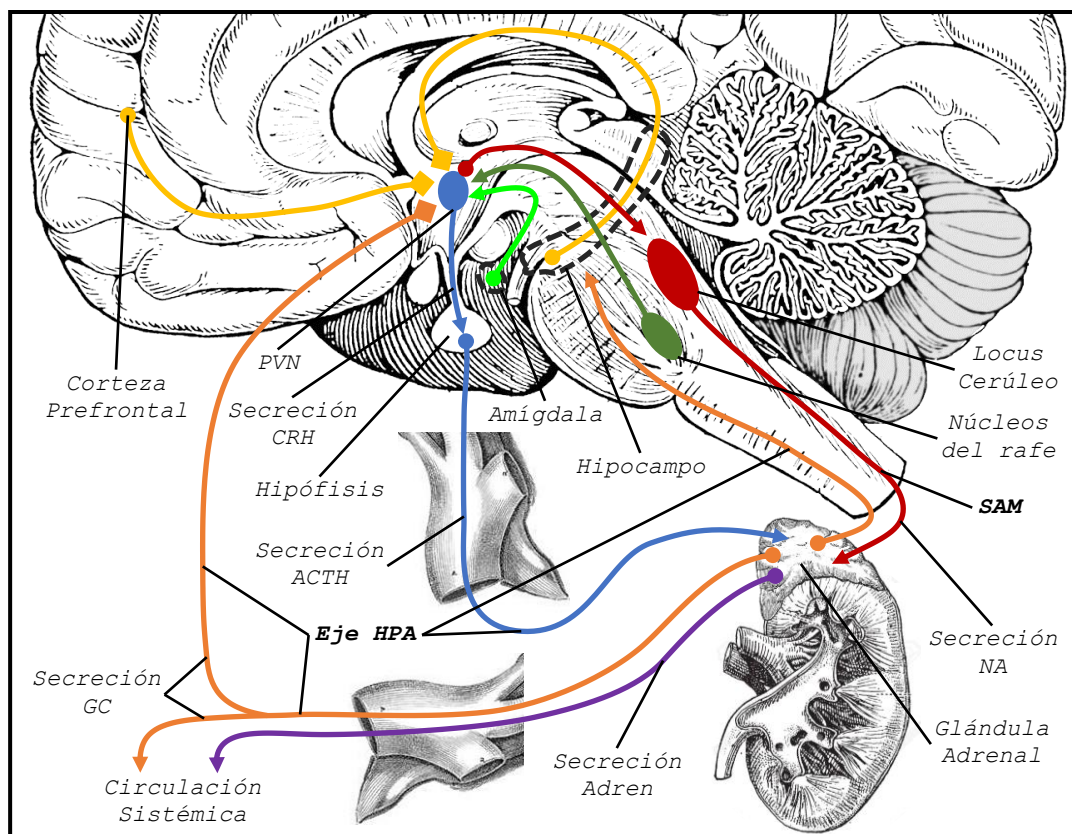


Figura 7: Esquema del funcionamiento del eje HPA y SAM. Los puntos representan el inicio de la señal o de la secreción, las flechas acciones activadoras y los cuadrados acciones inhibitorias. Adaptado de Herman et al. (2003)³¹ y Jensen et al. (1995)⁵⁵.

4.2. Regulación de la homeostasis energética:

Frente a estresores metabólicos como son la restricción alimentaria o el ayuno el sistema se expone a perder la homeostasis energética. Existen varias hormonas peptídicas que actúan como sensores energéticos del organismo. Estas hormonas son secretadas por distintos órganos que regulan una respuesta metabólica sistémica ante un desbalance energético. Por otro lado, en el SNC se implementan respuestas conductuales mediadas por neuropéptidos y neurotransmisores tales como estados de vigilia y sueño, de búsqueda de alimentos, ingesta o motivacionales. Por lo tanto, para una correcta regulación de la homeostasis energética es indispensable una comunicación entre el cerebro y el resto de sistema.

4.2.1. Hormonas reguladoras de la homeostasis energética:

Las principales hormonas que llevan a cabo esta comunicación y regulan la homeostasis energética sistémica son la insulina, la leptina y la ghrelina⁴⁵ (Figura 8).

La leptina es una hormona peptídica con un peso molecular de 16 kDa que es secretada mayoritariamente por los adipocitos del tejido adiposo⁵⁸. La secreción

y expresión de leptina está relacionada proporcionalmente con la cantidad de triglicéridos almacenados en los adipocitos^{39,59,60}. La cantidad de leptina secretada también es proporcional al tamaño del adipocito. El receptor de leptina (Ob-Rb) se encuentra repartido por todo el organismo, no obstante, ciertos tejidos como el hipotalámico, hepático y pancreático destacan en su expresión. Este receptor activa rutas de señalización de JAK-STAT, PI3K y cascadas MAPK/c-Fos promoviendo cambios en la expresión génica. En el NARC del hipotálamo la leptina inhibe la expresión del neuropéptido Y (NPY), un neuropéptido estrechamente relacionado con la ingesta teniendo un efecto orexigénico, mientras que promueve la expresión de proopiomelanocortina (POMC), un neuropéptido con funciones anorexigénicas que incrementa el gasto energético sistémico⁶¹. Por otro lado, en el hígado la leptina induce la gluconeogénesis disminuyendo los niveles de glucemia. Además, la leptina inhibe la expresión de insulina en las células β pancreáticas^{59,60}.

La insulina es una hormona peptídica que se sintetiza en las células β pancreáticas en respuesta a altos niveles de glucemia o lipemia en situaciones de saciedad⁴¹. Sus efectos a nivel sistémico son ampliamente conocidos: aumento de la captación de glucosa, activación de la glucólisis y de la síntesis de glucógeno y otros procesos anabólicos que conllevan gasto energético. El receptor de insulina (INSR) se expresa en casi todos los tejidos del organismo. La transmisión de la señal mediante el receptor INSR se da a través de la vía de señalización PI3K y Ras-MAPK que darán lugar a expresiones génicas. Concretamente, en el NARC hipotalámico la insulina también inhibe la ingesta controlando la expresión del NPY, tal y como lo hace la leptina⁴¹. Además, la insulina estimula la síntesis y la secreción de leptina por parte de los adipocitos en el tejido adiposo. Así pues, el papel de la leptina y la insulina está muy relacionado entre ellas y enfocado a regular la homeostasis energética en condiciones saciantes del organismo⁵⁹.

En cambio, la ghrelina otra hormona peptídica, que es secretada principalmente por el estómago cuando este está vacío⁶², tiene efectos opuestos a la leptina y la insulina en cuanto a gasto energético e ingesta se refiere. Por lo tanto, la ghrelina moviliza las reservas de glicógeno hepático y promueve la lipólisis en el tejido adiposo^{40,62}. Estos efectos se dan a través de receptores acoplados a proteínas Gs, como son el receptor de secretagogos de la hormona del crecimiento (GHSR) o receptores adrenérgicos, por lo que principalmente será la vía de señalización de cAMP que mediará los procesos catabólicos. En el SNC, la ghrelina tiene su principal efecto en el hipotálamo, donde induce la secreción de la hormona del crecimiento de la hipófisis. Además, activa la expresión de NPY en el NARC lo que se traduce en un aumento de la ingesta^{40,63}.

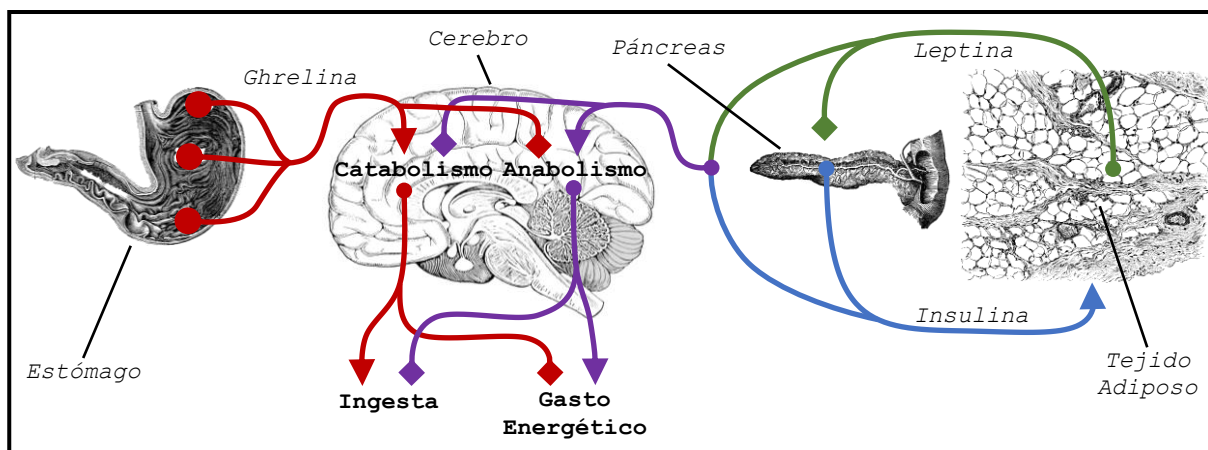


Figura 8: Esquema de las acciones de las hormonas insulina, ghrelina y leptina en el SNC. Los puntos representan el inicio de la señal o de la secreción, las flechas acciones activadoras y los cuadrados acciones inhibitorias. Adaptado de Schwartz et al. (2000)⁴⁵.

4.2.2. Neuropeptidos reguladores de la homeostasis energética:

Los estímulos orexigénicos o anorexigénicos que transmiten las distintas hormonas son recibidos e integrados principalmente por el hipotálamo, ya sea de manera directa o mediante proyecciones de otras áreas cerebrales. Posteriormente, los distintos núcleos hipotalámicos se encargan de transmitir los estímulos al resto del encéfalo mediante secreciones de neuropeptidos (Figura 9).

La proopiomelanocortina (POMC) es un péptido precursor de hormonas peptídicas y neuropeptidos que es sintetizado mayoritariamente por las neuronas del NARC hipotalámicas. Al procesarse se obtienen las hormonas ACTH y la hormona estimuladora de melanocitos (α -MSH) entre otras^{45,64}. Las neuronas generadoras de POMC del NARC proyectan a otros núcleos hipotalámicos como el PVN o el área lateral del hipotálamo (LHA) y a áreas no hipotalámicas como el núcleo dopaminérgico VTA⁶⁵. Las secreciones hipotalámicas de α -MSH tienen efectos anorexigénicos, concretamente las proyecciones en el PVN activan la secreción y expresión de hormonas que estimulan el gasto energético, como la hormona liberadora de tirotrina (TRH) o la CRH, mediante receptores de melanocortina acoplados a proteína Gs, mientras que las proyecciones al LHA y al VTA inhiben la secreción de neuropeptidos orexigénicos y la liberación de DA, respectivamente^{45,64,65}. Por lo tanto, POMC es un péptido con acción anorexigénica.

El neuropeptido Y es un péptido sintetizado por las neuronas del NARC en respuesta a la ghrelina transmitiendo así un estímulo orexigénico al encéfalo. La secreción de NPY en el NARC hipotalámico inhibe directamente a la expresión y secreción de POMC situadas en el mismo núcleo^{45,65}. Las neuronas secretoras de NPY proyectan también a otros núcleos hipotalámicos, el PVN y el LHA, donde se expresan receptores de NPY que están acoplados a proteína G inhibitorias de la producción de cAMP (Gi). La secreción de NPY al PVN inhibe las secreciones de TRH y CRH que se dan en ese núcleo hipotalámico, mientras que la proyección al LHA promueve la secreción y la expresión de orexina A⁴⁵.

La orexina A (OrexA) es un péptido que se sintetiza específicamente en una población de neuronas del LHA en el hipotálamo conocidas como neuronas orexigénicas^{66,67}. Las neuronas orexigénicas proyectan a núcleos dopaminérgicos (VTA), noradrenérgicos (locus cerúleo) y serotoninérgicos (rafe dorsal) que conjuntamente forman un sistema conocido como el sistema activador reticular ascendente (ARAS)⁶⁶. El ARAS está involucrado en estados de vigilia, excitabilidad y actividad motriz. Por lo tanto, mediante receptores de orexina acoplados a proteínas Gq, las neuronas orexigénicas transmiten una señal que estimula la ingesta (orexigénica), la actividad motriz del organismo y desvelo al resto del cerebro⁶⁷. Además, existe una regulación mediante hormonas como la leptina que inhibe directamente la secreción de orexina A de las neuronas orexigénicas mientras que la ghrelina estimula su secreción⁶⁵.

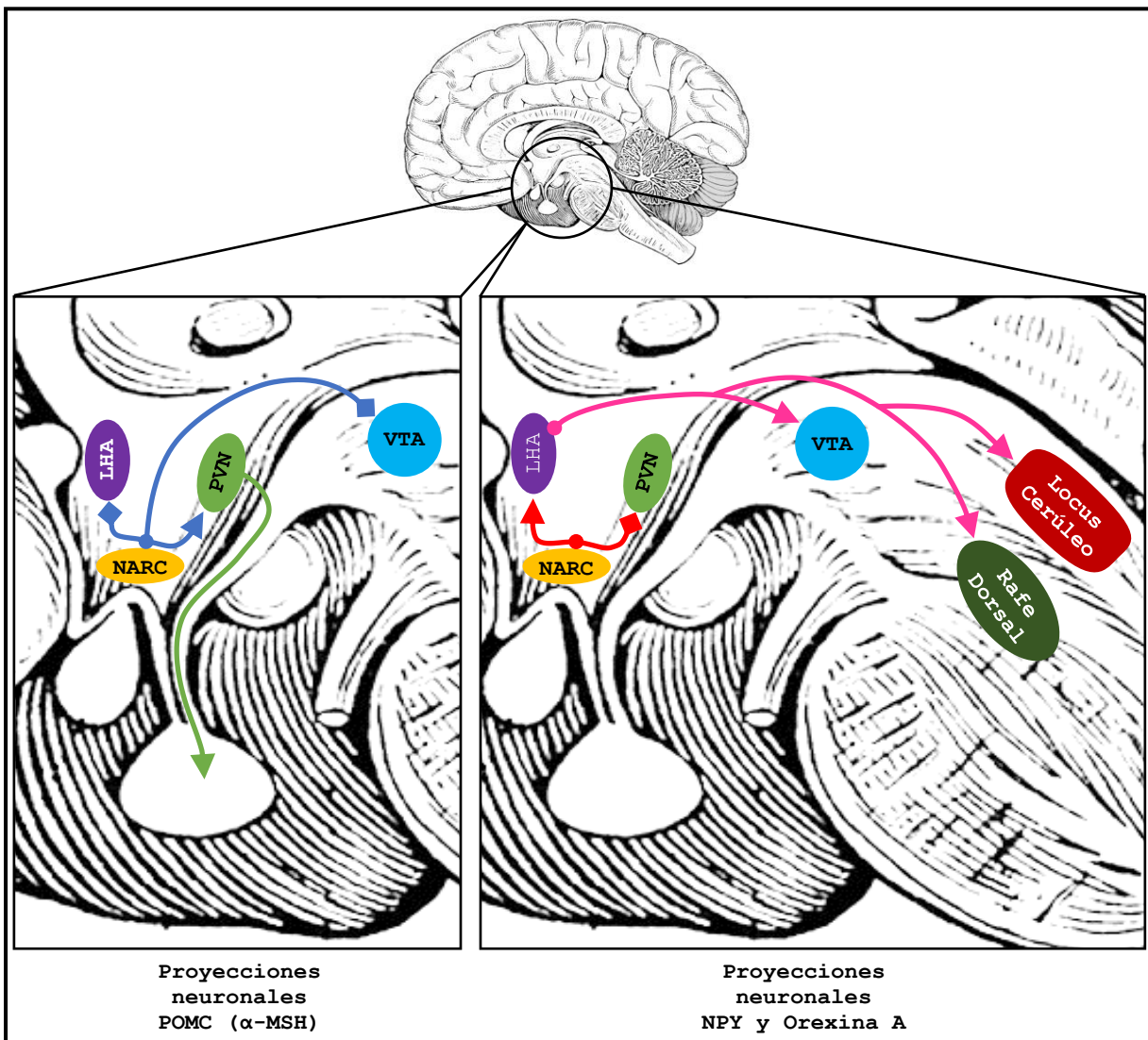


Figura 9: Proyecciones neuronales de los neuropéptidos en el SNC. Las proyecciones de POMC se activan por la leptina o insulina y las de NPY y Orexina se activan por la ghrelina. Los puntos representan el inicio de la señal o de la secreción, las flechas acciones activadoras y los cuadrados acciones inhibitorias. Adaptado de van Zessen et al. (2012)⁶⁵.

5. Aportaciones de la proteómica al estudio del estrés:

La proteómica es una ciencia que estudia el proteoma de los seres vivos. Entendiendo el proteoma como el conjunto de proteínas presentes en un fluido, célula o tejido a un tiempo determinado y en unas condiciones específicas. Las técnicas proteómicas son capaces de identificar y cuantificar este conjunto de proteínas.

En el 1987 Michael Karas, Franz Hillenkamp y Koichi Tanaka desarrollaron las técnicas para ionizar biomoléculas de alta masa molecular, mediante matrices de absorción y electroespray (MALDI y ESI), pudiendo así analizarlas en el espectrómetro de masas^{68,69}. Este hito, por el cual Koichi Tanaka recibió un premio Nobel en 2002, fue el primer paso para la identificación de proteínas basándose en su secuencia aminoacídica y la posterior aparición de la proteómica como ciencia.

Partiendo de esa técnica se derivaron otras que permitían la cuantificación absoluta de proteínas usando péptidos proteotípicos (SRM/MRM y SWATH-MS DIA) o cuantificaciones relativas que requieren de un marcaje diferencial previo de las proteínas como el DIGE (Difference Gel Electrophoresis) mediante geles de acrilamida o el iTRAQ (isobaric Tag for Relative Quantification) que emplea directamente la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), entre otras. Mediante estas técnicas es posible identificar proteínas con abundancias distintas dentro de los proteomas que se quieran comparar.

Así pues, sometiendo a organismos a distintas situaciones estresantes o enfermedades y estudiando los tejidos se pudo analizar la respuesta celular mediante la identificación de las diferentes proteínas que se sintetizaban. Por lo tanto, identificar las proteínas que presentan diferencias en su abundancia ante estas situaciones permiten relacionarlas con la respuesta al estrés y su posterior estudio con más profundidad. De ese modo, se descubrió la implicación de distintas proteínas en respuesta ante estresores metabólicos tales como las restricciones alimentarias en varios modelos animales y tejidos. El estudio proteómico del hipotálamo de vacas restringidas nutricionalmente reveló un aumento de las proteínas de choque térmico (HSP) y de otras chaperonas, mientras que disminuían proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos⁷⁰. Los mismos cambios se observaron en el tejido muscular de cerdos con una dieta restringida al 60 %⁷¹. No sólo el estrés metabólico producido por la dieta presenta este perfil en el proteoma celular, se ha descrito que las neuronas hipocámpales de ratas sometidas a ejercicio físico también sintetizan más HSP y otras chaperonas⁷².

Por otro lado, las técnicas proteómicas también son útiles para identificar alteraciones en el proteoma ante estresores más sutiles como pueden ser los psicosociales. Al introducir ratas ajenas en jaulas con ratas dominantes se genera un estrés social en las ratas ajenas que promovieron cambios en el

proteoma del hipocampo⁷³. Estos cambios afectaron al metabolismo celular mediante diferencias en la abundancia de enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos. También aumentó la síntesis de chaperonas y de proteínas involucradas en el procesado de las especies reactivas de oxígeno (ROS) como las peroxirredoxinas evidenciando un desequilibrio oxidativo. Además, se describieron cambios en la estructura del citoesqueleto celular al aumentar proteínas relacionadas con el citoesqueleto.

Ratas sometidas a estrés agudo por inmovilización mostraron cambios en el proteoma de los timocitos, células del timo que forma parte del sistema inmune, que se determinaron mediante la técnica de proteómica diferencial DIGE⁷⁴. Estos cambios comprenden el aumento de la abundancia de grupos de proteínas como las de citoesqueleto y las chaperonas. Este estrés por inmovilización también provocó la disminución en la abundancia de grupos de proteínas como las involucradas en el procesado de ROS, las implicadas en traducción y transcripción. Por lo tanto, los cambios en el proteoma que se producen ante situaciones estresantes dependen del tejido, puesto que los mismos grupos de proteínas pueden aumentar o disminuir su abundancia en distintos tejidos.

Así pues, gracias a la proteómica se han podido determinar los cambios de abundancia e identificar qué proteínas responden ante diversos tipos de estrés, estos cambios en el proteoma dan una primera aproximación para entender la respuesta celular frente a estas situaciones, lo que se traduce en posteriores estudios más específicos e incluso la identificación de marcadores proteicos para determinar el grado de estrés. Además, en el caso de animales de granja, donde el estrés que pueden sufrir durante la estabulación afecta directamente a la productividad y la calidad de la carne, la proteómica resulta de gran utilidad ya puede arrojar luz sobre los procesos biológicos involucrados a la respuesta ante estresores típicos en el sector ganadero como son el manejo, el transporte, estabulaciones de alta densidad o el sacrificio^{1,3}.

6. Biomarcadores de estrés:

Debido a los requerimientos de la industria ganadera y de la opinión pública, se hizo imperativo crear métodos que pudieran medir el bienestar animal. Actualmente, iniciativas internacionales como *Welfare Quality* establecen protocolos para crear un sistema de evaluación y, así, controlar el bienestar animal en la industria ganadera². Estos protocolos se basan en mediciones del comportamiento o fisiológicas como la frecuencia cardíaca o la temperatura corporal para evaluar el estrés animal. Sin embargo, estas mediciones son inexactas y subjetivas, por lo que es necesario establecer unos criterios objetivos de laboratorio para evaluar el grado de bienestar².

A pesar de existir gran cantidad de biomarcadores para determinar el grado de estrés que sufre un animal ninguno de ellos cumple todos los requisitos

necesarios para considerarse un buen marcador de estrés o bienestar animal. Cualquier marcador ha de ser fiable, específico, sensible, tener valor predictivo, obtención poco invasiva y sencillo de medir⁷⁵.

Al no disponer de ningún biomarcador de estrés con esas cualidades se determinan una batería de marcadores para determinar el grado de estrés que sufre un animal.

El cortisol, una hormona glucocorticoide (GC), históricamente se ha considerado la hormona del estrés, siendo de los marcadores sanguíneos más usados en la determinación del grado de estrés. Sin embargo, la secreción de cortisol varía con factores no asociados al estrés como el ritmo circadiano e incluso el propio muestreo para su determinación puede alterar la fiabilidad de los resultados⁷⁶. Debido a esos motivos se ha implementado su determinación en otros fluidos de muestreo menos invasivo como es la saliva, siendo un marcador de estrés agudo, o el pelo, considerándose un marcador de estrés crónico⁷⁷.

Las proteínas de fase aguda (APP) son proteínas plasmáticas sintetizadas por el hígado. La concentración de estas proteínas en el plasma incrementa después de una infección o una inflamación y ante estresores físicos o psicosociales. Las APP más relevantes y determinadas en cerdo son la proteína C-Reactiva (CRP), la Pig-MAP y la haptoglobina (HP)^{32,78}. No obstante, su falta de especificidad supone un problema para su utilización práctica.

El estrés oxidativo se ha relacionado directamente con factores estresantes y un pobre bienestar. Se define como un desbalance del equilibrio oxidativo de la célula. Este desequilibrio es debido a que las defensas antioxidantes no pueden eliminar las ROS que se crean durante el metabolismo celular, ya sea porque hay una generación excesiva de ROS o por la disminución de las defensas antioxidantes⁷⁹. Si la cantidad de ROS aumenta pueden oxidar libremente a otras moléculas como proteínas, lípidos o DNA llegando incluso a poder perder su función biológica. A la hora de determinar el grado de estrés oxidativo de un animal se pueden detectar la cantidad de macromoléculas oxidadas, como los grupos carbonilo formados en las proteínas, o determinando la actividad de enzimas antioxidantes como la glutatión peroxidasa (GPx) o la superóxido dismutasa (SOD)⁷⁹. Sin embargo, la interpretación de los resultados analizados resulta difícil debido a que la causa subyacente del desbalance oxidativo no se puede conocer a partir sólo de la determinación estos biomarcadores.

Por lo tanto, al determinar varios de estos biomarcadores se puede obtener un perfil bioquímico que indicará el grado de estrés sistémico que sufre un animal ante situaciones estresantes o de pobre bienestar.

No obstante, la necesidad de identificar nuevos biomarcadores de estrés que cumplan los requisitos para ser un buen biomarcador, mencionados anteriormente, sigue siendo un objetivo hasta la fecha, siendo las técnicas de proteómica diferencial un buen recurso para lograrlo.

Antecedentes y Objetivos

*"Pensad antes de obrar y no comencéis nada sin haber consultado las circunstancias bien a fondo". **Descartes***

Antecedentes:

Hace unos años que nuestro grupo se centró en la investigación del bienestar y el estrés en animales de granja. Los estudios previos del grupo se iniciaron con el estudio de marcadores de estrés plasmáticos como las proteínas de fase aguda (APP), Pig-MAP, haptoglobina (HP) o la proteína C-Reactiva (CRP) en distintos animales de granja sujetos a estresores físicos como confinamientos y transportes. Seguidamente, procedieron a la búsqueda de nuevos marcadores de estrés en el plasma mediante técnicas proteómicas^{1,78}. Al tener el estrés un fuerte componente neurológico, más adelante se analizó el papel de los neurotransmisores del SNC ante estas situaciones de estrés⁸⁰. Se inició también el análisis del proteoma diferencial del hipocampo en situaciones de enriquecimiento ambiental.

Al incorporarme al grupo se siguió la búsqueda de biomarcadores de estrés utilizando células PBMC, ya que son componentes del sistema inmune y no presentan los inconvenientes del plasma. Se amplió también con el estudio de la participación de las vías catecolaminérgicas y serotoninérgicas en otras situaciones de estrés. Se estudiaron dos tipos de estrés: el estrés psicosocial, producido por la mezcla de individuos y la relación humano-animal (realizado de forma coordinada con el Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària (IRTA)) y el estrés metabólico. Este último se abordó de distintas formas: en primer lugar, los efectos producidos por dietas de alto contenido lipídico, siendo un proyecto financiado por la empresa Laboratorios Ordesa SL (Barcelona). El estrés metabólico debido a cambios en la dieta materna se llevó a cabo en colaboración con Institut d'Investigació Biomèdica de Girona Dr. Josep Trueta (IDIBGI, Girona). Finalmente, el estrés metabólico producido por la restricción del crecimiento intrauterino se estudió en colaboración con el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA, Madrid). Además, todos estos estudios fueron parte del proyecto ANEMOMA (AGL2011-30598-C03-02) financiado por el MINECO.

Objetivos:

El objetivo general es estudiar los efectos que producen estresores psicosociales y metabólicos sobre el sistema inmune y el sistema nervioso central en cerdos, mediante la determinación de marcadores de estrés, el análisis del perfil de neurotransmisores cerebrales y la utilización de técnicas proteómicas.

Los objetivos específicos fueron:

1. Estudio de los efectos del estrés psicosocial en cerdos provocado por la mezcla de individuos en la granja y la relación humano-animal, con el fin de analizar las alteraciones provocadas por el estrés inicial por la mezcla de individuos, y evaluar si una relación humano-animal durante dos meses mitiga el efecto de dicho estrés. En concreto:
 - a. Identificar potenciales biomarcadores y estudiar los mecanismos moleculares del estrés, en suero y PBMCs.
 - b. Determinar cambios en el proteoma de PBMC mediante la técnica de proteómica diferencial DIGE.
 - c. Determinar el perfil de neurotransmisores en la amígdala, corteza prefrontal, hipocampo e hipotálamo.
2. Estudio del estrés metabólico provocado por una dieta rica en grasas (HFD) y los potenciales beneficios de la adición de probióticos y ácidos grasos ω -3 sobre el SNC. En concreto:
 - a. Determinar los efectos sobre el perfil de neurotransmisores en el hipotálamo, amígdala, corteza prefrontal y el hipocampo dorsal y ventral.
 - b. Determinar los efectos sobre los neuropéptidos implicados en el control de la ingesta hipotalámicos.
 - c. Evaluar si los cambios provocados por las dietas *High Fat Diet*, suplementos probióticos y ácidos grasos omega-3 sobre neurotransmisores y los neuropéptidos cerebrales tiene alguna relación con los resultados productivos (peso y consumo de alimento).

3. Estudio del estrés metabólico provocado por una dieta materna equilibrada o con desequilibrio calórico durante la gestación sobre el SNC de los lechones. En concreto:
 - a. Determinar los efectos sobre el perfil de neurotransmisores en el cuerpo estriado, hipotálamo, amígdala, corteza prefrontal e hipocampo dorsal y ventral.
 - b. Determinar la concentración de neuropéptido Y en el hipotálamo.
 - c. Determinar la concentración de catecolaminas y de aminoácidos libres en el plasma.
 - d. Evaluar si los cambios provocados por las dietas maternas pueden ser modificados por el tratamiento de los lechones con el hipoglucemiante oral metformina.

4. Estudio del estrés metabólico provocado por el efecto de restricción del crecimiento intrauterino (IUGR) y el sexo sobre el SNC de los lechones. En concreto:
 - a. Determinar el efecto sobre el perfil de neurotransmisores en el hipocampo y la amígdala.
 - b. Determinar cambios en el proteoma del hipocampo mediante la técnica proteómica SWATH-MS DIA.
 - c. Evaluar los cambios producidos por la IUGR sobre los neurotransmisores y el proteoma hipocampal son distintos según el sexo.

Material y Métodos

"No desprecies la verdad empírica. Muchas cosas funcionan en la práctica para las que el laboratorio no ha encontrado nunca una prueba". **Martin H. Fisher**

Material

1. Soluciones y tampones:

Las composiciones de todas las soluciones o tampones citadas y empleadas en la metodología se describen por orden de utilización en la Tabla 1.

Tabla 1: Soluciones y tampones usados en la metodología.

Solución	Composición	Solución	Composición	Solución	Composición
PBS	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 1 mM Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 7,2-7,4 pH	Gel Apilador	125 mM Tris-HCl 4 % Acrilamida (v/v) 0,1 % SDS (v/v) 0,25 % TEMED (v/v) 0,05 % PSA (v/v) 6,8 pH	Solución Fijación	40 % Etanol (v/v) 10 % Ácido Acético (v/v) 50 mM NH ₄ HCO ₃
Tampón HBSS	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 1 mM Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O 1,8 mM KH ₂ PO ₄ 5,55 mM D-Glucosa 7,2-7,4 pH	Tampón Electroforesis	25 mM Tris-HCl 193 mM Glicina 0,2 % SDS (p/v) 8,3 pH	Tampón Desteñido DIGE	50 % Etanol (v/v) 8,3 pH
Tampón IEF	7 M Urea 2 M Tiourea 4 % CHAPS (p/v) 8,5 pH	Tampón Transferencia	25 mM Tris-HCl 193 mM Glicina 20 % Metanol (v/v) 8,3 pH	Tampón Reductor DIGE	50 mM NH ₄ HCO ₃ 10 mM DTT 8,3 pH
Tampón Lisis	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 % NP-40 (v/v) 7,5 pH	TBS-T	20 mM Tris-HCl 105 mM NaCl 0,1 % Tween® 20 (v/v) 7,4 pH	Tampón Alquillante DIGE	50 mM NH ₄ HCO ₃ 55 mM IAA 8,3 pH
Fase Móvil NTs	500 mM Ácido Cítrico 0,05 mM EDTA 1,2 mM SOS 1 % ACN (v/v) 0,25 mM HClO ₄	Tampón Muestras DIGE	7 M Urea 2 M Tiourea 4 % CHAPS (p/v) 2 % DTT (p/v) 2 % Anfolitos pH 3-10 (v/v) 0,002 % ABRF (p/v) 8,5 pH	Tampón Lavado Masas (v/v)	50 mM NH ₄ HCO ₃ 8,3 pH
Tampón DPTN HPLC	0,1 mM Na ₂ S ₂ O ₅ 0,25 mM EDTA			Tampón Resuspensión Masas	25 mM NH ₄ HCO ₃ 50 % ACN (v/v) 8,3 pH
Tampón Monoaminas	150 mM Tris-HCl 70 mM EDTA 8,6 pH			Solución Lavado Masas (v/v)	30 % ACN (v/v) 0,2 % TFA (v/v)
Tampón Laemmli (4x)	2,5 mM Tris-HCl 40 % Sacarosa (p/v) 8 % SDS (p/v) 40 % β-Met (v/v) 0,04 % ABRF (p/v) 6,8 pH	Tampón Rehidratación IEF	7 M Urea 2 M Tiourea 4 % CHAPS (p/v) 100 mM DeStreak™ 1 % Anfolitos pH 3-10 (v/v) 0,002 % ABRF (p/v) 8,5 pH	Solución Resuspensión Masas (v/v)	5 % ACN (v/v) 0,1 % TFA (v/v)
Gel Separador 10 %	400 mM Tris-HCl 10 % Acrilamida (v/v) 0,1 % SDS (v/v) 0,25 % TEMED (v/v) 0,05 % PSA (v/v) 8,9 pH	Tampón Reductor IEF	100 mM Tris-HCl 6 M Urea 30 % Glicerol (v/v) 2 % SDS (p/v) 5 mg/mL DTT 0,002 % ABRF (p/v) 8 pH	Tampón Reductor SWATH	100 mM Tris-HCl 60 mM DTT 8 pH
Gel Separador 15 %	400 mM Tris-HCl 15 % Acrilamida (v/v) 0,1 % SDS (v/v) 0,25 % TEMED (v/v) 0,05 % PSA (v/v) 8,9 pH	Tampón Alquillante IEF	100 mM Tris-HCl 6 M Urea 30 % Glicerol (v/v) 2 % SDS (p/v) 22,5 mg/mL IAA 0,002 % ABRF (p/v) 8 pH	Tampón Alquillante SWATH	100 mM Tris-HCl 55 mM IAA 8 pH
				Tampón Lavado 1 SWATH	100 mM Tris-HCl 8 M Urea 8 pH
				Tampón Lavado 2 SWATH	50 mM NH ₄ HCO ₃ 8 pH

2. Determinaciones de parámetros bioquímicos:

Los distintos parámetros bioquímicos se determinaron siguiendo los protocolos recomendados por el fabricante de los kits comerciales (Tabla 2) y usando el analizador automático Olympus AU400 (Beckman Coulter, Alemania).

Tabla 2: Reactivos y kits usados en el analizador automático Olympus AU400 para determinar parámetros bioquímicos.

Parámetro	Kit comercial
Glutación peroxidasa (GPx)	GPx Ransel (Randox, Crumlin, UK)
Haptoglobina (HP)	Haptoglobin Colorimetric Assay PHASE RANGE (Tridelta, Irlanda)
Proteína C-reactiva (CRP)	C-reactive protein (Olympus System Reagent, Beckman Coulter, Alemania)
Superóxido dismutasa (SOD)	SOD RanSOD (Randox, Crumlin, UK)

3. ELISAs comerciales:

Para la cuantificación de cortisol en suero, saliva y pelo; Pig-MAP en suero; NPY, Orexina A y POMC en homogenado de hipotálamo se usaron ELISAs comerciales específicos para porcino (Tabla 3). Las lecturas de absorbancias se realizaron en el lector iEMS Reader MF (Thermo Scientific, MA, USA). Los datos se analizaron mediante el programa Ascent versión 2.6 (Thermo Scientific, MA, USA).

Tabla 3: Moléculas determinadas mediante ELISAs y las casas comerciales.

Antígeno	Kit Comercial
Cortisol Suero	Cortisol ELISA (DRG Diagnostics, Alemania)
Cortisol Saliva	Salivary Cortisol ELISA (DRG Diagnostics, Alemania)
Cortisol Pelo	Salivary Cortisol ELISA (DRG Diagnostics, Alemania)
Neuropéptido Y (NPY)	EIA porcine Anti-NPY (Phoenix Pharmaceuticals, CA, USA)
Orexina A (OrexA)	EIA porcine Anti-OrexA (Phoenix Pharmaceuticals, CA, USA)
Proopiomelanocortina (POMC)	ELISA porcine Anti-POMC (Neobiolab, MA, USA)
Pig-Major Acute Phase Protein (Pig-MAP)	Pig-MAP kit ELISA (Acuvet Biotech SL, Zaragoza, España)

4. Anticuerpos:

Los anticuerpos usados para los ensayos de *Western Blot* y *Oxyblot* (Tabla 4) se diluyeron en BSA al 5 % (p/v) en TBS-T a sus diluciones correspondientes.

Tabla 4: Los distintos anticuerpos usados en la metodología, su tipo y su casa comercial.

Anticuerpo	Tipo	Casa Comercial
Anti-MYLC2	Policlonal-Conejo	Cell Signaling (MA, USA)
Anti-Fibrinógeno	Policlonal-Cabra	Sigma (MO, USA)
Anti- β -actina	Monoclonal-Ratón	Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)
Anti-Dinitrofenil	Monoclonal-Ratón	Sigma (MO, USA)
Anti-IgG Conejo-HRP	Monoclonal-Cabra	Cell Signaling (MA, USA)
Anti-IgG Cabra-HRP	Monoclonal-Burro	Santa Cruz Biotechnology (CA, USA)
Anti-IgG Ratón-HRP	Monoclonal-Oveja	GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)

Métodos:

En este apartado se detallan las metodologías empleadas en los distintos estudios presentados. Las características únicas de cada capítulo como el diseño experimental o el análisis estadístico se explican en el apartado de resultados correspondiente.

1. Recogida de muestras:

1.1. Saliva:

Para las muestras de saliva se usaron tubos especializados para ese fin, Salivette® (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Estos tubos contienen un algodón al que, sujetándolo con pinzas, se permitió a los animales morder durante 30 s aprovechando su curiosidad innata, evitando así el posible estrés por manejo. Una vez los algodones estaban impregnados totalmente con la saliva de cada animal se devolvieron a sus tubos y se centrifugaron durante 10 min a 3000 x g, los sobrenadantes se alicuotaron y se congelaron a -80°C hasta su análisis.

1.2. Pelo:

Después del periodo de adaptación a la granja los animales fueron rapados usando una peladora eléctrica para que el posible estrés de la llegada a un nuevo ambiente no afectara a los resultados del análisis. Las muestras de pelo se recogieron de la parte superior de los cuartos traseros, parte menos propensa a ensuciarse. Los pelos se embolsaron en bolsas con autocierre hermético y fueron almacenados a 4°C hasta su análisis.

1.3. Sangre:

Se recogió por venopunción de la vena cava anterior, o aprovechando la incisión del desangrado en el caso del sacrificio, usando tubos Vacutainer de 10 mL (Eurotubo™, Deltalab, Rubí, España) para suero sin anticoagulante. La sangre se dejó coagular 30 min a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 2000 x g durante 10 min. Para las muestras de plasma se aplicó el mismo procedimiento sólo que usando los tubos Vacutainer con anticoagulante EDTA y agitando suavemente el tubo una vez obtenida la sangre antes de centrifugar. El suero y el plasma sobrenadante se alicuotó y se congeló a -80°C.

1.4. PBMC:

Se extrajo la sangre como se ha descrito anteriormente pero usando tubos especiales BD Vacutainer CPT™ que contienen heparina de sodio y un gradiente de FICOLL para poder separar células PBMC. Una vez recogida la sangre en los tubos CPT™, estos se centrifugaron a 2000 x g durante 20 min a temperatura ambiente, este paso se debe realizar antes de que pasen 2 h de la recolección de la sangre. A continuación, usando pipetas Pasteur de cristal, se separó rápidamente la capa de células PBMC (situada justo encima del gradiente de FICOLL) del plasma transfiriéndola a un tubo de 15 mL.

Seguidamente se lavaron las células PBMC añadiendo PBS hasta los 15 mL y se centrifugaron a 300 x g durante 15 min a temperatura ambiente. El PBS sobrante fue aspirado totalmente hasta dejar sólo el pellet de células PBMC.

Para evitar posibles contaminaciones por eritrocitos debido al procedimiento de obtención de las PBMC se realizó una lisis osmótica de los mismos, aprovechando su mayor sensibilidad a la baja osmolaridad. A los pellets de PBMC se les añadió 1 mL de agua destilada y se vorteo durante exactamente 30 s, pasado ese tiempo se añadió PBS hasta los 15 mL para detener el choque osmótico. Finalmente, se lavaron las PBMC tres veces más como se ha descrito anteriormente para terminar con unos pellets de PBMC limpios que se congelaron a -80°C hasta su análisis.

1.5. Áreas cerebrales:

Transcurrido un tiempo máximo de 5 min después del sacrificio, el cerebro entero era extraído del cráneo. Dependiendo del estudio se diseccionaron distintas áreas cerebrales, el orden de las disecciones siempre era el mismo, primero el hipotálamo, la corteza prefrontal, el hipocampo dorsal y ventral de un hemisferio, la amígdala del mismo hemisferio, el hipocampo dorsal y ventral y la amígdala del otro hemisferio y, por último, los cuerpos estriados. A medida que las áreas eran diseccionadas se congelaban inmediatamente en nitrógeno líquido y se mantenían a -80°C hasta su procesado. Todo este proceso duraba como máximo entre 2 y 3 minutos.

2. Preparación de extractos y homogenados:

2.1. Extracción del cortisol del pelo:

Se pesaron 150 mg de pelo y se transfirieron a tubos de 50 mL, seguidamente se añadieron 3 mL de isopropanol puro y se agitaron durante 3 min para limpiar el pelo. Se descartó el isopropanol sobrante y se dejaron secar los pelos toda la noche bajo la campana extractora. Una vez limpio el pelo se cortó con unas tijeras hasta que se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 0,5 cm.

Del pelo limpio y cortado se pesaron 50 mg en tubos de 1,5 mL provistos con cierre hermético de rosca. A continuación, se añadieron 600 µL de metanol puro a los tubos, se cerraron fuertemente con los tapones y se sellaron con "parafilm", este paso es muy importante ya que evita la evaporación del metanol.

Los tubos fueron colocados en una noria agitadora y la misma se introdujo en una estufa a 55°C donde las muestras estuvieron durante 17 h en agitación. A modo de control se añadió un tubo con 600 µL de metanol para controlar la posible evaporación.

Pasadas las 17 h se centrifugaron los tubos a 2500 x g durante 30 s para descartar los trozos de pelo y se recuperaron los 600 µL de metanol para traspasarlos a otro tubo. Finalmente, se procedió a la completa evaporación del metanol usando un roto-evaporador (Savant SPEEDVAC SVC 100H, Thermo Scientific, MA, USA). Los pellets obtenidos tras la evaporación del metanol se mantuvieron a -20°C hasta su análisis.

2.2. Preparación de extractos de PBMC para actividad enzimática:

Los pellets de células de PBMC se resuspendieron con 500 µL de *Tampón HBSS* con un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich, MO, USA). Seguidamente se sonicaron (Branson Digital Sonifier model 250, Branson Ultrasonics Corp., CT, USA) dos veces al 30 % de amplitud durante 10 s, en intervalos de 1 s, en hielo. Con estos extractos se realizaron los ensayos de actividad SOD.

2.3. Preparación de extractos proteicos de PBMC para aplicaciones proteómicas:

Para poder aplicar técnicas proteómicas con los extractos de PBMC se procedió a purificar los extractos de PBMC del *Tampón HBSS* usando y siguiendo el protocolo del kit comercial 2D-Clean-Up (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), que consiste en precipitar las proteínas del extracto para resuspenderlas posteriormente en 200 µL de *Tampón IEF* adecuado para realizar técnicas proteómicas.

2.4. Homogenados de tejido cerebral:

Los homogenados fueron preparados de tal forma que no hubiera ninguna incompatibilidad entre los diferentes ensayos realizados. Así pues, las muestras de áreas cerebrales congeladas fueron pesadas individualmente para, antes de que se descongelaran, añadir el *Tampón Lisis* con un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich, MO, USA) en una relación de 0,3 mg tejido/µL *Tampón Lisis* (esta relación es modificable en función de la cantidad de tejido disponible, ya sea aumentándola o disminuyéndola, dado que se tiene en cuenta en la cuantificación final de neurotransmisores). Además, para la determinación

de neurotransmisores, se añadió 3,4-dihidrobencilamina bromohidrato (DHBA) al *Tampón Lisis* a una concentración de 100 pg/ μ L a modo de estándar interno para la posterior cuantificación de neurotransmisores.

Manteniendo en todo momento las muestras en hielo se sonicaron dos veces al 30 % de amplitud durante 10 s, en intervalos. Finalmente, el homogenado se alicuotó y se congeló a -80°C hasta su análisis.

3. Cuantificación de la concentración de proteína:

En todos los casos las lecturas de las absorbancias se llevaron a cabo con el lector de microplacas iEMS Reader MF (Labsystems Oy, Helsinki, Finland) equipado con el programa informático Ascent versión 2.6 (Thermo Scientific, MA, USA).

3.1. Método de Bradford:

Este método se usó para cuantificar las proteínas de las muestras destinadas a técnicas de Western Blot o Slot Blot. Consiste en la detección por colorimetría usando el reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad, CA, USA) diluido 1:5 que en presencia de proteína adquiere la capacidad de absorber luz a una longitud de onda de 595 nm. Se siguieron las instrucciones del fabricante y la concentración de proteína presente en las muestras se calculó mediante una recta patrón de BSA con un rango de concentraciones de 0 a 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

3.2. Método RcDc:

El método fue empleado para cuantificar la concentración de proteína para los experimentos de proteómica, ya que comprende unos pasos previos de precipitación de proteínas para eliminar posibles interferencias. Se siguieron las instrucciones del fabricante (RcDc Protein Assay Kit, Bio-Rad, CA, USA) y se determinó la concentración de proteína en las muestras mediante una recta patrón de BSA con un rango de concentraciones de 0 a 1,5 mg/mL.

3.3. Método BCA:

Este método también fue empleado para cuantificar la concentración de proteína para los experimentos de proteómica. Combina la reacción de reducción de Cu^{+2} a Cu^{+1} que se produce en un medio alcalino en presencia de proteínas con un método colorimétrico de detección del Cu^{+1} por ácido bicinconínico. Se siguieron las instrucciones del fabricante (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, MA, USA) y se determinó la concentración de proteína en las muestras mediante una recta patrón de BSA de rango 0-200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

4. Determinaciones por HPLC:

4.1. Sistema HPLC:

Se usaron para dos tipos de compuestos distintos, la determinación de neurotransmisores por un lado y la de aminoácidos por el otro. El sistema de HPLC era el mismo en ambas técnicas Elite LaChrom (Merck, Hitachi, Japón), con una bomba Hitachi L-2130 (Hitachi, Japón), inyector automático Autosampler Hitachi L-2200 (Hitachi, Japón) con refrigeración a 10°C y un horno para la columna Column Oven Hitachi L-2300 (Hitachi, Japón). Para la detección de neurotransmisores se acopló al HPLC un detector electroquímico (ESA Coulochem II 5200, MA, USA) mientras que para detectar aminoácidos se acopló un detector de espectroscopia Ultravioleta-Visible Hitachi L-2420 (Hitachi, Japón).

4.2. Procesado de los homogenados cerebrales para HPLC:

Una de las alícuotas de homogenado cerebral se reservó para la determinación de neurotransmisores. Antes de inyectar las muestras al HPLC se deben desproteínizar, para ello se añadió a las muestras en una relación 2/1 (v/v) el *Tampón DPRTN HPLC*. Justo después se mezclaron intensamente usando un vórtex y se mantuvieron en hielo.

Previo a la inyección, se centrifugaron las muestras ya desproteínizadas a 16000 x g durante 10 min a 4°C. Finalmente se inyectaron 20 µL de los sobrenadantes al HPLC para la determinación de los neurotransmisores.

4.3. Separación y cuantificación de neurotransmisores:

Se siguió el método de Sabrià et al. (2003)⁸¹ con modificaciones descritas por Arroyo et al. (2016)⁸⁰.

Para separar las distintas monoaminas (NA, Adren, DA y 5-HT) y sus metabolitos (L-DOPA, HVA, DOPAC y 5-HIAA) se utilizó una columna Chromolith Rp-18e 100 x 4,6 mm (Merck KgaA, Darmstadt, Alemania).

El método consiste en una *Fase Móvil NTs* usada isocráticamente a un flujo de 1 mL/min con el voltaje de la celda de detección electroquímica fijado a 400 mV.

Para la cuantificación de las monoaminas y sus metabolitos se usaron estándares de cada compuesto a concentraciones que iban desde 9,375 a 1000 pg/µL para crear una recta patrón a partir del área del pico. Las rectas patrón tenían un coeficiente de regresión lineal (R^2) $\geq 0,990$. La validación del método mostró una precisión inter-intradía ≤ 4 % y un límite de detección entre 2,14 y 4,97 pg/µL para los distintos neurotransmisores (Arroyo et al. 2016).

4.4. Procesado de plasmas sanguíneos para HPLC:

Para realizar el análisis de monoaminas o aminoácidos en el plasma se requieren unos procesamientos específicos previos a su determinación por HPLC.

4.4.1. Determinación de monoaminas en plasma:

La determinación de monoaminas en plasma requiere un proceso de extracción previo a su análisis por HPLC. Este proceso se basó en la metodología de Caroldi et al. 1985⁸² que usa alúmina para la extracción de las monoaminas. A partir de estas muestras se determinaron la NA y la adrenalina (Adren) en el plasma.

4.4.1.1. Activación de alúmina:

La alúmina u óxido de aluminio (Al_2O_3) necesita activarse para adquirir la propiedad de captación de monoaminas. Así pues, la alúmina se activó mediante varios lavados con HCl 2N aplicando temperatura. El primer lavado se realizó a 90°C durante 45 min, seguidamente dos lavados a 70°C durante 10 min, el último a 50°C durante 10 min, cuando pasaba el tiempo de cada lavado y la alúmina sedimentaba se descartaba el HCl sobrenadante.

Finalmente, se lavó repetidamente la alúmina con agua destilada hasta que el pH de la suspensión era de 3,4. Una vez alcanzado ese pH se descartó el agua destilada sobrenadante y la alúmina se secó durante toda la noche (ON) a 120°C.

4.4.1.2. Extracción de monoaminas del plasma:

Se añadieron 100 μL de plasma a 10 mg de alúmina activada en tubos de 1,5 mL, seguidamente se añadieron 500 μL del *Tampón Monoaminas* con DHBA (estándar interno) a una concentración final de 100 $\text{pg}/\mu\text{L}$. Las mezclas se incubaron a temperatura ambiente (RT) durante 30 min en un agitador orbital para tubos de 1,5 mL. Pasado ese tiempo se centrifugaron a 300 x g durante 1 min a RT descartando el sobrenadante. Seguidamente se lavaron los pellets dos veces con agua destilada (mezclando y centrifugando entre lavados). A continuación, para extraer las monoaminas contenidas en la alúmina, se añadieron 100 μL del *Tampón DPRTN HPLC* y se vortearon intensamente durante 30 s. Finalmente, se centrifugaron a 300 x g durante 1 min y se inyectaron 20 μL del sobrenadante al HPLC para el análisis.

4.4.2. Determinación de aminoácidos en plasma:

Tal y como sucede con el homogenado de tejido cerebral es necesaria una desproteinización del plasma antes de poder inyectarlo al HPLC. En el caso de los plasmas, se partieron de 100 μL a los que se les añadieron 10 μL de DTT a 10 mM (concentración final 0,9 mM) y 5,79 μL de GABA a 2,5 mM (concentración final 125 μM) a modo de estándar interno. Se vortearon y se les añadió un

volumen de ácido sulfosalicílico al 10 % (p/v) para precipitar las proteínas. Rápidamente se volvió a vortear y se centrifugaron a 14000 x g durante 10 min a 4°C. Para terminar, se recuperó el sobrenadante para la posterior derivatización de los aminoácidos libres.

4.4.2.1. Reacción de derivatización de los aminoácidos:

Para poder detectar los distintos aminoácidos mediante espectroscopia ultravioleta es necesaria una reacción previa de derivatización en la que al aminoácido se le unirá covalentemente una molécula que presenta absorbancia a longitudes de onda ultravioleta. En el mercado existen un amplio abanico de moléculas con estas características, pero por su mayor estabilidad en el tiempo y eficiencia de reacción se optó por AQC (6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato). La reacción de derivatización (Figura 10) se realizó a una temperatura de 55°C y en un medio básico (pH 8-9) en el cual se produce un ataque nucleofílico por parte del grupo α -amino del aminoácido al grupo carbonilo del carbamato. A raíz de esta reacción rápida se obtiene el aminoácido derivatizado (unido a AMQ (6-aminoquinolina)) que tendrá una absorbancia a 254 nm, AMQ solo correspondiente al AQC sobrante que lentamente se hidroliza y, además, N-hidroxisuccinimida (NHS) que no interfiere en el análisis.

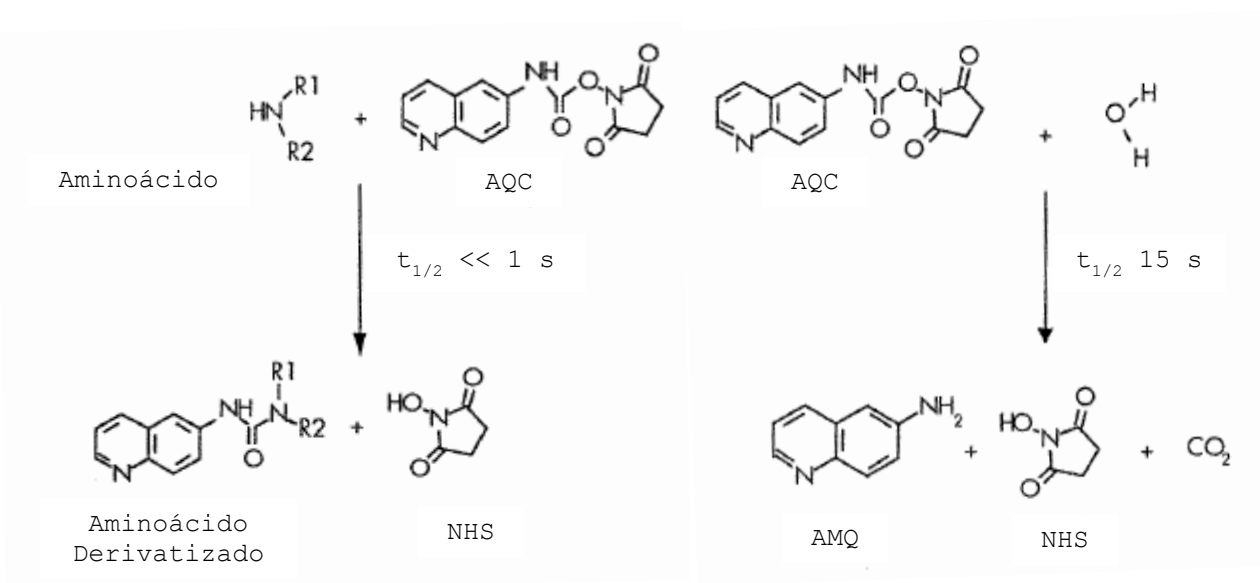


Figura 10: Esquema de la reacción de derivatización de los aminoácidos. AQC: 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato. NHS: N-hidroxisuccinimida. AMQ: 6-aminoquinolona.

Para realizar la reacción de derivatización se siguieron las instrucciones del fabricante del kit (AccQ Fluor Reagent Kit, Waters, MA, USA), donde primero se resuspendió el vial con el reactivo de derivatización liofilizado con 1 mL de ACN a 55°C durante 10 min. Seguidamente, en un tubo de 1,5 mL se mezclaron 70 μL del tampón borato suministrado en el kit con 10 μL de muestra o estándar y 20 μL del reactivo de derivatización resuspendido. Se vorteoó el conjunto y se incubó a 55°C durante 10 min. Pasado ese tiempo, se mantuvieron las muestras o

estándares a 4°C (no más de dos semanas) hasta que finalmente se inyectaron 10 µL al HPLC para su análisis.

4.4.2.2. Separación y cuantificación de aminoácidos:

Se puso a punto la técnica de separación y cuantificación de aminoácidos partiendo del protocolo descrito en Castellanos et al. 2016 con algunas modificaciones. Se utilizó una columna de fase reversa (Pico-Tag 300 x 3,9 mm, Waters, MA, USA) que permitió la separación de 18 aminoácidos proteínogénicos (Asp, Ser/Asn, Glu, Gly, His/Gln, Arg, Thr, Ala, Pro, Cys, Tyr, Val, Met, Lys, Ile, Leu, Phe y Trp) además del GABA. Sin embargo, *a posteriori* se optimizó la separación de los aminoácidos mediante una fase móvil no comercial, la metodología de esta optimización se muestra en el Apéndice 1.

A diferencia de la separación de neurotransmisores, para la separación de los aminoácidos fueron necesarias dos fases móviles (una polar para la retención de los aminoácidos en la columna y la otra apolar para eluirlos) y crear un gradiente para una elución óptima de los aminoácidos. La primera fase móvil consistió en una dilución 1:10 del producto comercial AccQ-Tag Eluent A Concentrate (Waters, MA, USA) y la otra fase móvil (el eluyente) consistió en una solución de 60 % de ACN en H₂OMQ (v/v). El flujo y la temperatura de trabajo fueron 1 mL/min y 28°C, la longitud de onda del detector de UV-Vis empleada para la detección de los aminoácidos fue de 254 nm.

Durante la puesta a punto del método se testaron distintos gradientes de elución hasta conseguir la separación más óptima posible de los aminoácidos (Tabla 5), no obstante, hubo dos pares de aminoácidos que coeluían (Ser/Asn y His/Gln) y, a pesar de los distintos gradientes testados, no se consiguió separarlos.

Tabla 5: Método del gradiente entre fases móviles para la separación cromatográfica de los aminoácidos.

Tiempo (min)	Fase Móvil 1:10 (%)	ACN 60 % (%)
0	100	0
0,5	98	2
20	93	7
32	91	9
40	82	18
47,5	79	21
55	60	40
60	0	100
75	0	100
76	100	0
91	100	0

Una vez establecido el método de gradiente se validó con estándares de aminoácidos de 7,8125 a 500 µM. El análisis de la regresión mostró una correlación excelente para todos los aminoácidos $R^2 \geq 0,990$. La precisión inter-intradía fue menor del 5 %. Los límites de detección estaban en un rango entre 0,091 y 7,076 µM para los distintos aminoácidos.

5. Western Blot y Oxyblot:

5.1. Electroforesis SDS-PAGE:

Los geles de poliacrilamida de tamaño 10 x 8 x 1,5 cm se polimerizaron usando los moldes para geles en gradiente Hoefer Multiple Gel Caster SE275 (Hoefer Scientific Instruments, MA, USA), una bomba peristáltica (LKB Bromma 2232 Microperpex S, Bromma, Suecia) y un mezclador de gradiente (Hoefer Scientific Instruments, MA, USA). En el *Gel Separador* se formó un gradiente de acrilamida que iba del 10 al 15 % y un 4 % de acrilamida para el *Gel Apilador*.

Se cargaron en el gel 9 µg de proteína de los extractos proteicos de PBMC previamente calentados durante 5 min a 95°C en una disolución 1:4 con *Tampón Laemmli*. Se montaron los geles en las cubetas (Hoefer Mighty Small II SE260, Hoefer Scientific Instruments, MA, USA) y se corrieron en *Tampón Electroforesis* a 100 V hasta que el frente entraba en el gel separador, cuando el frente había entrado se subió el voltaje a 120 V y se mantuvo así durante aproximadamente 2 h, hasta que el frente quedaba a 1 cm antes del final del gel.

5.2. Western Blot:

Las proteínas separadas en los geles se transfirieron a membranas, previamente activadas con metanol, de fluoruro de polivinilideno (PVDF) usando un sistema semi-seco (Trans-Blot SD Semy-Dry Transfer Cell, Bio-Rad, CA, USA) humedecido con *Tampón Transferencia*. Las transferencias se realizaron a un amperaje fijo de 150 mA durante 75 min.

Una vez transcurrido ese tiempo las membranas se bloqueaban con una solución al 5 % (p/v) de leche en polvo desnatada disuelta en *TBS-T* durante 1 h a RT. Seguidamente, las membranas se lavaron 3 veces durante 5 min con *TBS-T* y se incubaron ON a 4°C en agitación con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 6).

Al día siguiente se volvieron a lavar las membranas 3 veces durante 5 min con *TBS-T*, se incubaron durante 1 h en agitación esta vez con el anticuerpo secundario adecuado (Tabla 6) y se lavaron de nuevo como se ha descrito anteriormente.

Tabla 6: Diluciones de los anticuerpos primarios y secundarios en BSA 5 % (p/v) con *TBS-T* usadas en *Western Blot*.

Antígeno Primario	Dilución Anticuerpo Primario	Antígeno Secundario	Dilución Anticuerpo Secundario
Fibrinógeno	1:1000	Anti-IgG Cabra-HRP	1:6000
MYLC2	1:1000	Anti-IgG Conejo-HRP	1:5000
β-Actina	1:5000	Anti-IgG Ratón-HRP	1:250000
DNP	1:25000	Anti-IgG Ratón-HRP	1:8000

Las proteínas transferidas que presentaban inmunoreacción fueron detectadas y visualizadas mediante quimioluminiscencia con el reactivo ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) en el sistema de visualización LAS-3000 (Fujifilm Corporation, Tokyo, Japón).

Para analizar y densitometrar las bandas proteicas detectadas se usó el programa informático Multi Gauge (Fujifilm Corporation, Tokyo, Japón). Con la intención de minimizar las variaciones inter-gel, los ensayos se realizaron por triplicado y, además, los valores de densitometría obtenidos de las muestras fueron normalizados con los valores de densitometría de β -actina de la misma muestra o, como en el caso del Oxyblot, calculando los ratios entre valores de densitometría de la misma muestra.

5.3. Oxyblot mediante Slot Blot:

Esta técnica permite detectar grupos carbonilo de las proteínas que se forman en presencia de especies reactivas de oxígeno. Para detectar dichos grupos se optó por la metodología de Robinson et al. 1999 que consiste en derivatizar los grupos carbonilo con hidrazinas, (2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH)), formando compuestos de hidrazonas, en este caso 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP), que son detectables mediante distintas técnicas, siendo una de ellas la inmunodetección.

Usando el soporte *slot blotter* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) se cortó a medida una membrana de PVDF, previamente activada con metanol, y se montó el conjunto para proceder a realizar el ensayo de Oxyblot. Se aplicaron en los pocillos 0,5 μ g de proteína de los extractos proteicos de PBMC, llevadas a un volumen final de 100 μ L para todas las muestras. Una vez cargadas las muestras, se incubaron durante 20 min a RT para adherir las proteínas a la membrana de PVDF. Pasado ese tiempo se aplicó el vacío para terminar la transferencia de las proteínas en la membrana. Seguidamente, se desmontó el *slot blotter* y se procedió a derivatizar la membrana.

Primero se limpió la membrana 1 min cada vez con metanol puro, *Tampón de Transferencia* y HCl 2 N, secuencialmente. A continuación, se derivatizó la membrana en una solución al 10 mM de DNPH disuelto en HCl 2 N durante 5 min exactos. Para terminar la derivatización, se lavó la membrana dos veces con HCl 2 N durante 5 min y tres veces con *TBS-T* durante 5 min.

La membrana se bloqueó durante 1 h a RT con una solución al 5 % (p/v) de leche en polvo desnatada disuelta en *TBS-T* y se incubó con el anticuerpo primario ON a 4°C. La metodología de revelado es la misma descrita anteriormente para el *Western Blot*.

6. Técnicas Proteómicas:

Con el fin de estudiar los efectos que las distintas condiciones estudiadas tenían sobre el proteoma de las PBMC o del hipocampo se realizaron dos técnicas de proteómica para sendos tipos de muestras.

6.1. Differential in gel electrophoresis (DIGE):

El DIGE es una técnica de proteómica en geles de acrilamida de dos dimensiones donde se marcan las proteínas de las muestras con distintos fluorocromos, uno por condición, y se separan dentro de un mismo gel bidimensional. De esta forma se pueden observar diferencias en la abundancia en las proteínas entre las condiciones analizadas sin la variabilidad inherente a trabajar con geles distintos. La concentración de proteína de los extractos de PBMC se cuantificó usando el método R_cD_c descrito en el apartado 3.2.

6.1.1. Marcaje de muestras:

Este estudio se realizó en colaboración con el Servei de Proteòmica de Vall d'Hebrón.

En primer lugar, se comprobó que las muestras de los extractos proteicos de PBMC, ya en la *Tampón de IEF*, estuvieran a pH = 8,5 dado que es menester que esté al pH correcto para que la reacción de marcaje con fluorocromos sea óptima.

El marcaje se realizó siguiendo la metodología de Alban et al. 2003. Así pues, a 50 µg de proteína de los extractos de PBMC se añadieron los fluorocromos de cianina Cy3 o Cy5 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) en una relación de 400 pmol fluorocromo/50 µg proteína y se incubó la mezcla en hielo y a oscuras durante 30 min. Para detener la reacción se añadió L-lisina a 10 mM y se incubó otros 10 min también en hielo y a oscuras. Cada condición se marcó con un fluorocromo distinto, Cy3 o Cy5, y para evitar un posible sesgo en el marcaje se cruzaron las condiciones con Cy3 y Cy5.

A modo de estándar interno se juntaron todas las muestras del ensayo hasta una cantidad total de 50 µg de proteína y se marcó con Cy2 siguiendo el mismo método descrito con anterioridad.

Las muestras ya marcadas se combinaron de acuerdo con el diseño cruzado para que hubiera 50 µg de proteína/Cy/gel, además se ajustaron todas al mismo volumen, 150 µL, añadiendo *Tampón de muestras DIGE*.

6.1.2. Primera dimensión (Isoelectroenfoque):

Una vez preparadas las muestras se procedió a acondicionar las tiras para el isoelectroenfoque. Las tiras IPG de 24 cm con gradiente lineal de pH 3-10 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) se rehidrataron ON en 450 μ L de *Tampón de Rehidratación IEF*.

El isoelectroenfoque se corrió en el sistema Ettan IPGphor (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), cargando todo el volumen de las muestras (150 μ L) en el lado más ácido de las tiras IPG usando copas de carga y aplicando un enfoque total de 68 kV/h.

Una vez finalizado el isoelectroenfoque, las tiras IPG se equilibraron antes de seguir con la segunda dimensión. Así pues, las tiras IPG se desmontaron del sistema para isoelectroenfoque y se incubaron primero con 6 mL/tira IPG de *Tampón Reductor IEF* durante 15 min en agitación y luego con 6 mL/tira IPG de *Tampón Alquilante IEF* otros 15 min en agitación, lavando con H_2O entre incubaciones y al final del equilibrado.

6.1.3. Segunda dimensión (SDS-PAGE):

Las tiras IPG equilibradas se montaron en geles reductores al 12,5 % de acrilamida previamente polimerizados en cristales de baja fluorescencia de 24 x 20 x 1,5 cm. Los geles con las tiras IPG se corrieron en el sistema Ettan DALTsix (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) a una temperatura de 20°C y a una potencia inicial de 2,5 W/gel durante 30 min, seguido de una potencia constante de 17 W/gel hasta que el azul de bromofenol llegara al final del gel.

6.1.4. Visualización:

Los geles bidimensionales fueron escaneados usando el sistema Typhon 9400 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) con las longitudes de onda emisión/excitación recomendadas para cada fluorocromo, Cy2 488/520 nm, Cy3 532/580 nm y Cy5 633/670 nm. La resolución aplicada en los escaneos fue 100 μ M en todos los casos.

6.1.5. Análisis y cuantificación estadística:

Las imágenes de los geles se superpusieron digitalmente usando el programa informático Progenesis SameSpots versión 4.5 (NonLinear Dynamics, Newcastle, UK) y se cuantificaron las intensidades de los *spots* proteicos obtenidos normalizándolas con las intensidades de los estándares internos Cy2. Además, el mismo programa hizo las comparaciones por pares de las condiciones de estudio y análisis de varianza (ANOVA) obteniendo los p-valores y los *Fold-Change* para todos los *spots* viables presentes en los geles.

6.1.6. Selección y tripsinización de spots:

Un gel bidimensional representativo del ensayo fue fijado durante 24 h en *Solución de Fijación* y, posteriormente, teñido durante 3 h a RT y a oscuras con 10 % (v/v) de Flamingo®. El gel teñido fue marcado para obtener las coordenadas de los *spots* y escaneado usando Typhon 9400 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) a 532 nm.

Los *spots* situados en los márgenes del gel fueron descartados y sólo los *spots* que presentaban un *p*-valor $\leq 0,050$ y un Fold-Change $\geq 1,50$ fueron seleccionados para su identificación. Una vez seleccionados los *spots*, se recortaron del gel mediante el sistema Ettan Spots Picker (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) que los situó individualmente en pocillos en una placa Microtiter de 96 pocillos en "V" (Greiner Bio-one, Kremsmünster, Austria) y se procedió a su digestión triptica.

En el primer paso, se destiñeron los *spots* con dos lavados de 15 min a RT con *Tampón de Desteñido DIGE*. Seguidamente, se volvieron a hacer las reacciones de reducción y alquilación con 100 μ L de sendas soluciones, durante 1 h a 56°C en *Tampón Reductor DIGE* y durante 30 min a RT y a oscuras en *Tampón Alquilante DIGE*. Para terminar este paso se volvieron a lavar dos veces durante 15 min con *Tampón de Lavado DIGE*. Pasados los tiempos de cada lavado o reacción se descartaba el tampón con cuidado de no perder los fragmentos de los *spots*.

El segundo paso consistió en deshidratar los *spots* con dos lavados de 20 min a RT en *Tampón de Deshidratación DIGE*, seguido de un último lavado con ACN puro de 10 min a RT y, pasado ese tiempo, se retiró el ACN dejando secar los pocillos hasta la completa evaporación del mismo.

Por último, se añadió 15 μ L de tripsina (Trypsin Gold MS Grade, Promega Biotech, Madrid, España) a 0,2 μ g/ μ L en 25 mM de bicarbonato de amonio pH 8,3 y se dejó incubando ON a 30°C en agitación. Terminada la incubación, se sonicó en baño para homogenizar el conjunto, se añadió 15 μ L de *Tampón de Lavado Masas* y se volvió a sonicar. Antes de inyectar los péptidos al espectrómetro de masas se evaporaron completamente las muestras en roto-evaporador (Savant SPEEDVAC SVC 100H, Thermo Scientific, MA, USA).

6.1.7. Espectrometría de masas e identificación de proteínas:

Los péptidos tripticos se resuspendieron añadiendo 22 μ L de *Solución de Resuspensión Masas* y sonicando en baño. Ya resuspendidos se inyectaron 18 μ L al espectrómetro de masas ESI LTQ Velos-Orbitrap (Thermo Scientific, MA, USA) equipado con un sistema nano-HPLC (Proxeon, Odense, Denmark). Los espectros de fragmentación MS/MS (200 ms, 100-2800 m/z) de los 20 iones más intensos, detectados a 500 ms con un filtro entre 300-1500 m/z, fueron aislados usando un tiempo de exclusión dinámica de 20 s por precursor, descartando, además,

iones con una sola carga. Los precursores seleccionados se escanearon al Orbitrap a una resolución de 30000 FWHM. Los espectros MS/MS fueron obtenidos del analizador LTQ Velos usando una energía de colisión relativa de 35 eV y un filtro de una intensidad de 1000 contajes.

La búsqueda de los péptidos identificados se realizó usando el programa informático ProteinScape versión 3.1 (Bucker, Bremen, Alemania) transformando los archivos de identificación al formato genérico "mascot generic files" (.mgf) con el programa Proteome Discoverer versión 1.4 (Thermo Scientific, MA, USA). Los parámetros de la búsqueda se fijaron en una tolerancia de masa y fragmento de 10 ppm y 0,5 Da respectivamente, proteólisis con tripsina permitiendo hasta 2 cortes no específicos y modificaciones de oxidación de metionina y carbamidometilación de cisteína.

Como bases de datos para la búsqueda se usaron los proteomas de *Sus scrofa* y *Other mammalia* ambos de la base de datos de UniProt.

6.2. SWATH-MS DIA:

La técnica SWATH-MS DIA (*Sequential Window Acquisition of all Theoretical Mass Spectra Data Independent Acquisition*) es una técnica proteómica que permite una detección cuantitativa de todos los péptidos presentes en un homogenado. Esto se debe a que no hay una selección previa de iones por su m/z, sino que todos los iones dentro de una ventana de rango m/z seleccionada en el primer MS pasa a fragmentarse en el segundo MS. Este proceso se repite hasta cubrir todo el espectro de masas. Sin embargo, esta técnica requiere una librería construida con muestras del mismo tipo, o directamente las mismas, analizadas con una identificación por MS/MS o DDA (*Data Dependent Acquisition*).

Este estudio se realizó en colaboración con la Dra Emøke Bendixen (Department of Molecular Biology and Genetics Protein Science, Aarhus University, Denmark).

6.2.1. Procesado de las muestras:

Las proteínas presentes en el homogenado de hipocampo fueron cuantificadas usando el método BCA como se ha descrito en el apartado 3.3.

El volumen de las muestras correspondiente a 100 µg de proteína fue llevado hasta 100 µL con Tris-HCl 100 mM pH 8 para empezar con la reducción de las proteínas. Se añadieron 10 µL de *Tampón Reductor SWATH* y se incubaron a 56°C durante 45 min. Pasado ese tiempo se procedió a la alquilación añadiendo otros 10 µL de *Tampón Alquilante SWATH* y se incubaron durante 30 min a RT y a oscuras.

Una vez las proteínas estaban reducidas y alquiladas se traspasaron a un filtro de tubos de 1,5 mL de 10 kDa (VWR International, PA, USA) y se centrifugaron a 13000 x g durante 30 min descartando el volumen filtrado.

Los pellets retenidos en los filtros se lavaron dos veces con 100 µL de *Tampón de Lavado 1 SWATH* resuspendiendo el pellet con la punta de la pipeta cuidadosamente y centrifugando a 13000 x g durante 30 min entre cada lavado. Para terminar, se lavaron una última vez con 110 µL *Tampón de Lavado 2 SWATH* y se volvieron a centrifugar descartando de nuevo el volumen filtrado.

Siguiendo con el procesado de las muestras, se procedió a la tripsinización de las mismas. Para ello se añadieron en los pellets de los filtros 100 µL de *Tampón de Lavado 2 SWATH* junto con 4 µL de tripsina (Sigma-Aldrich, MO, USA) a 1 µg/µL, se resuspendieron los conjuntos cuidadosamente usando la punta de pipeta y las mezclas se incubaron a 37°C ON. Al día siguiente, se centrifugaron los tubos a 13000 x g durante 30 min y esta vez se guardó el volumen filtrado para su posterior inyección al espectrómetro de masas.

6.2.2. Creación de la Librería a partir de ensayos DDA:

En la técnica de SWATH-MS DIA es indispensable la creación de una librería previa para poder analizar los resultados ya que la cantidad de información que se obtiene de las muestras es muy grande. La librería se construye a partir de muestras del mismo tejido a analizar provenientes del mismo ensayo o de otros, teniendo en cuenta que cuanto mayor sea la cantidad de muestras empleadas para crearla mejor y más completa será la base de datos. En este caso se usaron las mismas muestras del ensayo complementadas con muestras cerebrales analizadas con anterioridad (6 muestras del ensayo más 6 muestras anteriores).

Los péptidos tripticos presentes en las muestras se diluyeron hasta llegar a una concentración de 1 µg/µL y, para poder comparar los tiempos de retención de los péptidos entre muestras individualmente, se les añadió a todas ellas péptidos sintéticos (Indexed Retention Time peptides (iRT) Biognosys, Schlieren, Suiza) con tiempos de retención conocidos en una relación 1:25 (v/v).

Seguidamente, se inyectaron 5 µL al espectrómetro de masas 6600 Triple-TOF (AB Sciex, MA, USA) donde primero se separaron los péptidos mediante dos columnas en el sistema de cromatografía líquida Eksigent NanoLC 415 (AB Sciex, MA, USA) unido al 6600 Triple-TOF. La primera columna que separaba los péptidos era YMC-Triart C18 0,5 x 50 mm (YMC, Kyoto, Japón). La segunda, la analítica, era YMC 0,3 x 150 mm (YMC, Kyoto, Japón).

Una vez eluidos de las columnas los péptidos fueron cargados y vaporizados con el isoelectrospray DuoSpray Ion Source (AB Sciex, MA, USA). El Triple-TOF fue puesto en modo DDA con alta resolución del escáner TOF-MS en un rango fijo de

masas entre 400-1250 m/z, con un tiempo de acumulación de 0,25 s y con un máximo de 30 iones candidatos por ciclo de productos de iones escaneados.

Para la creación de la librería los archivos provenientes del análisis de las 12 muestras fueron introducidos en el programa informático ProteinPilot versión 5.0.1.0 y se procedió a hacer una identificación con el proteoma de *Sus scrofa* de la base de datos UniProt a la que se añadió la información de los péptidos sintéticos iRT. Los parámetros de la búsqueda se fijaron en un nivel de confianza $\leq 0,050$ (equivale a 1 % FDR a nivel de péptido), alquilación de cisteína con 2-yodoacetamida y proteólisis con tripsina.

6.2.3. Detección en SWATH-MS DIA:

Se inyectaron 5 μ L de las muestras del estudio, procesadas como se ha descrito anteriormente, al espectrómetro de masas Triple-TOF 6600. El espectrómetro de masas usado fue el mismo que para los ensayos de DDA sólo que se cambiaron los parámetros para una determinación DIA. Así pues, en vez de un rango fijo de masas para el TOF-MS se usó el escaneo de productos de iones en bucle con 100 ventanas de escaneo consecutivas entre 400-1250 m/z con un solapamiento de 1 m/z entre ventanas. El tiempo de acumulación se volvió a fijar a 0,25 s, pero el escaneo de iones en vez de ser un valor fijo se configuró a un tiempo de 25 ms (modo alta sensibilidad) resultando en un tiempo final de 2,8 s por ciclo.

6.2.4. Análisis de datos:

La librería creada con las muestras analizadas con DDA se introdujo en el programa informático libre Skyline versión 4.1.0.11714 y se creó una recta patrón con los tiempos de retención de los péptidos sintéticos iRT teóricos con los obtenidos en el análisis DIA, obteniendo un R^2 de 0,99. Esta recta se usará para la posterior identificación de los péptidos presentes en las muestras.

Previo a la identificación de proteínas se usaron varios filtros necesarios para una correcta identificación, el primero fue la propia librería creada, de modo que al introducir el proteoma completo de *Sus scrofa* si el péptido no se encontraba en la librería el programa Skyline lo descartaba. El segundo filtro consiste en el filtrado del proteoma de *Sus scrofa* por péptidos trípticos proteotípicos de cada proteína. Así pues, el programa Skyline elimina todos los péptidos redundantes presentes en las proteínas, evitando identificaciones o cuantificaciones cruzadas de proteínas distintas.

Después de aplicar todos los filtros al proteoma de *Sus scrofa* se introdujeron en el programa los parámetros técnicos del ensayo y se procedió a la identificación manual de los péptidos trípticos proteotípicos mediante los cromatogramas obtenidos del espectrómetro de masas. Los criterios para la

identificación manual fueron: para poder identificar un péptido éste debe tener mínimo un 0,90 de ratio de similitud con el péptido de la librería (dotp) y para identificar una proteína se debe haber identificado 2 o más péptidos proteotípicos de la misma.

Siguiendo estas directrices se obtuvieron las intensidades integrando las áreas de los picos provenientes de las seis últimas transiciones "y" de cada péptido, siendo el sumatorio de todas las intensidades la intensidad relativa final de cada proteína presente en las muestras.

6.3. Análisis bioinformático:

Para poder interpretar los resultados de la identificación de proteínas obtenidos a partir de espectrometría de masas es indispensable contar con programas que cataloguen y caractericen las distintas proteínas identificadas. Independientemente de la técnica proteómica aplicada, este análisis bioinformático es necesario para poder analizar el sentido biológico de las proteínas identificadas y, posteriormente, discutir qué repercusión biológica tienen los cambios en la abundancia de las proteínas identificadas. Para analizar los grandes grupos de proteínas obtenidas en los estudios proteómicos se usaron, en este caso, programas informáticos con bases de datos de libre acceso en internet.

Las identificaciones se realizaron usando bases de datos de proteínas de UniProt (www.uniprot.org). Las caracterizaciones de las proteínas en Gene Ontology (GO) por su función, proceso biológico en el que participan o su distribución celular se hicieron introduciéndolas en PANTHER versión 13.1 (www.panther.org). Mientras que las redes de interacción entre proteínas se hicieron usando STRING versión 10.0 (www.string-db.org).

Los diagramas de Venn se realizaron con el programa informático gratuito FunRich (www.funrich.org) usando las bases de datos de proteomas de UniProt como referencia para catalogar las proteínas.

Resultados

"La ciencia se construye a partir de aproximaciones que gradualmente se acercan a la verdad". **Isaac Asimov**

Capítulo 1: Efecto del estrés y la relación humano-animal en la inmunofisiología y el proteoma de PBMC del cerdo

1. Diseño experimental:

Este estudio constó de 56 cerdas cruce de *Landrace* x *Large White* x *Piétrain* libres del gen halotano provenientes de madres de la misma granja comercial. A las 9 semanas de vida las cerdas fueron trasladadas a la granja experimental de IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària, Monells, Girona) donde se estabularon aleatoriamente en dos salas con cuatro corrales cada una, resultando en siete animales por corral. Los corrales, de medidas 5 x 2,7 m, tenían suelos listados de madera, condiciones de luz natural y una temperatura ambiente constante de 22±3°C. Además, estaban provistos de bebederos de acero inoxidable (15 x 16 cm) conectados a un chupete también de acero inoxidable, comederos de hormigón (58 x 34 cm) con cuatro espacios de alimentación. Las cerdas disponían de agua y alimento *ad libitum* y se les dio acceso a cadenas como material para enriquecimiento ambiental. Este estudio fue aprobado por IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) de IRTA y durante todo el estudio las cerdas fueron inspeccionadas diariamente, donde no fue reportado ningún problema de salud durante el periodo experimental. El cronograma del diseño experimental se muestra en la Figura 11.

A las 17 semanas de vida, las cerdas de cada corral se mezclaron aleatoriamente creando nuevos grupos en los corrales, una semana después se recogieron muestras (t0) de sangre, saliva y pelo. Tres días después de la recogida de muestras (t0) empezaron los tratamientos de manejo.

Las cerdas de una de las salas recibieron un manejo positivo (PH, "positive handling") mientras que las de la otra sala recibieron un manejo negativo (NH, "negative handling"). Los manejos fueron llevados a cabo por el mismo técnico especializado que entraba entre las 9:00 y 17:00 en las salas una vez al día, cinco días a la semana durante 30 min. La hora de entrada a las salas, el orden de las salas y de los corrales a los que se aplicaba el manejo fue elegido aleatoriamente cada día.

El tratamiento PH consistía en una entrada en la sala tranquila y lenta dejando que las cerdas se dieran cuenta de su presencia. Después de 1 min el técnico entraba al primer corral despacio y rodeando el perímetro del mismo, se apostaba en una esquina del corral poniéndose de cuclillas durante 5 min acariciando gentilmente la cabeza, hocico y lomo de los animales que se acercaban. Pasado ese tiempo, el técnico intentaba acercarse a los animales con los que aún no había interactuado evitando comportamientos de huida de los mismos.

Por otro lado, el tratamiento NH consistía en entrar en la sala bruscamente y gritando. Dentro del corral el técnico se situaba en medio y aplicaba uno de los cinco tipos de interacción negativa en todos los animales. Las interacciones negativas eran rociar con agua a presión, disparar aire comprimido, hacer sonar una bocina sorpresivamente, inmovilización y aislamiento momentáneo. Para evitar que los animales se acostumbraran a la interacción cada día se hacía una distinta y cada semana se decidía aleatoriamente el orden del tipo de interacción negativa.

Pasados dos meses con los tratamientos de manejo, a las 26 semanas de vida, se hizo la segunda recogida de muestras (t2) también de sangre, saliva y pelo. A la siguiente semana las cerdas fueron transportadas al matadero experimental de IRTA (viaje de 1,2 Km) donde fueron aturridas por exposición a 90 % CO₂ durante 3 min y posteriormente desangradas por incisión yugular.

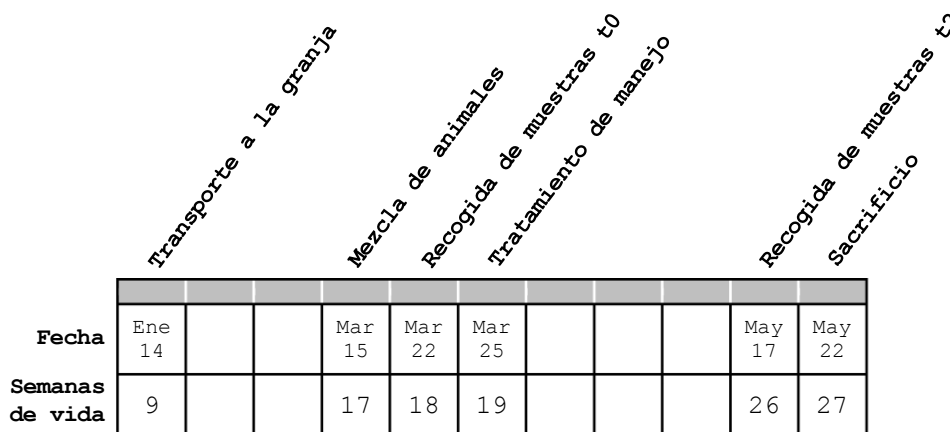


Figura 11: Cronograma experimental donde se muestra la edad de los animales, inicio de los tratamientos, muestreos y sacrificio.

2. Análisis estadístico de datos bioquímicos y neurotransmisores:

El programa estadístico usado fue Statistical Analyses System versión 9.4 (SAS, NC, USA). Los estadísticos descriptivos se muestran como las medias con el error estándar, se estableció el nivel de significancia a $p \leq 0,050$ y la tendencia fue considerada ente $0,050 < p \leq 0,100$. Se usaron test de normalidad Shaphiro-Wilk para estudiar todos los datos y, cuando era necesario, se aplicaba la transformación logarítmica en los datos con el objetivo de corregir la distribución.

Se utilizó el modelo MIXED con medidas repetidas para analizar los datos bioquímicos. El modelo factorial incluía el tiempo (t0 y t2) como factor intra-sujeto, el manejo (PH o NH) como factor inter-sujeto y la interacción entre ambos. Las cerdas fueron introducidas como unidad experimental y el corral como efecto aleatorio anidado al tipo de manejo.

En los datos de neurotransmisores y marcadores oxidativos se aplicó el modelo MIXED con ajuste de Tukey, las cerdas fueron introducidas como unidad experimental, el manejo como efecto fijo y, nuevamente, el corral como efecto aleatorio anidado al tipo de manejo.

3. Concentración de cortisol, proteínas de fase aguda y GPx:

Se determinó la concentración del cortisol en muestras de suero, saliva y pelo de todos los animales. Se analizaron estadísticamente las diferencias entre grupos de manejo y el tiempo. Se observó una disminución significativa del cortisol en pelo entre t2 y t0 ($p = 0,007$) mientras que el cortisol en suero sólo mostró una tendencia a disminuir entre manejos ($p = 0,094$). En cambio, no se observaron diferencias en la concentración de cortisol en saliva, ni interacción entre tiempo y manejo en ningún caso. Las proteínas de fase aguda determinadas en suero presentan una disminución significativa comparando t2 y t0 (haptoglobina (HP) y CRP $p < 0,0001$ y Pig-MAP $p = 0,021$). Los niveles de GPx se comportan de manera opuesta, mostrando un aumento significativo entre t2 y t0 ($p < 0,0001$). No se han observado diferencias por efecto del manejo ni interacción entre manejo y tiempo (Tabla 7).

Tabla 7: Concentraciones de los marcadores de estrés determinados en suero, pelo y saliva.

	t0		t2		p-valores		
	NH	PH	NH	PH	Manejo	Tiempo	Manejo* Tiempo
Cortisol Pelo (pg/mg)	24,70±2,05	19,80±1,35	20,80±2,00	17,61±1,53	0,208	0,007	0,852
Cortisol Suero (ng/mL)	23,50±2,22	17,57±1,77	24,21±2,09	21,20±2,09	0,094	0,252	0,410
Cortisol Saliva (ng/mL)	3,47±0,30	4,25±0,57	3,57±0,21	3,60±0,27	0,604	0,172	0,826
HP (mg/mL)	0,64±0,07	0,86±0,07	0,39±0,06	0,43±0,04	0,166	<0,0001	0,047
CRP (µg/dL)	16,81±1,29	19,19±1,79	9,23±1,36	8,64±0,91	0,946	<0,0001	0,218
Pig-MAP (mg/mL)	0,98±0,10	1,00±0,10	0,80±0,08	0,92±0,12	0,764	0,021	0,588
GPx (U/L)	6067±214	6149±188	7944±302	7841±246	0,975	<0,0001	0,475

Los valores se muestran como la Media± el error estándar de la media (SE) de todos los animales del estudio (n = 56). Las columnas se dividen en los tiempos de muestreo del estudio y los tratamientos de manejo. Los p-valores muestran las distintas variables del estudio en sus comparaciones entre condiciones y la interacción entre variables. En negrita $p < 0,050$.

4. Análisis del proteoma de PBMC:

El proteoma de las PBMC se analizó usando la técnica DIGE. Debido a la complejidad de la técnica se eligieron al azar 4 animales del grupo NH y 4 animales del grupo PH con sus respectivos tiempos $t=0$ y $t=2$, un total de 16 muestras para realizar el DIGE. Se obtuvieron 1180 *spots* analizables.

Aplicando el criterio de una $p < 0,050$ en la comparación por pares ANOVA, un Fold-Change (FC) $\geq \pm 1,50$ veces en la intensidad de los *spots* y descartando los que aparecían en los márgenes del gel o los que no tenían una forma correcta, de los 1180 *spots* iniciales se procedió a la identificación por LC-MS/MS de 64 *spots* (Figura 11). De los 64 elegidos 37 presentaban un aumento de intensidad entre t_2 y t_0 (FC positivos) mientras que en los 27 restantes disminuía su intensidad entre t_2 y t_0 (FC negativos). En la mayoría de los *spots* (54) el FC comparando t_2 y t_0 era mayor en el grupo NH que en el grupo PH, incluso 6 de éstos sólo variaban en el grupo NH. La identificación por LC-MS/MS de los 64 *spots* dio como resultado un total de 54 proteínas distintas (Tabla 8).

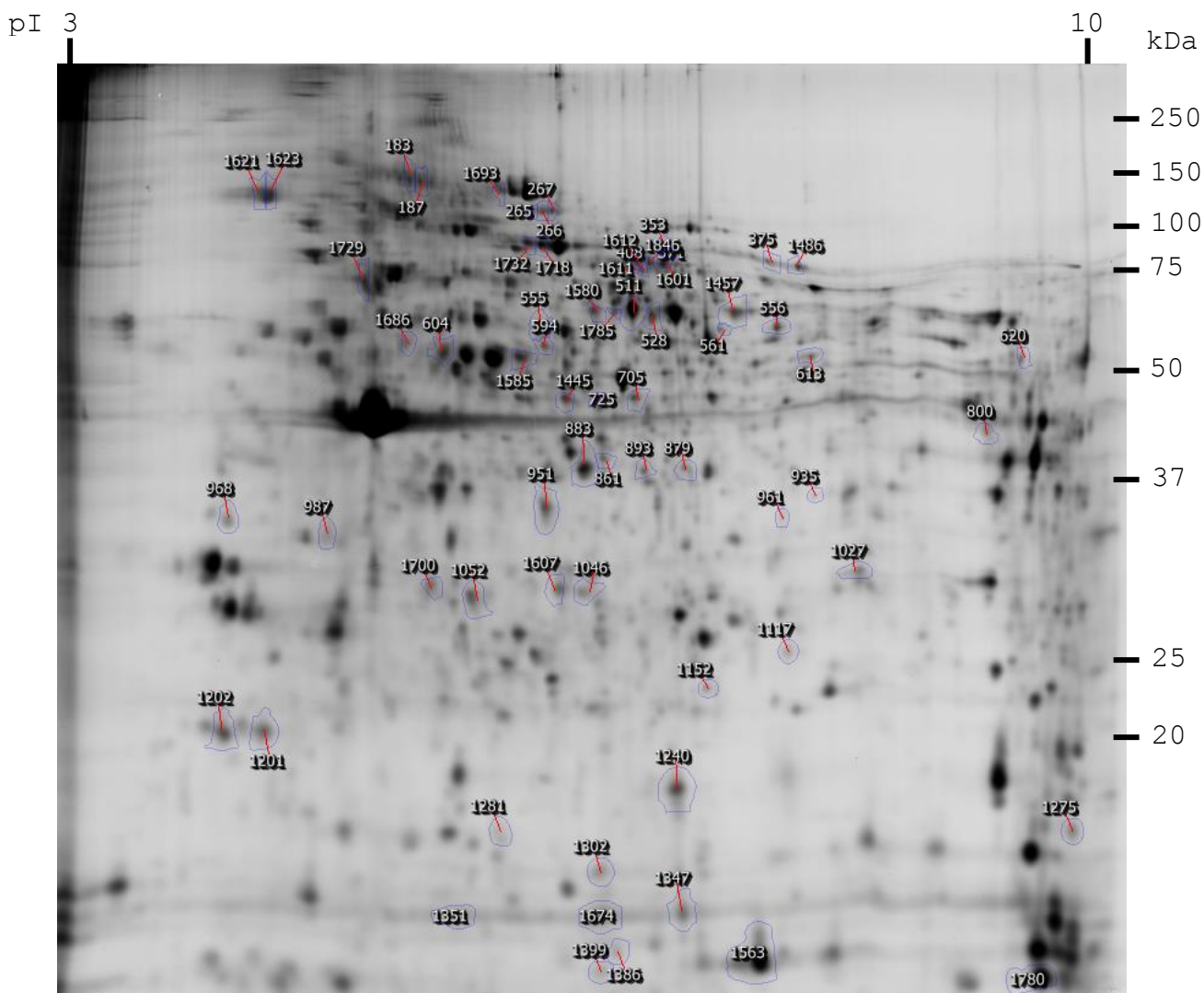


Figura 12: Imagen representativa del gel bidimensional teñido con Flamingo® del DIGE. En el gel aparecen señalizados el número y la situación de los *spots* identificados.

Tabla 8: Listado de las proteínas identificadas en los 64 spots seleccionados del DIGE.

Spot	Identificación UniProt Pig	Acceso UniProt Pig	Nombre STRING	NH t2/t0		PH t2/t0		FC Ratio NH/PH
				FC	p	FC	p	
183	Integrin alpha-IIb	F1RQY8_PIG	ITGA2B	2,1	0,003	1,6	0,027	1,31
187	Integrin alpha-IIb	F1RQY8_PIG	ITGA2B	2,6	0,017	1,7	0,024	1,53
265	Filamin-A	Q2YHQ3_PIG	FLNA	4,2	7E-04	3,3	0,008	1,27
267	Filamin-A	Q2YHQ3_PIG	FLNA	3,5	0,003	2,8	0,015	1,25
408	Coronin 1 C	F1RGA9_PIG	CORO1C	2,4	1E-04	4,3	0,022	0,56
511	Fibrinogen Beta Chain	F1RX37_PIG	FGB	3,9	0,007	2,1	0,041	1,86
528	Fibrinogen Alpha Chain	F1RX36_PIG	FGA	3	0,001	2	0,025	1,50
555	Coronin 1 A	G8G223_PIG	CORO1A	-2	0,003	-1,4	0,035	ND
556	Fibrinogen Beta Chain	F1RX37_PIG	FGB	3,9	0,012	1,9	0,044	2,05
594	Coronin 1A	I3LR17_PIG	CORO1A	-2	0,047	-1,4	0,032	ND
604	Fibrinogen Gamma Chain	F1RX35_PIG	FGG	3	0,001	2	0,046	1,50
613	Integrin-linked protein kinase	I3L9C8_PIG	ILK	4,5	0,01	2,6	0,025	1,73
620	Testin	TES_PIG	TES	1,5	0,046	2,4	0,027	0,63
705	Pleckstrin	F1SJ07_PIG	PLEK	2,6	0,005	2,1	0,019	1,24
725	Pleckstrin	F1SJ07_PIG	PLEK	2,4	5E-04	2	0,042	1,20
	Alpha-centractin	F2Z5G5_PIG	ACTR1A					
879	PDZ and LIM domain protein 1	T1RTP3_PIG	PDLIM1	1,5	0,009	2	0,048	0,75
893	PDZ and LIM domain protein 1	T1RTP3_PIG	PDLIM1	3,4	0,006	4,1	0,011	0,83
935	Calponin-2	CNN2_PIG	CNN2	2,2	0,008	1,7	0,019	1,29
961	Calponin-2	CNN2_PIG	CNN2	-4,4	3E-05	-3,8	0,007	1,16
968	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1_PIG	TPM1	2,4	0,04	1,7	0,03	1,41
1201	Myosin regulatory light polypeptide 9	MYL9_PIG	MYL9	4	0,01	2,5	0,032	1,60
1202	Myosin regulatory light chain 12B	F1SM78_PIG	MYL12B	2,1	0,006	1,6	0,031	1,31
1399	Filamin-A	Q2YHQ3_PIG	FLNA	-2,6	0,011	-1,7	0,022	1,53
1445	Pleckstrin	F1SJ07_PIG	PLEK	5,7	8E-04	3,4	0,026	1,68
1457	Fibrinogen Beta Chain	F1RX37_PIG	FGB	3,5	5E-04	2,5	0,014	1,40
1580	Fibrinogen Beta Chain	F1RX37_PIG	FGB	3,1	0,001	2,2	0,042	1,41
1585	Fibrinogen Gamma Chain	F1RX35_PIG	FGG	3	0,007	1,8	0,02	1,67
1601	Fibrinogen Alpha Chain	Q28936_PIG	FGA	9,4	0,005	8	0,003	1,18
1611	WD repeat-containing protein 1	K9IVR7_PIG	WDR1	3,3	0,004	6,7	0,017	0,49
1612	Fibrinogen Alpha Chain	F1RX36_PIG	FGA	8,6	0,015	6,4	0,004	1,34
1621	von Willebrand factor	F5XVC2_PIG	VWF	4,1	0,016	2,2	0,021	1,86
1623	Endoplasmin	ENPL_PIG	HSP90B1	2,7	0,018	2	0,004	1,35
1693	Vinculin	VINC_PIG	VCL	5	0,003	2,7	0,023	1,85
1718	Coagulation factor XIII, A1 polypeptide	K7GQL2_PIG	NR	2,6	0,009	1,6	0,047	1,63
1732	Caldesmon	F1SNH3_PIG	CALD1	2,5	0,014	1,6	0,036	1,56
1785	WD repeat-containing protein 1	K9IVR7_PIG	WDR1	2,7	0,029	1,7	0,015	1,59
	Fibrinogen beta chain	F1RX37_PIG	FGB					

Grupo B

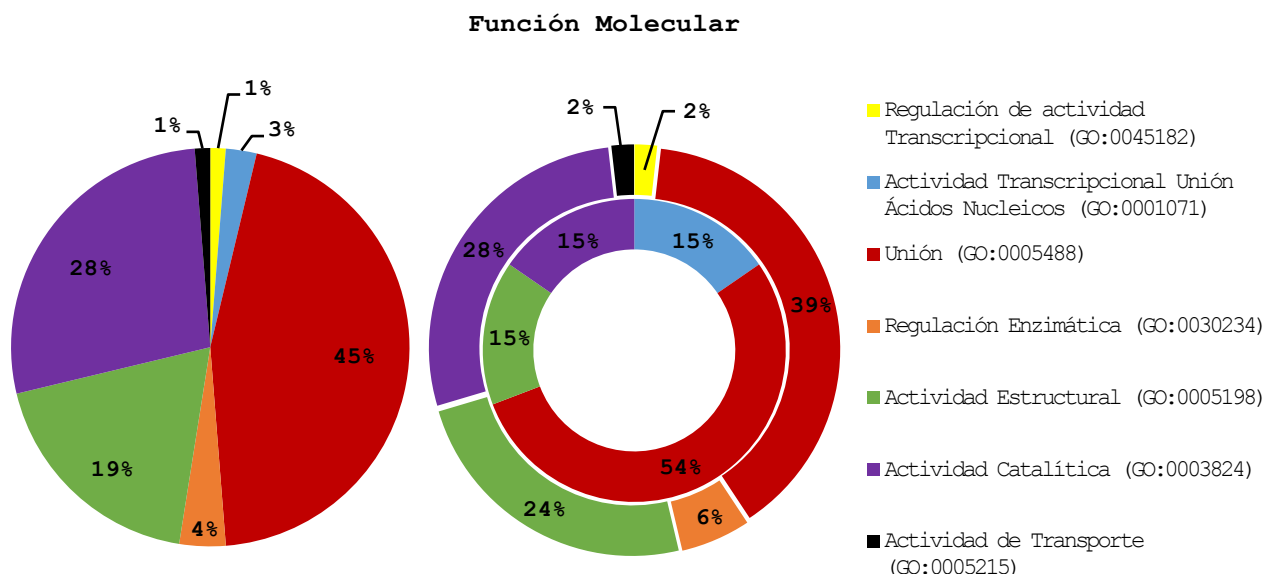
Spot	Identificación UniProt Pig	Acceso UniProt Pig	Nombre STRING	NH t2/t0		PH t2/t0		FC Ratio NH/PH	
				FC	p	FC	p		
Grupo C	353	Far upstream element-binding protein 2	F1SBT6_PIG	KHSRP	-3,4	0,001	-1,2	0,23	ND
	561	tRNA-splicing ligase RtcB homolog	RTCB_PIG	C22orf28	-2	0,003	-1,4	0,018	ND
	800	Elongation factor 1-alpha	Q0PY11_PIG	EEF1A1	-2,3	0,007	-1,5	0,031	1,53
	961	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	M3UZ37_PIG	HNRNPA2B1	-4,4	3E-05	-3,8	0,007	1,16
	968	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	I3LQS0_PIG	HNRNPK	2,4	0,04	1,7	0,03	1,41
	1117	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	M3UZ37_PIG	HNRNPA2B1	-5,6	0,044	-2,9	0,014	1,93
	1152	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	M3UZ37_PIG	HNRNPA2B1	-11,6	0,048	-5,2	0,002	2,23
	1281	GTP-binding protein Rheb	F2Z5R2_PIG	RHEB	-1,9	0,022	-2,3	0,005	0,83
	1347	Histone H2B	F2Z580_PIG	HIST1H2BF	-1,9	0,009	-2,3	2E-04	0,83
	1351	Histone H2B	F2Z580_PIG	HIST1H2BF	-1,8	0,014	-2,6	0,006	0,69
	1611	Far upstream element-binding protein 1	F1S9S5_PIG	FUBP1	3,3	0,004	6,7	0,017	0,49
	1674	Histone H2B	F2Z580_PIG	HIST1H2BF	-2,4	0,008	-2,4	6E-05	1,00
Grupo D	594	Chaperonin containing TCP1, subunit 2 (Beta)	D0G0C8_PIG	CCT2	-2	0,047	-1,4	0,032	ND
	1027	Proteasome subunit alpha type-4	F2Z528_PIG	PSMA4	2,2	0,009	1,4	0,016	ND
	1052	Proteasome activator complex subunit 1	PSME1_PIG	PSME1	-2,2	5E-04	-1,7	0,034	1,29
	1275	SUMO-conjugating enzyme UBC9	I3LSZ1_PIG	UBE2I	-2,1	0,046	-1,7	0,036	1,24
	1700	Proteasome activator complex subunit 2	PSME2_PIG	PSME2	-2,9	0,001	-2,2	0,008	1,32
Grupo E	594	Cytosol aminopeptidase	I3LD43_PIG	LAP3	-2	0,047	-1,4	0,032	ND
	1302	Peroxisredoxin-5, mitochondrial	F1RQP0_PIG	PRDX5	-2,6	0,005	-1,8	0,016	1,44
	1686	Cytosolic non-specific dipeptidase	F1SNL7_PIG	CNDP2	-2,3	0,003	-2,3	0,008	1,00
Grupo F	528	GMP synthase	I3LJ73_PIG	GMPS	3	0,001	2	0,025	1,50
	705	Small calcium-binding mitochondrial carrier 1	B2MUB6_PIG	SLC25A24	2,6	0,005	2,1	0,019	1,24
	935	Monoglyceride lipase	B8XSJ9_PIG	MGLL	2,2	0,008	1,7	0,019	1,29
	951	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDHC_PIG	MDH1	-2,3	0,002	-1,6	0,031	1,44
	1386	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	F1RKI3_PIG	HINT1	-2,8	0,011	-1,9	0,026	1,47
	1486	Aconitate hydratase, mitochondrial	F1SRC5_PIG	ACO2	-2	0,028	-1,5	0,044	1,33

Spot	Identificación UniProt Pig	Acceso UniProt Pig	Nombre STRING	NH t2/t0		PH t2/t0		FC Ratio NH/PH
				FC	p	FC	p	
Grupo A	861	Annexin Leukocyte elastase inhibitor	F1SJB5_PIG ILEU_PIG	ANXA1 SERPINB1	-4,1 0,004	-2,8 3E-04	1,46	
	883	Annexin	F1SJB5_PIG	ANXA1	-5,7 0,002	-2,7 0,049	2,11	
	987	EF-hand domain-containing protein D2	F1SUW3_PIG	EFHD2	1,8 0,042	2,1 0,026	0,86	
	1046	High mobility group protein B1	F2Z594_PIG	HMGB1	-2,2 0,002	-2,4 0,018	0,92	
	1240	Calcium-binding protein A9	C3S7K6_PIG	S100A9	-11,8 7E-04	-4,3 0,025	2,74	
	1275	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA_PIG	PPIA	-2,1 0,046	-1,7 0,036	1,24	
	1607	High mobility group protein B1	F2Z594_PIG	HMGB1	-1,9 0,006	-2 0,014	0,95	
	1729	Plastin-2	F1RK02_PIG	LCP1	-2,9 0,01	-2 0,016	1,45	

La tabla se divide en grupos de proteínas según su GO. Las columnas muestran el número del spot, la identificación de la proteína, código de acceso en UniProt y sus siglas correspondientes en STRING (NR: No Representado en STRING). Las comparaciones t2/t0 para cada condición de manejo se muestran por el Fold-Change (FC) y el p-valor significativo. En la última columna se muestra la ratio de FC entre condiciones de manejo (ND: No Determinado, debido a que alguna comparación no cumplía los criterios de significancia).

5. Análisis funcional de las proteínas identificadas:

Los distintos Gene Ontology (GO) resultantes del análisis con el programa informático PANTHER se mostraron en formato de diagramas circulares. Al organizar los términos GO de función molecular por manejo se observa claramente que en el diagrama circular de NH contiene muchos más términos GO y mayor porcentaje de anotaciones que el grupo PH (Figura 13).



Distribución Celular

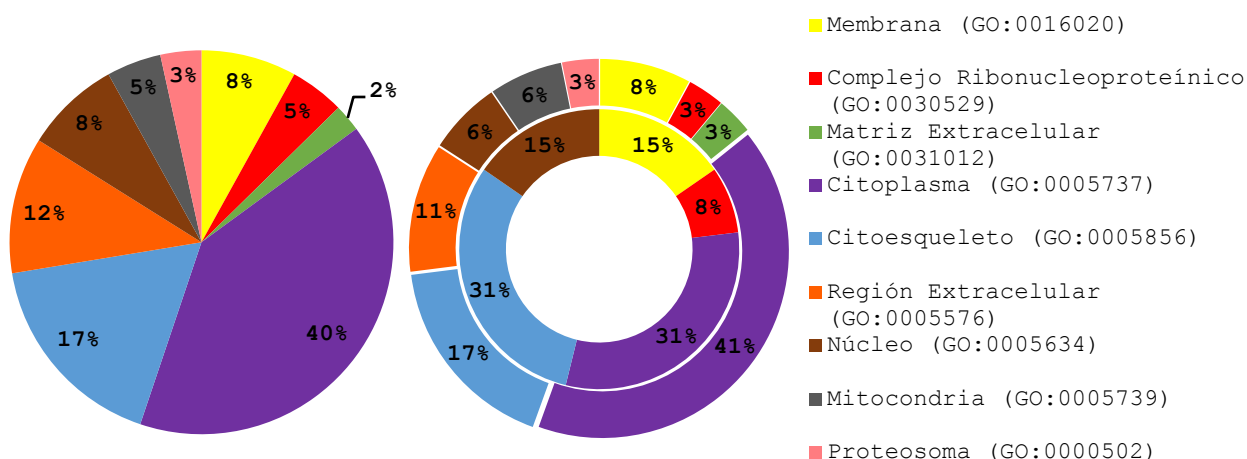


Figura 13: Diagramas circulares que clasifican las proteínas por su GO. En los diagramas superiores se muestra la clasificación por función molecular, el diagrama izquierdo contempla todas las proteínas identificadas (n = 54) y el derecho se separan las proteínas por su mayor abundancia en el tratamiento de manejo NH (anillo externo) o el PH (anillo interno). Los diagramas inferiores muestran el mismo perfil, pero clasificando las proteínas por su distribución celular.

Los términos de GO de proceso biológico se agruparon en seis grupos que engloban procesos relacionados entre ellos y se representaron junto a los FC correspondientes a cada proteína (Figura 14).

Así pues, Proteínas Inmunomoduladoras "Grupo A" incluyen Respuesta Inflamatoria (GO:00006954), Respuesta Inmune Innata (GO:0045087), Proceso Viral (GO:0016032) y Activación células T involucradas en respuesta inmune (GO:0002286).

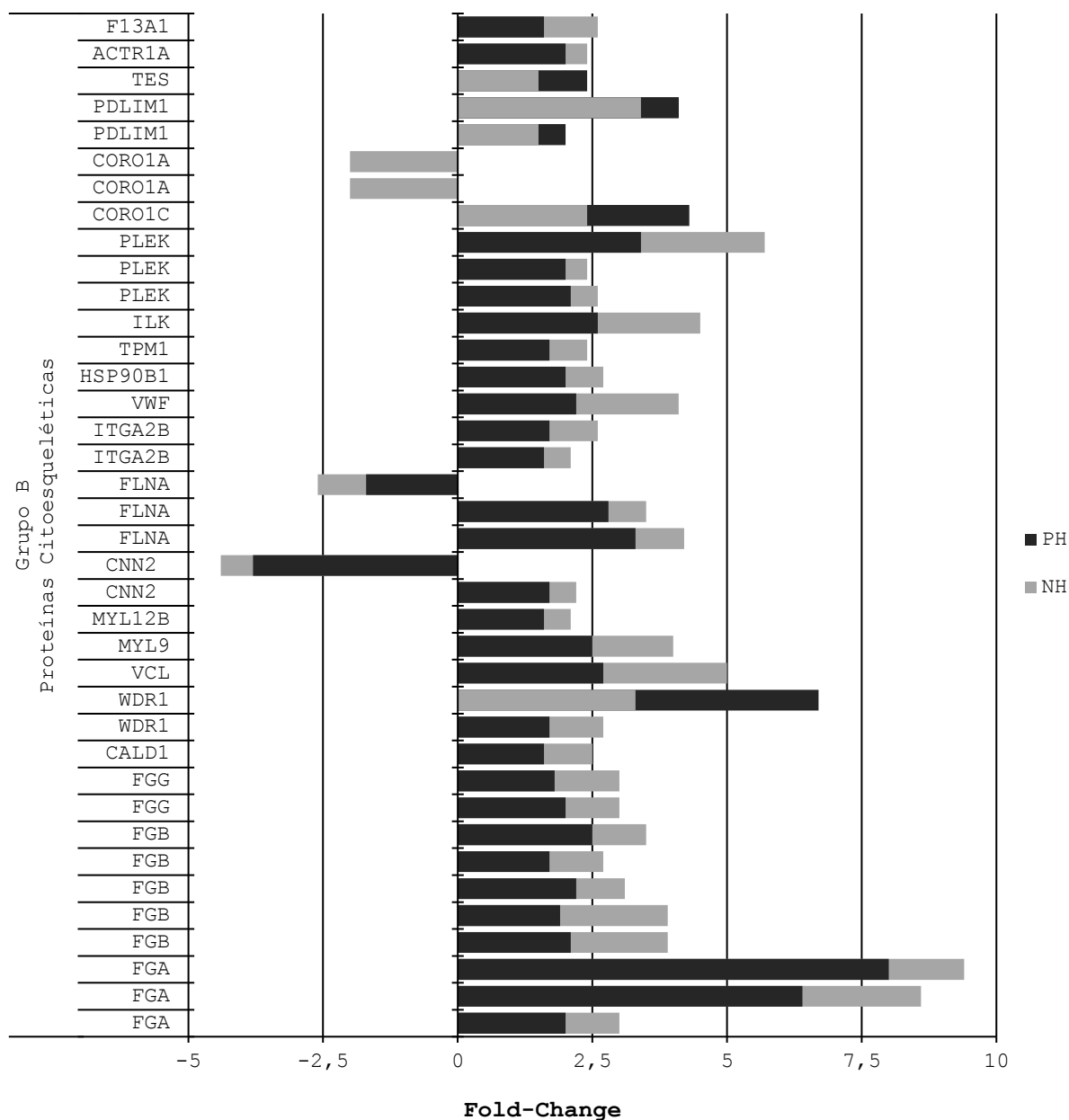
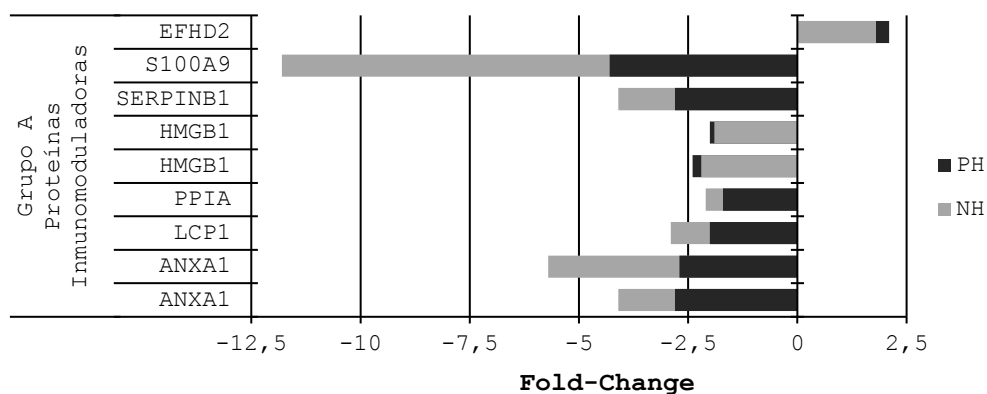
Proteínas Citoesqueléticas "Grupo B" incluyen Adhesión Matriz Celular (GO:0007160), Regulación Positiva de despolimerización de actina (GO:0030836), Movimiento de Componente Celular (GO:0006928), Regulación de la forma celular (GO:0008360), Organización de Estructura de Actomiosina (GO:0031032), Organización de Matriz Extracelular (GO:0030198), Ensamblaje de filamento de actina (GO:0031247), Organización de Citoesqueleto (GO:0007010) y Señalización mediada por Integrina (GO:0007229).

Expresión Génica y Transcripción "Grupo C" incluye Regulación de Transcripción (GO:0006355), *Splicing* tRNA (GO:0008033) y Expresión génica (GO:0010467).

Degradación y Plegamiento proteico "Grupo D" incluye Poliubiquitinación de proteínas (GO:0000209), Regulación proteasomal del catabolismo proteico (GO:0061136) y Plegamiento proteico (GO:0006457).

Proteínas de Estrés Oxidativo "Grupo E" incluye Biosíntesis de Glutatión (GO:0006750) y Respuesta a estrés oxidativo (GO:0006979).

Proteínas de Metabolismo Celular "Grupo F" incluye Ciclo ATC (GO:0006099), Biosíntesis de purinas (GO:0006164) y Biosíntesis de ácidos grasos (GO:0006633).



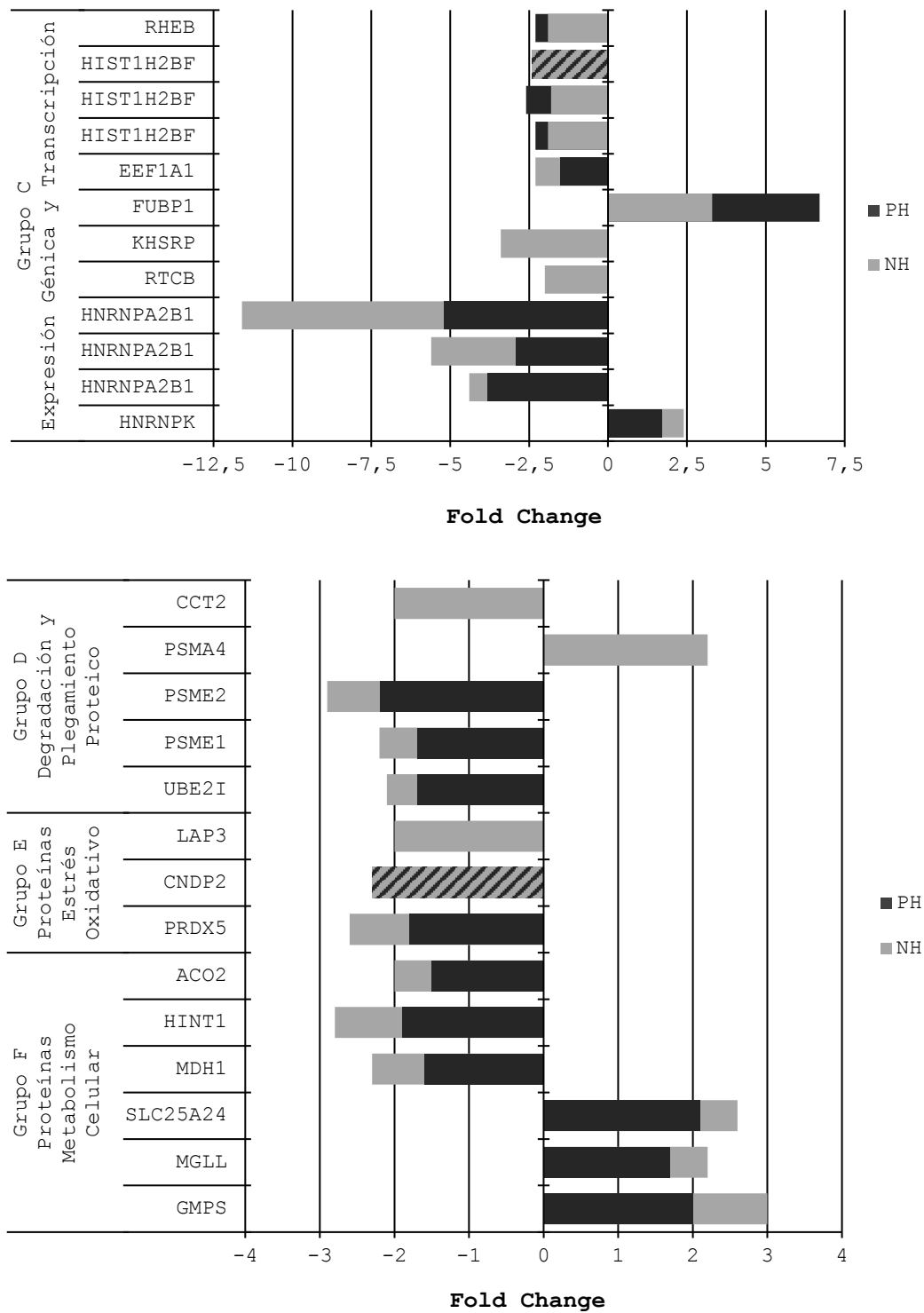


Figura 14: Efecto del tratamiento de manejo a lo largo del tiempo sobre los FC de las proteínas identificadas en el DIGE clasificadas por grupos de GO. El eje horizontal representa el FC de las comparaciones entre t2/t0 por cada condición de manejo, NH (gris claro) y PH (gris oscuro).

Una vez fueron caracterizadas todas las proteínas identificadas según su función molecular, distribución celular y el proceso biológico en el que participan, se procedió a analizar las interacciones que podía haber entre ellas usando la red creada por STRING versión 10.0. La red de interacciones obtenida se muestra en la Figura 15.

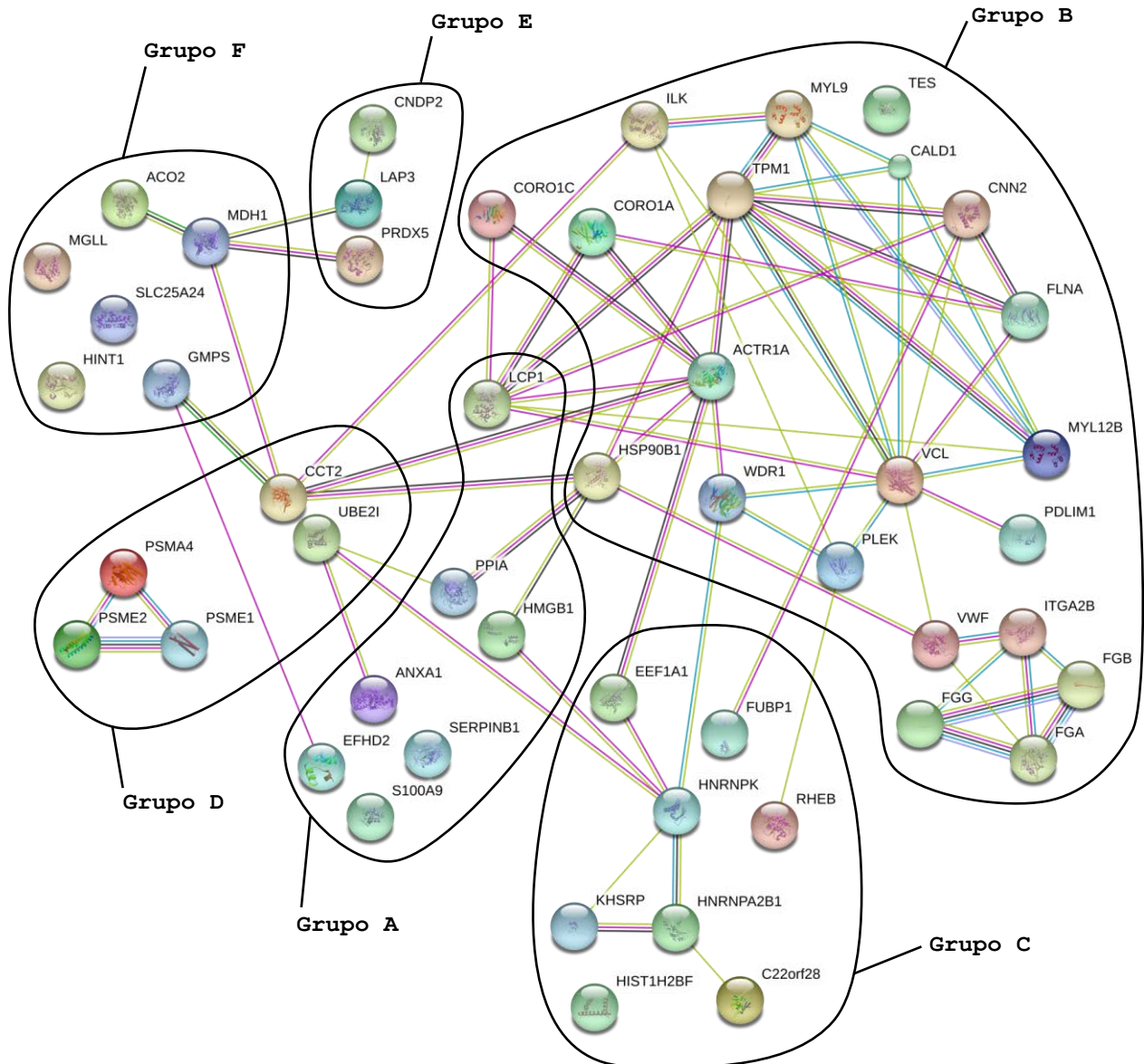


Figura 15: Red de interacción que muestra las asociaciones entre las proteínas identificadas en el DIGE creada por el programa informático STRING. El color de las líneas de conexión representa distintos tipos de asociación: Cian, base de datos. Rosa, experimental. Verde, cercanía génica. Rojo, fusión génica. Azul, coocurrencia génica. Amarillo, citas. Negro, coexpresión. Gris, homología proteica.

6. Validación de proteínas identificadas:

Se eligieron dos proteínas identificadas por LC-MS/MS y que mostraron expresión diferencial en el DIGE para validar su expresión intrínseca usando técnicas de inmunodetección. Se escogieron la cadena ligera de miosina (MYLC2) y el fibrinógeno (Fg) debido a la disponibilidad de anticuerpos específicos para porcino. Así pues, se realizaron los *Western Blot* de las PBMC de los ocho animales usados para llevar a cabo el DIGE.

Los resultados mostraron claramente el mismo patrón de expresión observado en el DIGE, donde hay un incremento en la expresión de ambas proteínas en t2 respecto t0 en ambos grupos de manejo (Figura 16). No obstante, no se observaron cambios de expresión entre el grupo PH y el grupo NH.

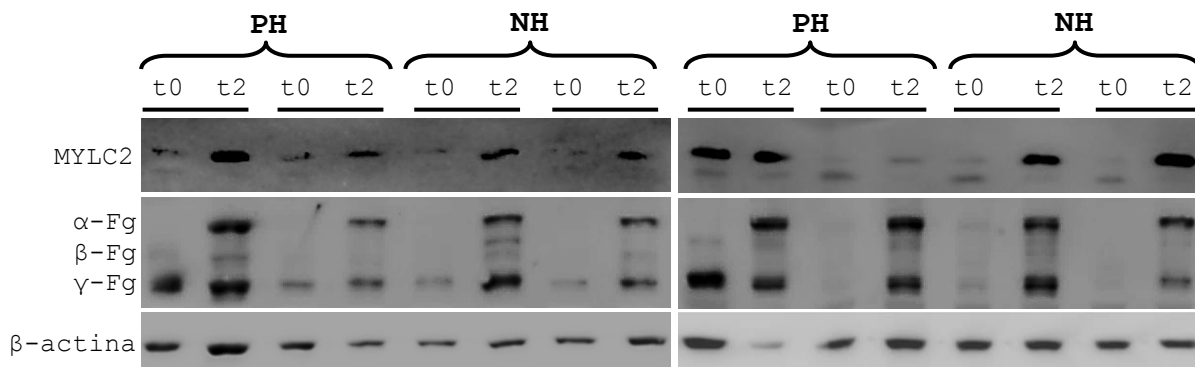


Figura 16: Westerns Blots de MYLC2 (Myosin Light Chain 2) y Fg (Fibrinógeno) de los lisados de PBMC que se usaron para el DIGE. Cada carril corresponde a un animal y condición distinta. La β -actina se usó a modo de control de carga.

7. Marcadores de estrés oxidativo:

A raíz de los resultados obtenidos del suero, en los que se observó un incremento en la actividad de GPx a t2, y del análisis bioinformático, que reveló una alteración en el metabolismo oxidativo de las PBMC, se procedió al estudio de otros marcadores de estrés.

Se cuantificaron los niveles de proteína total carbonilada mediante *Slot Blot* y la actividad SOD en los extractos de PBMC usados para el DIGE. Los resultados se muestran como la ratio entre t2 y t0 del mismo animal (Figura 17).

Los resultados mostraron que los animales del grupo NH tendieron a presentar un incremento mayor de proteínas carboniladas y niveles más bajos de actividad SOD que los animales del grupo PH (dos individuos NH y ninguno PH presentaron una ratio t2/t0 superior a 2,1, mientras que ningún animal del grupo NH y tres del grupo PH tuvieron una ratio superior a 1 de actividad SOD). De todos modos, debido a la alta variabilidad individual, las diferencias no fueron estadísticamente significativas siendo las diferencias entre las ratios de la carbonilación proteica de $p = 0,244$ y las ratios de actividad SOD con una tendencia de $p = 0,078$.

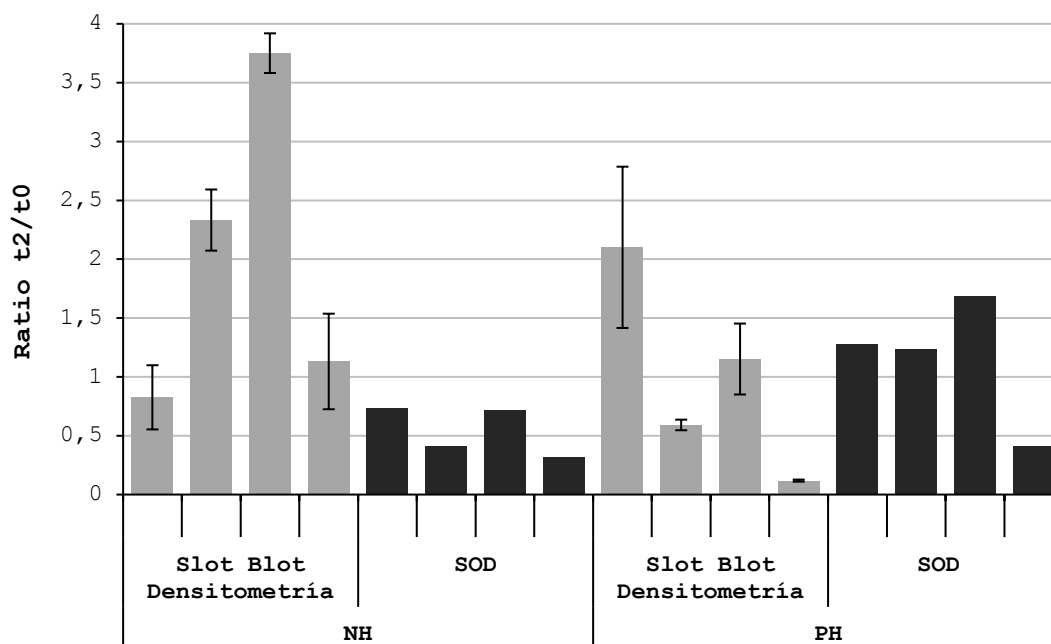


Figura 17: Efecto del tratamiento de manejo a lo largo del tiempo sobre los marcadores de estrés oxidativo en los lisados de PBMC usados en el DIGE. Cada barra representa los valores de un animal. El ensayo de *Slot Blot* se realizó por triplicado, se muestran las medias de los triplicados y las barras de error corresponden a ± 1 SE.

8. Perfil de neurotransmisores:

Se cuantificaron los neurotransmisores de las vías de catecolaminas e indolaminas de cuatro áreas cerebrales distintas (amígdala, hipocampo, corteza prefrontal e hipotálamo). Al comparar los dos grupos de manejo, sólo se observaron cambios con tendencia estadística en la concentración de serotonina (5-HT) en la corteza cerebral, la cual aumenta en animales del grupo PH, y en la amígdala, que presenta un patrón opuesto (Tabla 9).

Tabla 9: Concentraciones de neurotransmisores y sus metabolitos determinadas en las distintas áreas cerebrales.

	NT (ng/g Tejido)	NH	PH	p-valores
Amígdala	NA	231,9±20,0	205,8±14,8	0,294
	DOPAC	275,0±20,6	256,4±17,7	0,494
	DA	842,8±51,7	838,0±46,2	0,945
	HVA	714,6±50,7	682,3±46,5	0,641
	5-HIAA	277,6±12,4	284,7±12,8	0,695
	5-HT	683,9±22,5	627,6±20,9	0,073
Corteza Prefrontal	NA	207,2±15,6	231,2±16,0	0,289
	DOPAC	79,20±5,24	89,33±5,58	0,192
	DA	101,3±6,38	97,07±6,54	0,644
	HVA	181,2±16,7	197,3±13,5	0,457
	5-HIAA	96,03±7,27	110,3±7,34	0,181
	5-HT	200,4±12,9	229,2±10,2	0,093
Hipocampo	NA	222,3±11,4	211,6±11,3	0,511
	DOPAC	42,72±1,65	42,02±1,61	0,764
	DA	98,88±3,93	105,1±4,40	0,295
	HVA	116,2±6,10	115,2±8,14	0,916
	5-HIAA	272,1±10,6	289,92±16,42	0,361
	5-HT	223,3±8,81	203,6±13,5	0,222
Hipotálamo	NA	2660±222	2551±215	0,727
	L-DOPA	370,5±35,9	376,0±23,7	0,895
	DOPAC	171,6±11,5	150,3±9,05	0,147
	DA	690,4±48,8	619,0±48,2	0,306
	HVA	370,8±25,0	331,7±21,3	0,238
	5-HIAA	376,5±27,8	388,4±20,8	0,730
	5-HT	633,2±32,6	672,0±31,4	0,399

Las concentraciones se muestran como Media±SE correspondiente a todos los animales del estudio (n = 56). Las columnas se dividen por los grupos de manejo del estudio y el p-valor de comparación entre ellos. En negrita p < 0,100.

Capítulo 2: Efecto de los cambios en la dieta sobre la señalización por neurotransmisores y neuropéptidos en el sistema nervioso central

Estudio 1: Efecto de una dieta con alto contenido lipídico y la acción compensadora al añadir probióticos y ácidos grasos omega-3 sobre los neurotransmisores y los neuropéptidos reguladores del hambre en modelo porcino

1. Diseño experimental:

Partiendo de 12 cerdas gestantes de raza pura Duroc se obtuvieron 43 lechones hembra para este estudio.

Después del destete (4 semanas de vida) los animales fueron trasladados a la granja experimental de IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària, Monells, Girona) donde empezaron la adaptación a alimentación con una dieta estándar. A la edad de 9 semanas se hizo el pesaje de los lechones hembra y se distribuyeron en 4 corrales de medidas 5 x 2,7 m con suelos listados de madera, entre 10 y 11 animales por corral, mezclando cerdas de distintas madres. Cada corral se alimentó con una dieta diferente (dieta T1 a T4) durante 10 semanas.

Las instalaciones estaban provistas de condiciones de luz natural y una temperatura ambiente constante de $22\pm 3^{\circ}\text{C}$. Los animales tenían acceso a agua *ad libitum* en bebederos de acero inoxidable (15 x 16 cm) conectados a un chupete también de acero inoxidable. Los comederos eran de hormigón (58 x 34 cm) con cuatro espacios de alimentación y los animales se alimentaban voluntariamente en un sistema automatizado que cuantificaba el consumo por día.

Las cuatro dietas experimentales se elaboraron en IRTA y constaban de cereales, proteínas de leche y vegetales, almidón, azúcar, minerales, micronutrientes y aminoácidos en distintos porcentajes en función de la dieta (Tabla 10).

Todos los animales recibieron diariamente una ración adicional de 18 gramos de queso fresco (con un total de 2,6 gramos de proteínas y grasas que se traduce en 42 Kcal de energía). En las dietas T3 y T4 el queso fresco incluía $5 \cdot 10^{10}$ ufc del probiótico *Bifidobacterium breve*. Además, en la dieta T4 se incorporó un 2 % de ácidos grasos ω -3.

Pasadas 9 semanas de tratamiento con las dietas se realizó el segundo pesaje. Una semana después se ayunaron los animales (19 semanas de vida) durante 8 h antes de transportarlos al matadero experimental (viaje de 1,2 Km). Una vez descargados se estabularon durante 1 h antes de empezar con los sacrificios. Las cerdas se sacrificaron en grupos de dos, exponiéndolas durante 3 min a 90

% CO₂ y posterior desangrado por incisión yugular, seguidamente se extrajo y se diseccionó el cerebro.

Este estudio se aprobó por IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) de IRTA. Durante toda la estabulación los animales fueron inspeccionados diariamente y no se reportó ningún problema de salud durante el periodo experimental.

Tabla 10: Composición básica de las cuatro dietas con las que se alimentaron a los lechones del estudio.

	T1	T2	T3	T4
Proteína Cruda (%)	17,60	14,34	14,54	14,62
Fibra Cruda (%)	11,00	1,71	1,75	1,74
Grasas (%)	4,60	11,55	11,92	12,09
Lisina (%)	1,03	0,93	0,93	0,93
Energía Metabolizable (MJ/kg)	10,83	15,16	15,56	15,56
Energía Metabolizable (kcal/kg)	2587	3621	3716	3716
<i>Bifidobacterium breve</i> (ufc/día)	-	-	5 · 10 ¹⁰	5 · 10 ¹⁰
Ácidos grasos omega-3 (%)	-	-	-	2

2. Análisis estadístico:

Los datos presentados en este estudio se analizaron con el programa estadístico IBM SPSS versión 22 (IBM, IL, USA). Con el test de Shapiro-Wilk se estudió la distribución de los datos descriptivos y si era necesario se aplicó una transformación logarítmica para normalizar la distribución. Las diferencias entre las dietas se analizaron usando el test ANOVA con ajuste de Tukey para las comparaciones entre grupos poniendo cada animal como unidad experimental. El nivel de significancia se estableció en $p \leq 0,050$ y la tendencia en $0,050 < p \leq 0,100$. Las correlaciones entre parámetros se analizaron con el test de correlación bilateral de Pearson. Las correlaciones se consideraron a partir de un coeficiente mayor de 0,500 y una significancia de $p \leq 0,050$.

3. Resultados productivos:

Los pesajes en las semanas 9 y 18 de vida junto con los consumos durante el mismo tiempo se presentan en la Tabla 11.

Los cuatro grupos no mostraron diferencias de peso en la semana 9 (S9). En el peso a la semana 18 (S18), incremento de peso S18-S9 y media de incremento de peso diario (ADG, "Average Daily Gain") se observó un aumento significativo en los animales alimentados con una dieta de alto contenido en grasas (HFD, "High Fat Diet") T2 respecto animales con dietas T3 o T4 (S18, T2 versus T3 $p = 0,037$, T2 versus T4 $p = 0,015$. S18-S9, T2 versus T3 $p = 0,015$, T2 versus T4 $p = 0,004$. ADG, T2 versus T3 $p = 0,015$, T2 versus T4 $p = 0,004$).

El consumo, tanto total como diario, medido en kg mostró un aumento significativo en la dieta control T1 en relación con la dieta T4 ($p = 0,010$ en

ambos casos). Mientras que en los consumos medidos en kcal de energía metabolizable se observó una disminución significativa de la energía consumida en la dieta control T1 respecto todas las otras dietas ($p < 0,001$ en todos los casos).

Tabla 11: Datos productivos de peso y consumo durante el periodo experimental de los animales alimentados con las dietas T1, T2, T3 y T4.

Dietas	T1	T2	T3	T4
n	11	10	11	11
Peso S9 (kg)	16,50±0,86	16,70±0,70	16,14±0,59	16,27±0,41
Peso S18 (kg)	53,27±1,74 ^{a,b}	60,00±2,65^a	51,36±2,12^b	50,23±2,07^b
Incremento Peso 18-9 (kg)	36,77±1,27 ^{a,b}	43,30±2,26^a	35,23±1,62^b	33,95±1,90^b
ADG 18-9 (kg)	0,58±0,02 ^{a,b}	0,69±0,04^a	0,56±0,03^b	0,54±0,03^b
Consumo 18-9 (kg)	92,12±1,72^a	89,48±2,80 ^{a,b}	82,67±2,66 ^{a,b}	79,57±3,34^b
Consumo Diario 18-9 (kg/Día)	1,46±0,03^a	1,42±0,44 ^{a,b}	1,31±0,04 ^{a,b}	1,26±0,05^b
Consumo Energético 18-9 (10³·kcal)	240,6±4,49^a	328,5±10,30^b	307,2±8,99^b	295,7±12,39^b
Consumo Energético Diario 18-9 (10³·kcal/Día)	3,82±0,07^a	5,21±0,16^b	4,88±0,16^b	4,69±0,20^b

Los valores se presentan como Media±SE. Las columnas dividen los animales alimentados con las cuatro dietas del estudio. Los superíndices y en negrita muestran las significancias entre variables, si $a \neq b$ $p < 0,050$.

4. Perfil de neurotransmisores:

Se diseccionaron el hipotálamo (HPT), el hipocampo ventral (HCV), el hipocampo dorsal (HCD), la amígdala y la corteza prefrontal (CPF) para la determinación de neurotransmisores (Tabla 12). En el HCD, la amígdala y la CPF no se observaron diferencias significativas en ningún neurotransmisor o metabolito analizado.

Las áreas de HPT y HCV presentaron diferencias principalmente en el sistema dopaminérgico. En el hipotálamo se observó un incremento significativo del metabolito DOPAC en la dieta HFD respecto tanto a la dieta T3 ($p = 0,043$) como a la dieta T4 ($p = 0,044$).

En contraposición, en el HCV el parámetro TotalDA (suma de concentraciones de DA, DOPAC y HVA) disminuyó en la dieta HFD respecto a la dieta control ($p = 0,050$) y la dieta T4 ($p = 0,023$). Los metabolitos involucrados en las diferencias significativas fueron el DOPAC, que presentó una tendencia a disminuir en la dieta HFD respecto a T4, y la DA, que tendió a disminuir en la dieta HFD en relación con la dieta control. Además, en el HCV se observó una tendencia del metabolito de la serotonina 5-HIAA a disminuir también entre la dieta HFD respecto la dieta T4.

Estos resultados, en general, mostraron que el sistema de neurotransmisores presenta alteraciones de las vías dopaminérgicas con una dieta HFD sobre todo en el HCV, aunque también en el hipotálamo. Además, en estas dos áreas el sistema dopaminérgico se comporta de manera opuesta: en el HCV disminuyen los niveles dopaminérgicos mientras que en el hipotálamo aumentan con una dieta HFD (Figura 18).

Tabla 12: Concentración de neurotransmisores y metabolitos en las distintas áreas cerebrales de los animales alimentados con las dietas T1, T2, T3 y T4.

NT (ng/g Tejido)	T1	T2	T3	T4
Hipotálamo				
NA	2082±219	2037±312	1906±186	1883±126
DOPAC	309,2±37,3 ^{a,b}	343,1±28,2^a	226,7±25,7^b	227,3±23,4^b
DA	228,4±26,1	206,3±32,4	201,0±16,9	226,8±30,3
HVA	482,0±51,7	537,6±71,5	441,5±64,7	492,2±81,3
TotalDA	1020±101	1087±121	869,2±71,5	946,3±121
5-HIAA	432,4±38,2	437,3±55,0	392,6±27,5	449,9±42,5
5-HT	1055±99,0	1134±159	1074±76,0	1104±130
Hipocampo Ventral				
NA	279,6±11,4	290,6±19,1	283,7±6,11	295,3±11,2
DOPAC	211,9±24,9 ^{a,b}	169,6±10,6^a	207,7±14,0 ^{a,b}	234,4±18,1^b
DA	142,5±10,7^a	91,98±8,96^b	109,2±11,3 ^{a,b}	122,4±18,8 ^{a,b}
HVA	191,0±10,5	167,2±11,4	179,1±13,6	200,5±16,1
TotalDA	545,3±35,3^a	428,8±18,1^b	496,0±21,4 ^{a,b}	557,3±37,2^a
5-HIAA	330,6±27,0^{a,b}	275,5±11,3^a	297,9±14,1 ^{a,b}	336,3±14,6^b
5-HT	ND	ND	ND	ND
Hipocampo Dorsal				
NA	308,8±10,1	342,5±17,4	351,3±17,7	339,5±12,6
DOPAC	147,6±20,4	145,9±19,3	186,6±31,4	125,7±15,5
DA	ND	ND	ND	ND
HVA	254,6±31,5	188,1±10,7	183,9±25,0	215,3±19,2
TotalDA	ND	ND	ND	ND
5-HIAA	325,6±37,8	291,1±32,5	304,2±13,4	309,1±17,0
5-HT	ND	ND	ND	ND
Amígdala				
NA	2436±347	3157±778	1790±207	2379±413
DOPAC	385,0±33,5	371,4±27,6	356,6±35,7	401,8±26,1
DA	463,4±33,4	530,2±61,2	416,9±34,9	462,5±47,9
HVA	659,0±72,3	731,5±52,2	647,8±26,0	682,1±32,4
TotalDA	1507±122	1633±134	1421±87,1	1546±91,4
5-HIAA	309,4±40,6	292,7±22,6	320,5±22,9	312,5±12,3
5-HT	1140±95,2	1075±78,1	1066±78,9	1091±56,5
Corteza Prefrontal				
NA	368,0±48,5	421,6±103	422,5±81,6	396,9±63,2
DOPAC	143,0±17,2	131,3±15,8	153,8±17,6	120,8±7,63
DA	61,00±14,8	44,00±2,95	52,54±3,74	56,30±6,51
HVA	235,9±37,6	200,3±16,6	242,9±35,7	195,9±10,2
TotalDA	439,9±62,0	375,6±25,2	449,3±51,7	373,0±18,5
5-HIAA	143,8±7,93	144,1±12,27	158,25±9,73	135,3±6,57
5-HT	366,9±51,4	300,4±64,9	314,4±66,5	403,7±35,2

Las concentraciones se presentan como Media±SE. Las filas muestran los neurotransmisores y los metabolitos de cada área cerebral. Las columnas dividen los animales alimentados con las cuatro dietas del estudio. Los superíndices y en negrita muestran las significancias entre variables, si $a \neq b$ $p < 0,050$. ND, no detectable.

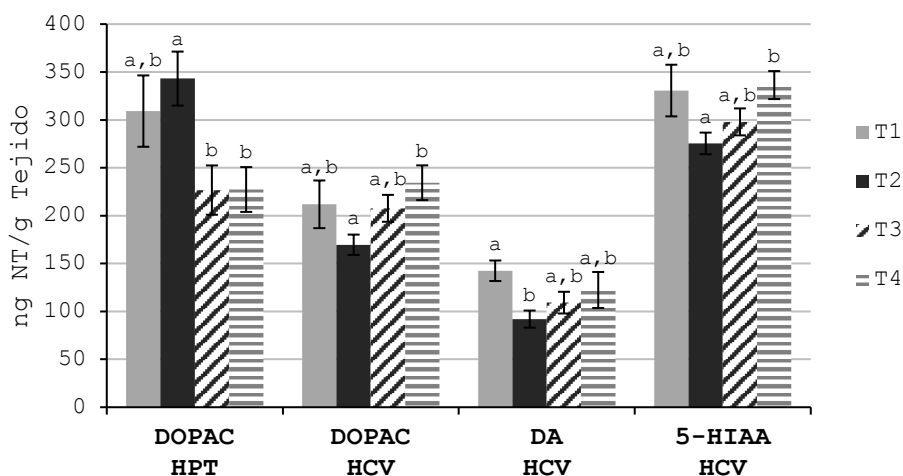


Figura 18: Efecto de la dieta sobre las concentraciones de neurotransmisores o metabolitos cerebrales. Sólo se representan los que presentaron diferencias significativas en la comparación entre las dietas. El eje horizontal muestra el neurotransmisor o metabolito y el área cerebral al que pertenece. Las barras de error corresponden a ± 1 SE.

5. Perfil de neuropéptidos en hipotálamo:

Los neuropéptidos involucrados en ingesta, Orexina A (OrexA), Neuropéptido Y (NPY) y Proopiomelanocortina (POMC), se cuantificaron en los homogenados hipotalámicos usando ELISAs comerciales específicos para porcino (Tabla 13).

Los neuropéptidos orexigénicos (OrexA y NPY) presentaron el mismo patrón, disminuyendo su concentración en animales con la dieta HFD en relación con animales con dieta control. Esta disminución se revertió en animales con dietas probióticas (T3 y T4).

Opuestamente, el neuropéptido anorexigénico POMC aumentó su concentración en animales con dieta HFD respecto animales con la dieta control y este efecto también se revertió, parcialmente, en las dietas probióticas (Figura 19).

A pesar de todo, las diferencias observadas no fueron estadísticamente significativas debido a la alta variabilidad biológica entre individuos.

Tabla 13: Concentración de neuropéptidos cuantificados en los lisados de HPT de los animales alimentados con las dietas T1, T2, T3 y T4.

Neuropéptido (ng/g Tejido)	T1	T2	T3	T4
OrexA	2,15±0,96	1,45±0,46	2,38±0,70	2,97±1,04
NPY	50,24±11,9	29,71±3,34	40,49±5,37	39,15±4,59
POMC	9,57± 2,45	15,62±4,38	12,44±1,87	13,50±2,30

Las concentraciones se presentan como Media±SE. Las filas muestran los neuropéptidos del HPT. Las columnas dividen los animales alimentados con las cuatro dietas del estudio.

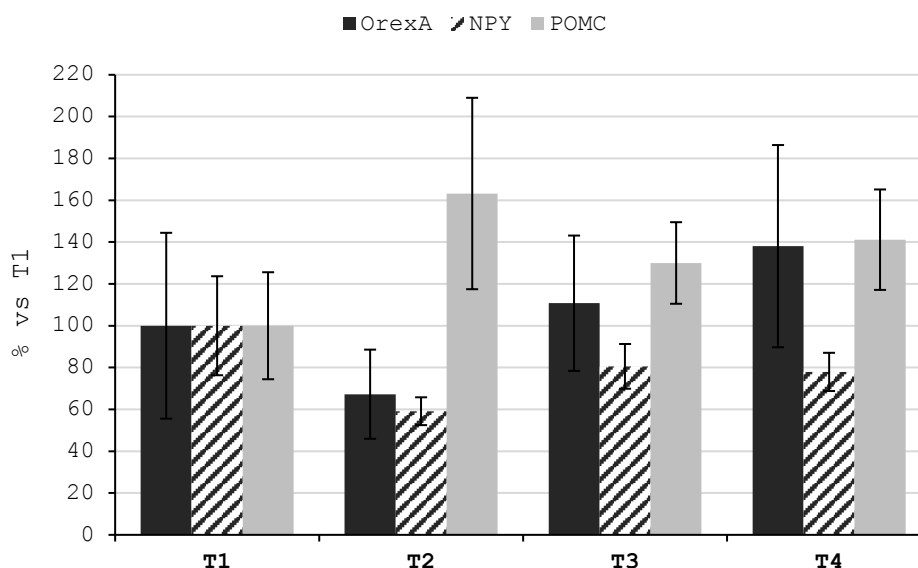


Figura 19: Efecto de la dieta sobre las concentraciones de los neuropéptidos cerebrales OrexA, NPY y POMC. Los valores se muestran en % con relación a T1 (Dieta Control). El eje horizontal divide las barras según las distintas dietas del estudio. Las barras de error corresponden a ± 1 SE.

6. Correlaciones entre variables:

Los datos productivos junto con las determinaciones de neurotransmisores fueron analizados mediante correlación de Pearson. Sólo se analizaron las áreas que presentaron alguna diferencia significativa o tendencia estadística entre las dietas (HPT y HCV). Además, sólo se tuvieron en cuenta las correlaciones con coeficientes mayores de 0,500 y $p < 0,050$. Los coeficientes de regresión resultantes se presentan en formato de *heatmaps* (Figuras 20 y 21).

6.1 Hipotálamo:

La dieta control T1 mostró correlaciones positivas entre el consumo medido en kg y el consumo medido en kcal, como era de esperar. Además, se encontraron correlaciones positivas entre neurotransmisores y metabolitos de la vía dopaminérgica (DA, DOPAC y HVA), también entre DA y NA. Se observaron también correlaciones positivas entre metabolitos de la vía serotoninérgica y entre catecolaminas e indolaminas. No se observaron correlaciones significativas ni entre neurotransmisores y neuropéptidos ni con los datos productivos.

Al comparar los mapas de T1 y T2 aparecieron diferencias claras entre ellos. En primer lugar, se observaron correlaciones positivas mayores de 0,800 entre consumos y la ADG en la dieta HFD que no se mostraron en la dieta control. Además, en la dieta HFD, aparecieron correlaciones positivas entre los parámetros productivos y la vía serotoninérgica, amén de los metabolitos de la dopamina DOPAC y HVA. Finalmente, también se observaron correlaciones negativas entre el NPY y los neurotransmisores DA y 5-HT.

Los animales con dietas suplementadas con probióticos +/- ω -3 (T3 o T4) mostraron perfiles de correlaciones distintos a los animales con dieta control o HFD. No obstante, también mostraron las correlaciones positivas esperadas entre los datos productivos y entre neurotransmisores con metabolitos de la misma vía. En el caso de la dieta T3 no se observaron más correlaciones exceptuando correlaciones positivas entre la NA y los neuropéptidos, destacando la OrexA y POMC.

En cambio, en la dieta T4 se observaron correlaciones positivas entre los neuropéptidos OrexA y NPY con los parámetros productivos, mientras que el metabolito de la serotonina 5-HIAA y, en algunos casos, el DOPAC o HVA presentaron correlaciones negativas con los datos productivos. Finalmente, también se observaron correlaciones negativas entre la OrexA con DA y 5-HIAA, entre el NPY y 5-HIAA y una correlación positiva entre neuropéptidos OrexA y NPY.

En definitiva, los perfiles de correlaciones de T3 y T4 fueron similares al de T1, indicando que estas dietas eran capaces de normalizar estos patrones respecto a la dieta T2 e incluso llegar a revertir su patrón como en el caso de la dieta T4.

6.2 Hipocampo Ventral:

El perfil de correlaciones del HCV mostró claras diferencias con el perfil del HPT. Se volvieron a mostrar las mismas correlaciones muy positivas entre parámetros productivos en todas las dietas, siendo más elevadas en las dietas T2, T3 y T4 que en la dieta T1.

Apenas aparecieron correlaciones entre neurotransmisores o metabolitos con los datos productivos, exceptuando en la dieta control donde se observaron correlaciones negativas entre parámetros de consumo con el DOPAC y HVA, además de correlaciones positivas entre los mismos parámetros de consumo con la NA. No obstante, las correlaciones negativas entre el consumo y HVA se tornaron positivas en la dieta T2 mientras que en las dietas T3 y T4 desaparecieron.

A pesar de que los patrones de correlaciones de T3 y T4 no tuvieron un patrón muy parecido al de dieta T1, compartieron ciertas correlaciones, siendo una vez más el patrón de la dieta T4 el más semejante al de la dieta T1.

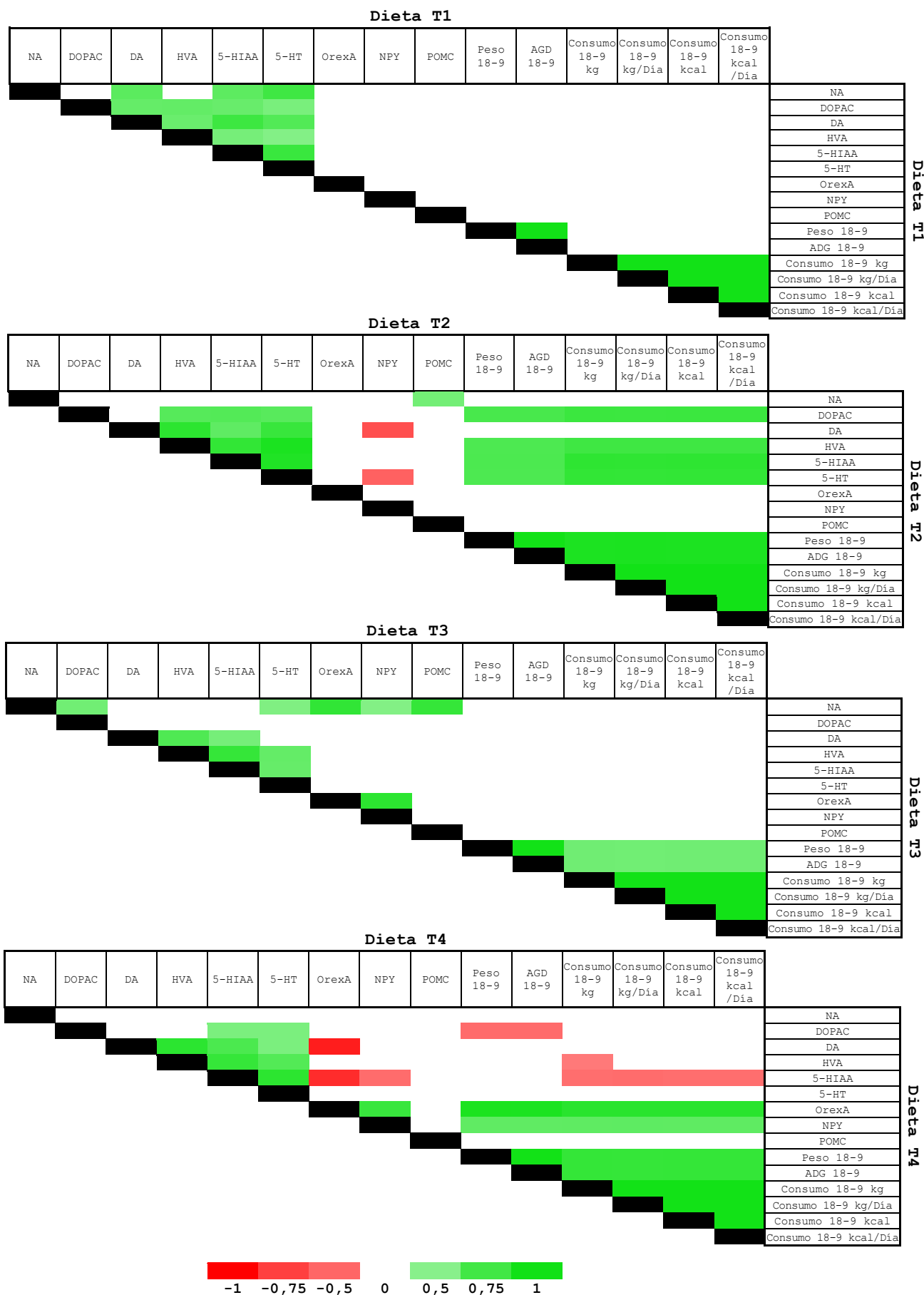


Figura 20: Representaciones gráficas de las correlaciones en formato *heatmap* del hipotálamo. Se representan las correlaciones significativas y de $R > 0,500$ entre todos los parámetros analizados en el estudio separados por las dietas.

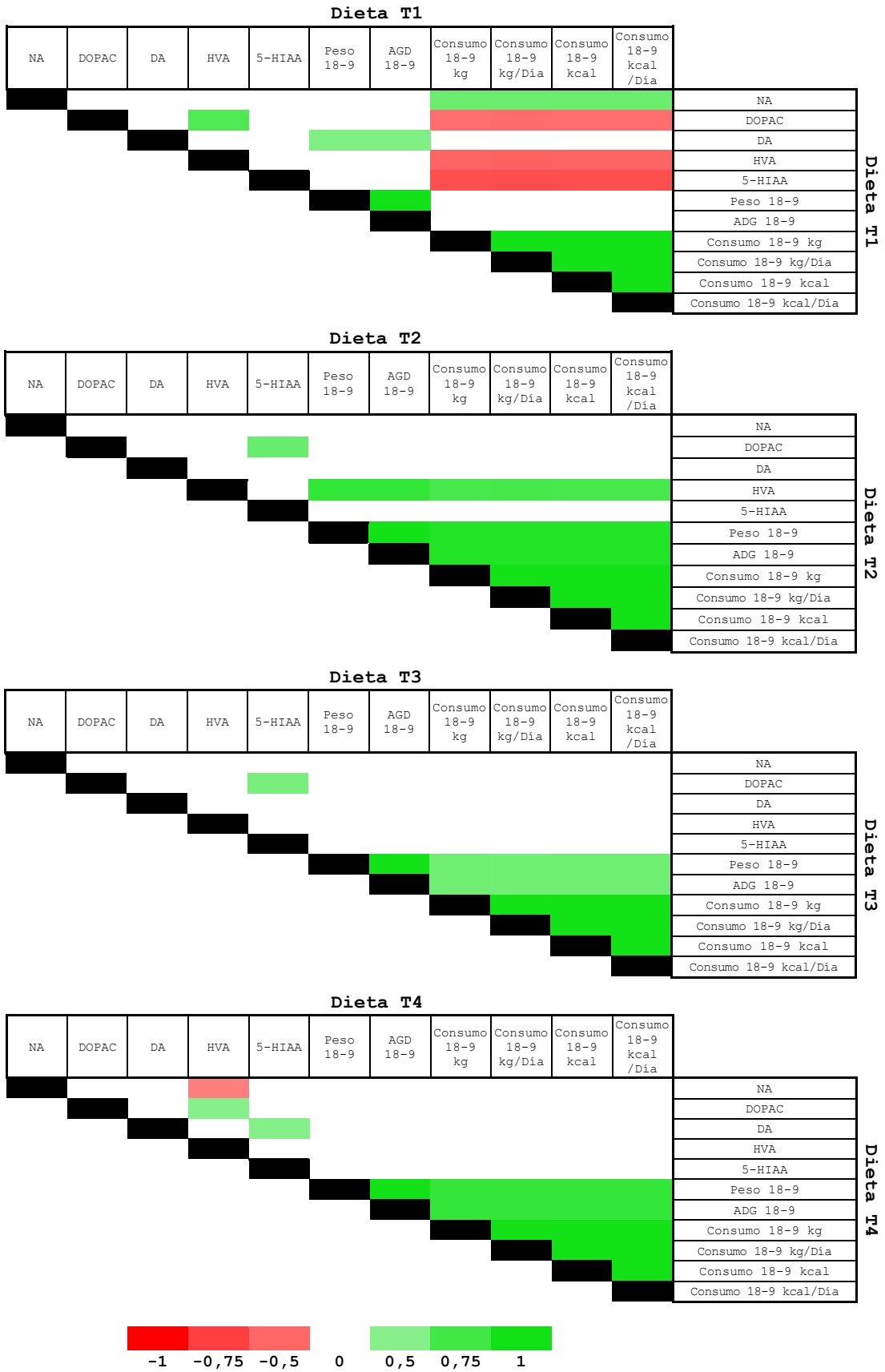


Figura 21: Representaciones gráficas de las correlaciones en formato *heatmap* del hipocampo ventral. Se representan las correlaciones significativas y de $R > 0,500$ entre todos los parámetros analizados en el estudio separados por las dietas.

Estudio 2: Alteraciones producidas por la dieta materna y el tratamiento postnatal con metformina en el perfil de neurotransmisores del sistema nervioso central de lechones

1. Diseño experimental:

Se inseminaron 32 cerdas de raza pura *Landrace* y se les controló la alimentación durante todo el periodo gestacional.

Se diseñaron 3 curvas de alimentación para los tres tercios del periodo gestacional porcino, una curva control, otra reducida al 70 % y otra sobrealimentada al 130 % (Tabla 14). Las cerdas gestantes se estabularon en las instalaciones de granja experimental de IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària, Monells, Girona) en corrales individuales de 1 x 2 m en condiciones de luz natural, una temperatura ambiente constante de 22±3°C y acceso libre al agua.

Tabla 14: Diseño de las tres dietas maternas. El consumo varía durante los tres tercios de la gestación y el consumo total muestra la diferencia entre las tres dietas maternas.

	Primer Tercio	Segundo Tercio	Tercer Tercio	Consumo Total (kg)
Tiempo (Días)	40	45	28	
Consumo (kg/día)				
Control	2,60	1,89	3,36	283,13
Reducción	1,70	1,68	2,00	199,60
Sobrealimentación	3,80	2,42	3,78	366,74

Dos días después del nacimiento se seleccionaron 48 lechones hembra, 16 por condición materna (Figura 22), y se pesaron. Los lechones fueron alimentados *ad libitum* con leche materna, a la mitad de animales por grupo se les dio un placebo y a la otra mitad metformina dosificada en 50 mg/kg/día (siendo un total de 8 lechones por condición materna y tratamiento durante la lactancia). Así pues, se formaron 6 grupos experimentales, lechones Control Placebo (CPla) y Metformina (CMet), lechones Reducción Placebo (RPla) y Metformina (RMet), lechones Sobrealimentación Placebo (SPla) y Metformina (SMet).

Tras 28 días de vida los lechones fueron trasladados al matadero experimental donde se volvieron a pesar y se sacrificaron en grupos de dos, primero aturdiéndolos durante 3 min con 90 % CO₂ y finalmente se desangraron por incisión yugular. Seguidamente, se recolectaron las muestras de plasma y se extrajo el cerebro y se diseccionaron las áreas de interés.

El estudio fue aprobado por IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) de IRTA. Durante todo el periodo experimental los animales fueron inspeccionados diariamente y no se reportó ningún problema de salud.

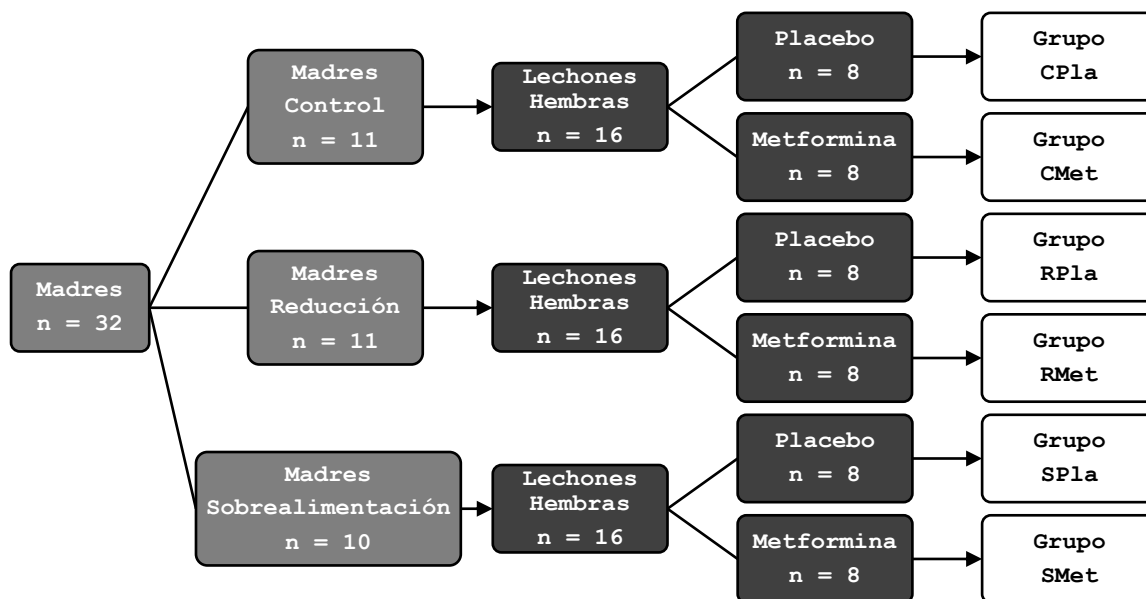


Figura 22: Esquema del diseño experimental.

2. Análisis estadístico:

Los resultados obtenidos en este estudio se analizaron con el programa estadístico IBM SPSS versión 22 (IBM, IL, USA). Se estudió la distribución normal de los datos mediante el test Shapiro-Wilk, transformándolos logarítmicamente cuando era necesario.

Al tener, en este estudio, dos variables (Dieta Madre y Tratamiento Lactancia) se usó el test UNIANOVA con ajuste de Bonferroni para analizar tanto la interacción entre variables como los grupos dentro la misma variable. Cada animal se introdujo como unidad experimental, la significancia bilateral se fijó en $p \leq 0,050$ y la tendencia en $0,050 < p \leq 0,100$.

3. Resultados productivos:

Los lechones se pesaron a los 2 días de nacer y por segunda vez a los 28 días, justo antes del sacrificio (Tabla 15 y Figura 23).

No se observaron diferencias significativas entre ningún grupo al inicio del experimento (día 2, D2).

En cambio, tanto en el peso a 28 días (D28) como en el incremento de peso entre 28 y 2 días (28-2) se observó un aumento significativo del peso ($p = 0,007$ y $p = 0,008$, respectivamente) en lechones cuyas madres tuvieron una dieta de Sobrealimentación respecto a los lechones con dieta materna de Reducción, teniendo en cuenta sólo las dietas maternas en la comparación. Esta diferencia sólo se observa en los grupos de lechones tratados con Placebo ($p = 0,031$),

mientras que estas diferencias significativas desaparecían entre los grupos tratados con Metformina.

Tabla 15: Datos productivos del peso de los lechones en función del tratamiento durante la lactancia y la dieta materna durante el periodo experimental.

	Placebo			Metformina		
	Control	Reducción	Sobre alimentación	Control	Reducción	Sobre alimentación
Peso D2 (kg)	1,64±0,06	1,65±0,08	1,70±0,08	1,73±0,05	1,66±0,08	1,68±0,07
Peso D28 (kg)	8,26±0,29 ^{a,b}	7,15±0,45^a	8,89±0,41^b	7,48±0,36	6,91±0,59	8,17±0,57
Peso 28-2 (kg)	6,62±0,28 ^{a,b}	5,50±0,44^a	7,19±0,39^b	5,76±0,37	5,36±0,53	6,50±0,57

Los pesos se presentan como Media±SE. Las filas muestran el tiempo del pesaje y el incremento. Las columnas dividen los animales según su tratamiento durante la lactancia y la dieta que tuvieron sus madres. Los superíndices y en negrita muestran las significancias entre variables, si a ≠ b p < 0,050.

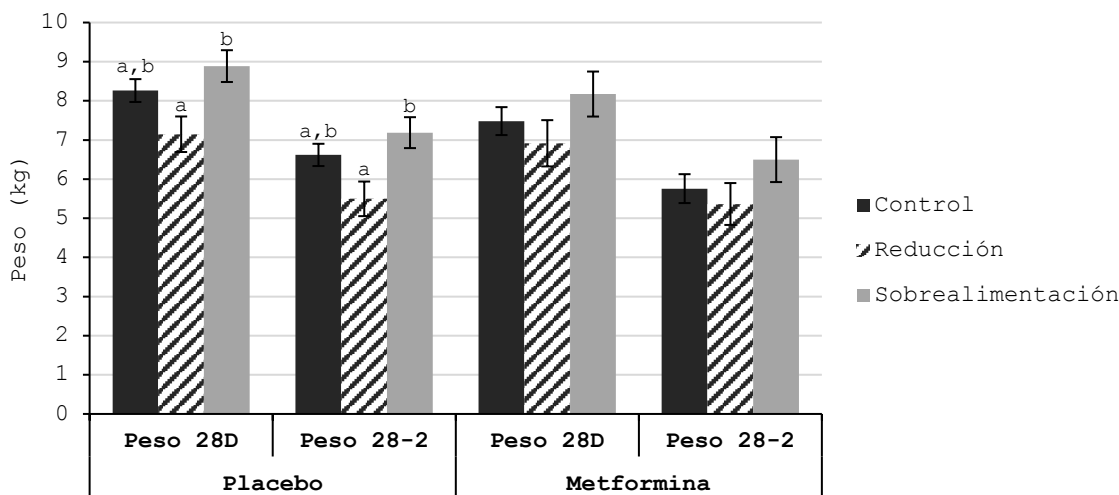


Figura 23: Efecto del tratamiento postnatal con metformina sobre el peso de los lechones según la dieta materna. El eje horizontal divide los animales en función de su tratamiento durante la lactancia. Las barras de error representan ± 1 SE y a ≠ b p < 0,050.

4. Perfil de neurotransmisores:

Se cuantificaron las concentraciones de los neurotransmisores y sus metabolitos en seis áreas cerebrales: Cuerpo estriado (CES), hipotálamo (HPT), hipocampo ventral y dorsal (HCV y HCD), amígdala y corteza prefrontal (CPF). Aparte de los neurotransmisores individuales, se analizó también la concentración total de la vía dopaminérgica (TotalDA, la suma de las concentraciones de L-DOPA, DA, DOPAC, HVA y 3-MT) y la concentración total de catecolaminas (TotalCAT, la suma de las concentraciones de NA, L-DOPA, DA, DOPAC, HVA y 3-MT). Los resultados completos se muestran en la Tabla 16, mientras que las diferencias significativas entre las concentraciones de neurotransmisores se representaron en las Figuras 24, 25 y 26.

En la amígdala no se encontraron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones estadísticas, por lo que no se muestran los resultados.

4.1. Efecto de la dieta materna en lechones tratados con Placebo:

Al comparar los efectos de la dieta materna en el grupo de lechones tratados con Placebo no se observaron diferencias significativas en ningún neurotransmisor de la CPF o el HCV. En las demás áreas, en ningún caso se encontraron diferencias significativas en las indolaminas (5-HT y 5-HIAA).

Sin embargo, en el hipotálamo se observó un aumento significativo en la concentración de NA del grupo RPla y SPla respecto al CPla ($p = 0,046$ y $p = 0,010$, respectivamente). Incrementos similares se presentaron en TotalCAT (RPla versus CPla $p = 0,022$ y SPla versus CPla $p = 0,006$). No se observaron otras diferencias significativas.

El cuerpo estriado (CES) sólo mostró una disminución significativa en la concentración de 3-MT del grupo RPla respecto al grupo SPla ($p = 0,033$).

La concentración de DOPAC disminuyó significativamente en el hipocampo dorsal (HCD) del grupo de lechones SPla respecto al grupo RPla ($p = 0,039$). A pesar de tratarse de diferencias que no llegan a ser significativas, se observa el mismo patrón en los otros neurotransmisores, incluso también hipocampo ventral (Figura 24).

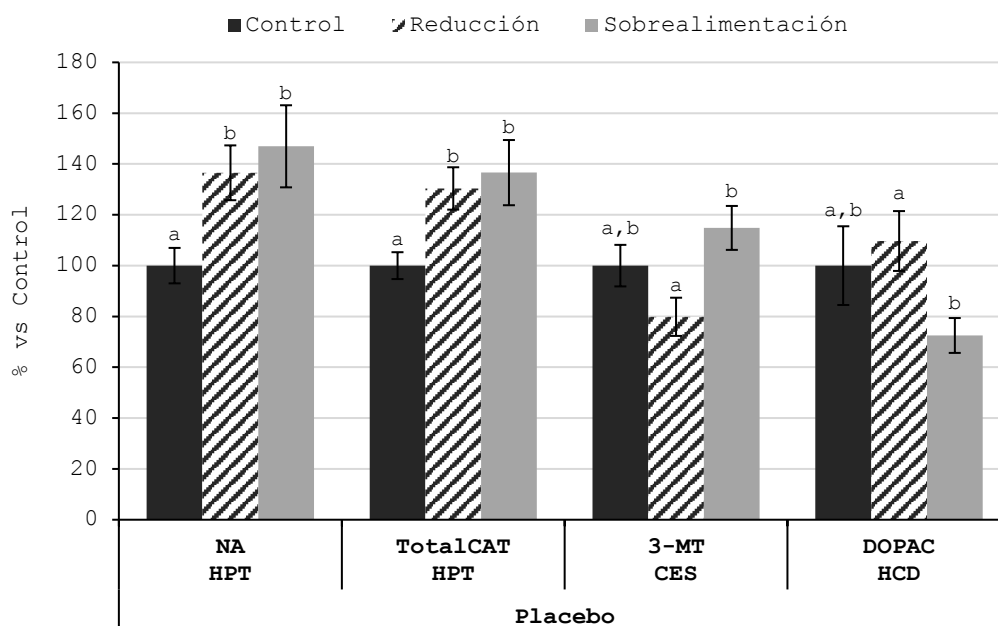


Figura 24: Efecto de la dieta materna sobre la concentración de neurotransmisores o metabolitos en lechones tratados con Placebo. Sólo se representan los que presentaron diferencias significativas en la comparación entre dietas maternas. Los valores se muestran en % con relación al grupo de lechones cuyas madres tuvieron una dieta Control. El eje horizontal muestra el neurotransmisor o metabolito y el área cerebral al que pertenece. Las barras de error representan ± 1 SE y $a \neq b$ $p < 0,050$.

4.2. Efecto de la dieta materna en lechones tratados con Metformina:

En el grupo de lechones tratados con Metformina (CMet, RMet y SMet), se observaron efectos de la dieta materna distintos que en los lechones tratados con Placebo. A pesar de ello tampoco se encontraron en ningún caso diferencias en las concentraciones de indolaminas.

Así pues, en los grupos de lechones tratados con Metformina no hubo diferencias significativas en el hipotálamo ni el hipocampo ventral de ninguna comparación entre dietas maternas, mientras que el CES mostró disminuciones en las concentraciones de DOPAC y HVA en el grupo SMet respecto al grupo RMet ($p = 0,026$ y $0,036$).

En el hipocampo dorsal también hubo una disminución significativa en las concentraciones de HVA y TotalDA en el grupo SMet respecto al grupo CMet ($p = 0,032$ y $0,021$). El mismo patrón se observó en la corteza prefrontal en la concentración de NA, que presentó una disminución significativa en el grupo SMet respecto al grupo RMet ($p = 0,048$) (Figura 25).

En definitiva, el tratamiento con metformina promueve una disminución en los niveles de metabolitos de la vía dopaminérgica o noradrenérgica en áreas cerebrales no hipotalámicas en lechones cuyas madres tuvieron una dieta de Sobrealimentación.

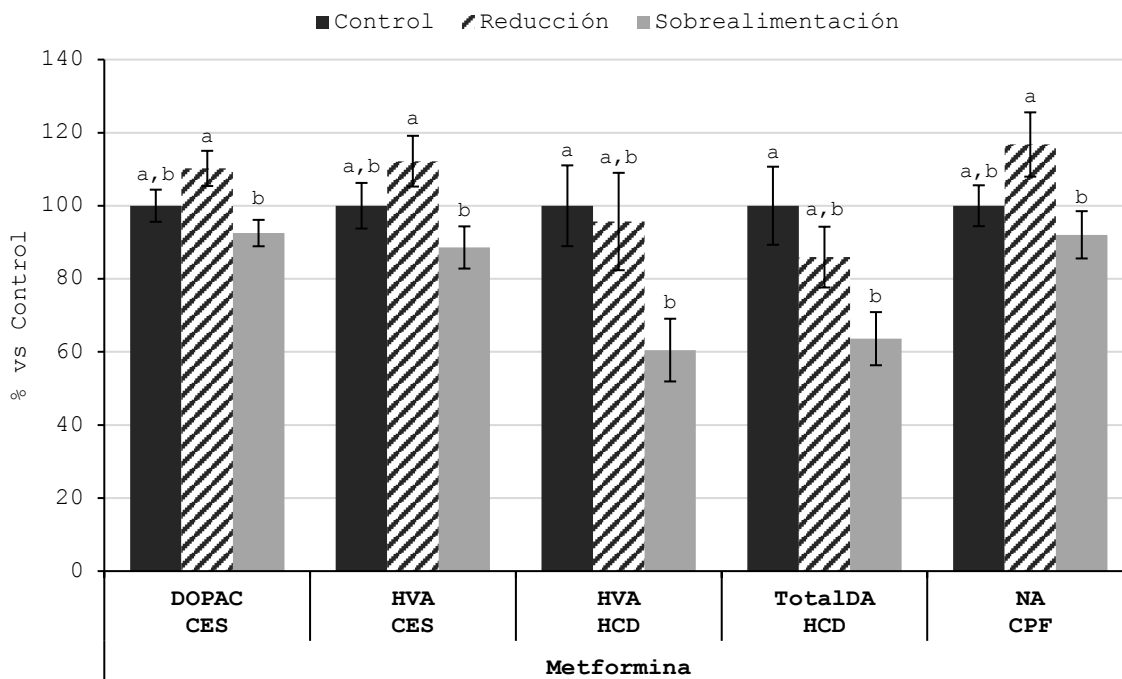


Figura 25: Efecto de la dieta materna sobre la concentración de neurotransmisores o metabolitos en lechones tratados con Metformina. Sólo se representan los que presentaron diferencias significativas en la comparación entre dietas maternas. Los valores se muestran en % con relación al grupo de lechones cuyas madres tuvieron una dieta Control. El eje horizontal muestra el neurotransmisor o metabolito y el área cerebral al que pertenece. Las barras de error representan ± 1 SE y $a \neq b$ $p < 0,050$.

4.3. Tratamientos durante la lactancia:

Al comparar los efectos de los tratamientos de Placebo y Metformina en los lechones con misma dieta materna se observaron varias diferencias en la concentración de catecolaminas (Figura 26).

En la dieta materna Control, las concentraciones de NA y TotalCAT aumentaron significativamente en el grupo CMet respecto al grupo CPla en el hipotálamo ($p = 0,010$ y $0,012$). Por otro lado, en el hipocampo ventral se mostró el patrón inverso, una disminución significativa de la concentración de NA en el grupo CMet respecto al grupo CPla ($p = 0,042$).

La dieta materna de Reducción sólo mostró diferencias en los niveles de NA de la corteza prefrontal, observándose un aumento significativo en el grupo RMet respecto al grupo RPla ($p = 0,025$).

Por último, en la dieta materna de Sobrealimentación, sólo se observaron diferencias en el cuerpo estriado. Mostrando disminuciones significativas de las concentraciones de HVA y TotalDA en el grupo SMet respecto al grupo SPla ($p = 0,017$ y $0,025$, respectivamente).

En general, estos resultados muestran que el tratamiento con Metformina eleva los niveles noradrenérgicos del hipotálamo y la corteza prefrontal en lechones cuyas madres no tuvieron dietas de Sobrealimentación, mientras que disminuye los niveles dopaminérgicos del cuerpo estriado en dietas maternas de Sobrealimentación.

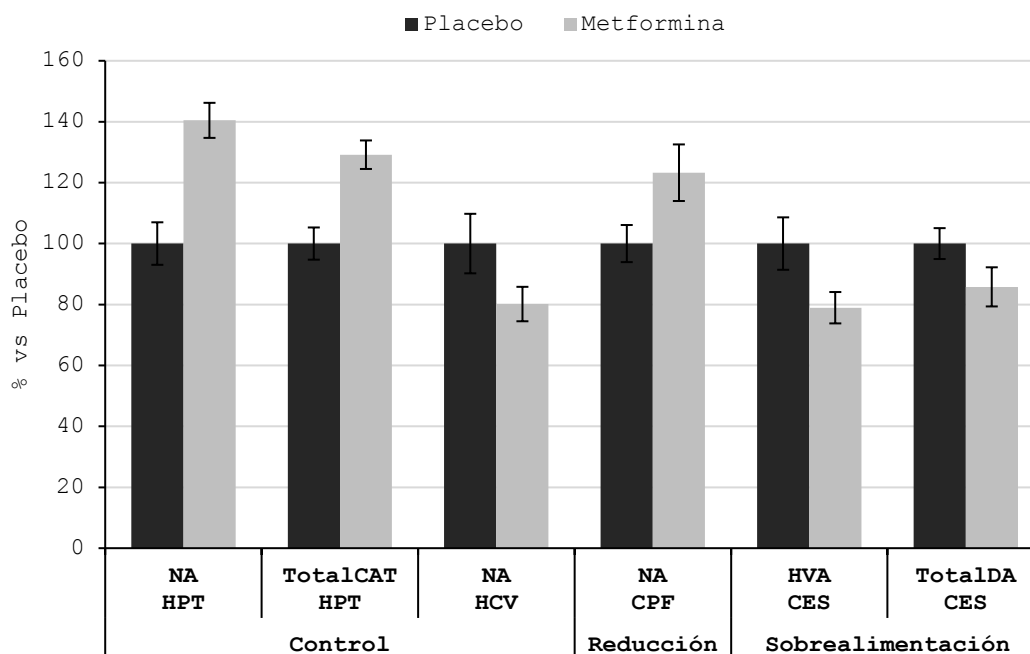


Figura 26: Efecto del tratamiento con Metformina durante la lactancia sobre la concentración de neurotransmisores o metabolitos según la dieta materna. Sólo se representan los que presentaron diferencias significativas en la comparación entre el tratamiento en la lactancia. Los valores se muestran en % con relación al grupo de lechones tratados con Placebo. El eje horizontal muestra el neurotransmisor o metabolito, el área cerebral al que pertenece y la dieta que tuvo la madre. Las barras de error representan ± 1 SE.

Tabla 16: Concentración de neurotransmisores y metabolitos de las distintas áreas cerebrales en función del tratamiento durante la lactancia y la dieta materna.

	NT (ng/g Tejido)	Placebo			Metformina		
		Control	Reducción	Sobre alimentación	Control	Reducción	Sobre alimentación
Cuerpo Estriado	NA	4629±473	4889±421	4375±287	4748±416	5791±534	4867±291
	L-DOPA	109,8±9,05	111,1±10,7	123,9±11,6	109,9±15,3	126,0±12,3	118,1±11,9
	DOPAC	3292±187	3132±100	3212±155	3173±139	3497±153^a	2936±115^b
	DA	8135±293	7430±594	7949±437	7733±562	8082±648	7173±811
	HVA	6478±323	6544±441	6986±601^a	6226±389	6985±432	5515±359^b
	3-MT	702,3±57,4 ^{a,b}	560,8±52,8^a	806,5±60,7^b	626,0±67,7	627,6±60,5	624,6±86,5
	TotalDA	18717±574	17778±704	19078±967^a	17868±819	19318±1113	16366±1226^b
	TotalCAT	23346±937	22667±661	23453±974	22615±987	25109±1104^a	21233±1219^b
	5-HIAA	257,9±14,2	279,9±17,8	327,1±16,9	243,1±15,8	279,3±24,6	257,8±26,5
	5-HT	271,9±20,8	275,8±30,2	318,9±21,5	277,1±35,3	302,8±46,9	265,1±39,1
Hipotálamo	NA	1584±111^a	2163±171^{b,c}	2329±256^{b,c}	2225±91^{b,c,d}	2547±105	2292±245
	L-DOPA	191,2±28,0	258,6±19,0	283,7±28,4	244,9±19,3	326,7±28,6	300,5±37,5
	DOPAC	128,9±12,4	152,4±11,0	139,4±11,4	128,0±11,1	152,0±6,0	148,2±7,5
	DA	382,9±39,3	456,8±42,8	490,1±65,8	438,2±26,2	522,7±18,4	463,4±36,2
	HVA	362,9±54,2	423,5±50,8	378,0±19,1	386,4±36,9	382,7±25,4	363,7±30,4
	TotalDA	1066±92,4	1291±100	1291±97,3	1197±82,1	1384±33,7	1276±37,8
	TotalCAT	2650±140^a	3455±221^{b,c}	3620±340^{b,c}	3423±124^{b,c,d}	3931±127	3568±250
	5-HIAA	260,4±35,2	306,7±19,2	277,1±18,3	249,0±16,3	261,8±12,1	297,2±39,5
	5-HT	640,1±65,3	825,5±83,9	700,2±56,1	672,3±55,8	817,1±56,9	795,4±51,9
Hipocampo Ventral	NA	220,1±21,5^a	193,1±14,1	200,9±14,2	176,4±12,4^b	216,3±13,9	198,8±9,41
	DOPAC	21,32±4,17	24,94±2,30	20,92±3,31	24,52±3,26	24,69±0,89	16,45±2,05
	DA	32,86±7,17	43,21±3,72	35,77±2,60	42,63±4,93	41,29±5,22	38,66±4,46
	HVA	66,94±9,92	64,22±9,18	48,35±6,61	61,39±6,67	71,63±5,23	55,30±8,49
	TotalDA	121,1±16,8	132,4±10,7	105,0±8,19	128,5±9,52	137,6±6,79	110,4±11,8
	TotalCAT	341,3±28,3	325,4±7,14	305,9±18,6	305,0±14,1	353,9±13,7	309,2±19,0
	5-HIAA	137,9±15,3	141,5±7,40	138,3±5,37	125,9±9,62	124,9±6,01	130,4±10,5
	5-HT	394,8±25,6	375,4±20,7	371,9±26,6	331,0±30,8	368,4±36,9	347,9±15,8
	Hipocampo Dorsal	NA	176,6±18,3	165,2±15,3	157,4±17,4	149,3±6,55	168,5±17,1
DOPAC		22,59±3,50 ^{a,b}	24,78±2,66^a	16,38±1,55^b	25,51±3,65	21,13±1,18	17,32±1,78
DA		19,33±1,74	19,68±2,36	17,91±1,49	28,36±6,85	18,47±2,17	19,10±3,11
HVA		68,33±12,24	71,83±11,82	50,38±2,97	68,75±7,60^a	65,78±9,16	41,59±5,90^b
TotalDA		110,2±14,4	116,3±13,3	84,7±4,27	122,6±13,1^a	105,4±10,2	78,01±8,92^b
TotalCAT		286,9±21,3	281,5±25,7	242,1±18,1	271,9±16,1	273,9±21,2	231,6±15,8
5-HIAA		101,3±12,4	115,2±7,54	109,9±3,93	99,16±6,16	96,91±9,65	95,43±8,01
5-HT		192,3±25,0	244,5±25,7	226,0±22,1	217,0±13,5	214,4±22,8	204,2±11,4
Amígdala		NA	149,2±27,8	182,5±18,7	117,6±15,3	174,2±53,7	140,4±17,1
	DOPAC	122,4±16,1	175,4±21,5	133,0±16,7	169,5±39,6	134,1±21,7	121,0±18,5
	DA	419,3±100	587,5±78,3	398,3±68,2	511,5±106	398,1±75,3	466,8±98,2
	HVA	300,0±37,4	399,8±46,4	313,8±19,1	390,9±105	304,3±32,8	295,6±44,5
	TotalDA	841,7±150	1163±142	845,1±96,1	1072±248	836,5±123	883,4±151
	TotalCAT	990,8±171	1345±159	962,7±109	1246±300	976,9±138	1038±173
	5-HIAA	150,7±13,5	218,7±26,0	189,3±20,2	194,0±51,9	146,4±15,9	165,5±30,4
Corteza Prefrontal	5-HT	433,2±44,2	651,7±56,1	594,7±105	679,7±217	495,6±63,0	543,2±84,7
	NA	127,8±7,01	135,1±8,23^{a,c}	135,4±12,8	142,6±7,98	166,5±12,55^b	131,3±9,23^{a,c}
	DOPAC	34,70±5,35	42,21±3,58	30,78±4,73	82,72±50,01	56,23±21,49	34,96±2,87
	DA	35,69±5,10	43,30±3,80	36,81±4,18	141,1±100	90,09±52,4	37,14±1,98
	HVA	111,1±25,0	120,7±17,5	105,9±12,0	197,6±93,1	171,9±75,1	77,79±5,45
	TotalDA	181,5±34,9	206,3±20,0	173,5±19,0	421,4±243	318,2±149	149,9±6,64
	TotalCAT	309,3±37,9	341,4±20,6	308,9±29,6	564,0±250	484,8±155	281,2±14,8
5-HIAA	86,03±10,6	87,73±6,35	94,44±6,39	85,52±8,80	84,21±7,67	76,7±5,48	
5-HT	119,3±9,20	125,0±10,6	136,6±14,8	140,0±17,1	124,4±15,6	108,4±16,8	

Las concentraciones se presentan como Media±SE. Las filas muestran los neurotransmisores y los metabolitos de cada área cerebral. Las columnas dividen los animales en las variables del estudio. Los superíndices y en negrita muestran las significancias entre variables, si a ≠ b ≠ c ≠ d p < 0,050.

5. Cuantificación del Neuropeptido Y en hipotálamo:

A partir de los homogenados de hipotálamo, se determinó la concentración del Neuropeptido Y (NPY) implicado en la ingesta con efecto orexigénico. La cuantificación se hizo mediante un kit comercial ELISA específico para especie porcina (Tabla 17 y Figura 27).

Tabla 17: Concentración de neuropeptido Y en el hipotálamo en función del tratamiento durante la lactancia y la dieta materna.

ng/g Tejido	Placebo			Metformina		
	Control	Reducción	Sobre alimentación	Control	Reducción	Sobre alimentación
NPY	47,56±4,60	54,99±7,05	46,85±4,49	49,60±2,44	48,78±6,19	46,48±4,26

Las concentraciones se presentan como Media±SE. Las columnas dividen los animales en las variables del estudio.

La dieta materna reducida (RPla) provocó un aumento en los niveles de NPY en el hipotálamo de los lechones, mientras que la dieta materna de Sobrealimentación (SPla) no causó ningún cambio respecto al grupo control (CPla). Sin embargo, en los lechones tratados con Metformina, no se observaron cambios entre las dietas maternas, por lo que la concentración de NPY se normalizó entre las dietas maternas de los lechones tratados con Metformina. Destacando, en esta normalización, el grupo de lechones RMet comparándolo con el grupo RPla.

No obstante, debido a la alta variabilidad interindividual ningunas de las comparaciones estadísticas mostraron el nivel de significancia estadística requerido.

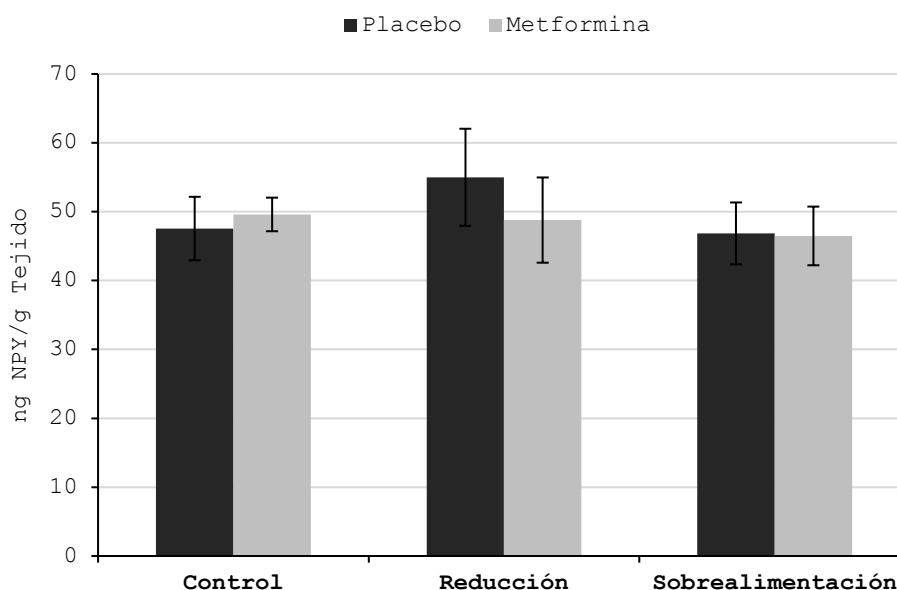


Figura 27: Efecto del tratamiento con Metformina durante la lactancia sobre la concentración de NPY en el hipotálamo según la dieta materna. El eje horizontal divide los lechones según la dieta que tuvieron las madres. Las barras de error representan ± 1 SE.

6. Determinaciones en plasma:

Las muestras de sangre obtenidas durante el sacrificio de los lechones fueron procesadas para determinar las concentraciones plasmáticas de catecolaminas (NA y Adren) y de aminoácidos libres.

6.1. Catecolaminas en plasma:

Tras la extracción de monoaminas del plasma con alúmina se cuantificaron los niveles de NA y Adren existentes mediante HPLC (Tabla 18). En ningún caso se observaron diferencias significativas en los niveles de NA entre los distintos grupos.

En los grupos de lechones tratados con Placebo, la dieta materna sobrealimentada provocó una disminución no significativa de los niveles plasmáticos de Adren respecto a las otras dos dietas. Por otro lado, en los animales con el tratamiento de Metformina, la concentración de Adren disminuye en los tres grupos de lechones con distinta alimentación materna comparándola con sus respectivas dietas maternas en el tratamiento con Placebo (CMet versus CPla, RMet versus RPla y SMet versus SPla). No obstante, de estas disminuciones sólo resultó ser significativa en la dieta materna de Reducción (grupo RMet respecto RPla, $p = 0,023$) (Figura 28).

Tabla 18: Concentraciones de NA y Adren en el plasma según el tratamiento durante la lactancia y la dieta materna.

pg/ μ L Plasma	Placebo			Metformina		
	Control	Reducción	Sobre alimentación	Control	Reducción	Sobre alimentación
NA	795 \pm 146	1055 \pm 159	908,6 \pm 152	581,5 \pm 128	815,4 \pm 227	869,6 \pm 183
Adren	189,5 \pm 42,5	203\pm28,6^a	127,6 \pm 13,7	120,3 \pm 19,3	136,0\pm40,7^b	108,8 \pm 19,0

Las concentraciones se presentan como Media \pm SE. Las filas muestran las catecolaminas. Las columnas dividen los animales en las variables del estudio. Los superíndices y en negrita muestran las significancias entre variables, si $a \neq b$ $p < 0,050$.

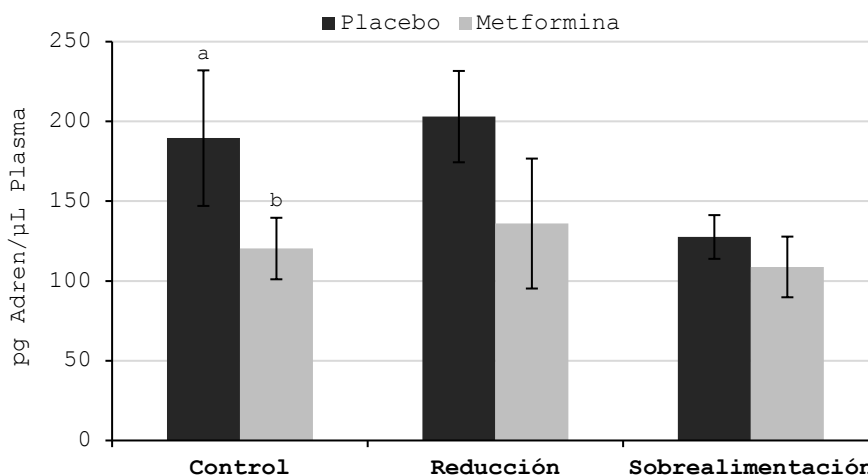


Figura 28: Efecto del tratamiento con Metformina durante la lactancia sobre la concentración de Adren plasmática según la dieta materna. El eje horizontal divide los lechones según la dieta que tuvieron las madres. Las barras de error representan ± 1 SE y $a \neq b$ $p < 0,050$.

6.2. Aminoácidos libres en plasma:

Tras la derivatización con el reactivo AQC, que permite la detección colorimétrica de los aminoácidos, se cuantificaron los aminoácidos proteínogénicos libres presentes en el plasma mediante HPLC (Tabla 19).

No se observaron diferencias significativas en las concentraciones de aminoácidos obtenidas este estudio al compararlas entre los distintos tratamientos de los lechones o dietas maternas.

Tabla 19: Concentraciones de aminoácidos libres en el plasma según el tratamiento durante la lactancia y la dieta materna.

Aminoácido (μM)	Placebo			Metformina		
	Control	Reducción	Sobre alimentación	Control	Reducción	Sobre alimentación
Asp	39,76 \pm 8,26	41,06 \pm 9,45	41,94 \pm 6,39	34,10 \pm 5,45	37,64 \pm 9,39	37,16 \pm 7,68
Ser/Asn	278,8 \pm 15,0	272,4 \pm 23,0	291,6 \pm 13,5	259,6 \pm 16,1	278,8 \pm 14,6	304,0 \pm 19,7
Glu	529,2 \pm 46,5	517,0 \pm 35,7	551,9 \pm 28,3	440,4 \pm 61,8	404,8 \pm 58,6	512,4 \pm 125
Gly	1057 \pm 57,6	1046 \pm 90,2	1176 \pm 66,7	1004 \pm 86,3	1131 \pm 91,2	1203 \pm 59,9
His/Gln	580,3 \pm 28,8	510,2 \pm 21,6	548,9 \pm 17,2	528,7 \pm 24,4	543,0 \pm 23,6	592,1 \pm 29,5
Arg	308,0 \pm 19,0	299,4 \pm 34,2	297,9 \pm 19,7	274,3 \pm 20,7	282,6 \pm 13,8	335,1 \pm 23,4
Thr	265,0 \pm 23,0	261,6 \pm 18,7	289,1 \pm 21,7	266,3 \pm 18,8	298,9 \pm 17,2	291,0 \pm 8,44
Ala	353,5 \pm 76,0	346,9 \pm 77,0	303,0 \pm 39,3	353,1 \pm 77,8	320,5 \pm 48,7	308,2 \pm 49,4
Pro	186,9 \pm 20,6	166,7 \pm 12,9	157,0 \pm 18,4	184,3 \pm 9,26	175,9 \pm 6,93	178,8 \pm 7,44
Cys	258,6 \pm 22,8	278,3 \pm 12,5	318,9 \pm 14,6	261,3 \pm 10,3	258,8 \pm 14,2	283,1 \pm 20,0
Tyr	111,7 \pm 9,26	110,8 \pm 5,57	112,7 \pm 3,64	105,8 \pm 3,93	110,1 \pm 5,37	112,1 \pm 5,11
Val	351,9 \pm 17,3	331,0 \pm 23,6	330,2 \pm 16,1	342,0 \pm 12,4	368,6 \pm 22,0	351,0 \pm 21,8
Met	59,14 \pm 5,83	52,79 \pm 4,55	56,84 \pm 2,98	58,22 \pm 3,95	52,37 \pm 2,05	54,69 \pm 2,44
Lys	259,7 \pm 19,0	231,6 \pm 9,82	238,1 \pm 12,7	258,1 \pm 15,8	262,4 \pm 13,0	235,8 \pm 16,4
Ile	189,8 \pm 14,0	189,4 \pm 11,7	166,2 \pm 6,31	205,0 \pm 11,5	199,2 \pm 11,2	179,1 \pm 12,3
Leu	206,9 \pm 8,77	198,2 \pm 13,5	195,7 \pm 8,57	206,2 \pm 5,59	215,9 \pm 13,2	209,2 \pm 12,5
Phe	118,6 \pm 9,48	117,9 \pm 4,27	118,3 \pm 4,18	114,8 \pm 6,19	112,8 \pm 3,14	113,7 \pm 3,80
Trp	44,34 \pm 2,51	45,46 \pm 2,83	48,43 \pm 2,86	43,16 \pm 2,14	46,54 \pm 2,29	49,96 \pm 1,37

Las concentraciones se presentan como Media \pm SE. Las columnas dividen los animales en las variables del estudio.

Capítulo 3: Alteraciones en el perfil de neurotransmisores y en el proteoma producidas por la restricción del crecimiento intrauterino en un modelo porcino

Estudio 1: Efecto de la restricción del crecimiento intrauterino en el perfil de neurotransmisores del hipocampo y la amígdala

1. Diseño experimental:

Este estudio partió de 21 cerdas Ibéricas gestantes inseminadas con machos Duroc estabuladas en la granja experimental de INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid) que fueron alimentadas con dietas estándar a base de grano ajustadas para suplir por completo las necesidades energéticas individuales. A partir del día 35 de gestación se les redujo a todas las cerdas la cantidad de comida por día hasta llegar a suplir el 50 % de sus necesidades energéticas, o sea una restricción del 50 %. Al reducir la cantidad de comida durante la gestación se produjo un efecto de restricción intrauterina por malnutrición en los fetos.

Se seleccionaron un total de 24 lechones neonatos en función de su sexo y peso. Inmediatamente después de la selección fueron sacrificados por aturdimiento y desangrado siguiendo la política de protección animal española RD53/2013 vinculada a la europea 2010/63/UE. Una vez sacrificados se extrajo el cerebro del cráneo y se diseccionó el hipocampo y la amígdala.

Los grupos de estudio se establecieron en función del sexo y el peso. Se calculó la media y desviación estándar de los pesos de los 24 lechones (1319 ± 313 gr), los lechones que pesaron menos de la media restándole una desviación estándar (≤ 1006 gr) fueron catalogados como bajo peso al nacer (LBW, "Low Birth Weight") mientras que los que no cumplían ese requisito fueron peso normal al nacer (NBW, "Normal Birth Weight"). Así pues, teniendo en cuenta el sexo, los cuatro grupos fueron 10 lechones NBW, 5 hembras y 5 machos, y 14 lechones LBW, 8 hembras y 6 machos.

Este estudio fue aprobado por el comité ético en investigación animal IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) de INIA. Las cerdas gestantes estabuladas fueron examinadas diariamente y no se reportaron problemas de salud durante el periodo experimental.

2. Análisis estadístico:

Los resultados de la cuantificación de neurotransmisores obtenidos en este estudio se analizaron con el programa estadístico IBM SPSS versión 22 (IBM, IL, USA). La distribución normal de los datos se estudió mediante el test Shapiro-Wilk, los datos fueron transformados logarítmicamente si no presentaban una distribución normal.

Las dos variables del estudio, sexo y peso, se analizaron usando el test UNIANOVA con ajuste de Bonferroni, que permite analizar las interacciones entre variables y entre grupos de la misma variable. Cada lechón fue introducido como unidad experimental, la significancia bilateral se fijó en $p \leq 0,050$ mientras que la tendencia en $0,050 < p \leq 0,100$.

3. Perfil de neurotransmisores:

Los neurotransmisores y los metabolitos de las áreas cerebrales del hipocampo y la amígdala, diseccionadas en el sacrificio, se cuantificaron mediante HPLC. Los resultados se analizaron comparándolos entre los grupos del estudio

3.1. Efectos de la restricción intrauterina:

Las concentraciones de neurotransmisores fueron comparadas entre lechones NBW y LBW sin tener en cuenta su sexo (Tabla 20 y Figura 29).

El hipocampo mostró diferencias significativas sólo en neurotransmisores catecolaminérgicos y sus metabolitos. Se observaron aumentos significativos en los niveles de DOPAC y HVA de los lechones LBW respecto a los lechones NBW (ambos de $p = 0,001$). Además, la suma de la vía dopaminérgica TotalDA y de las catecolaminas TotalCAT también presentaron aumentos significativos en animales LBW respecto a los NBW ($p = 0,001$ y $p = 0,003$, respectivamente). Por otro lado, en la concentración de NA se observó el patrón opuesto, es decir una disminución significativa en los animales LBW respecto a los NBW ($p = 0,022$). La ratio de degradación de la DA (HVA+DOPAC/DA) también aumentó significativamente en animales LBW respecto a NBW ($p < 0,001$). No se observaron cambios significativos ni en la DA ni en la 5-HT o su metabolito 5-HIAA.

La amígdala mostró el mismo patrón, con aumentos significativos en las concentraciones de DOPAC, HVA, TotalDA y TotalCAT ($p = 0,041$, $p = 0,008$, $p = 0,051$ y $p = 0,045$, respectivamente). No obstante, no se observaron diferencias en los niveles de NA, 5-HT o 5-HIAA.

Tabla 20: Concentraciones de neurotransmisores y metabolitos del hipocampo y la amígdala según el peso de los lechones al nacer.

NT (ng/g Tejido)	NBW	LBW	
Hipocampo	NA	44,72±5,78^a	27,83±3,59^b
	DOPAC	36,89±2,28^a	69,24±6,53^b
	DA	50,79±4,78	48,97±3,67
	HVA	72,74±11,9^a	264,2±37,5^b
	(HVA+DOPAC)/DA	2,36±0,33^a	6,80±0,72^b
	TotalDA	160,4±12,0^a	382,4±45,1^b
	TotalCAT	205,1±11,7^a	410,2±46,4^b
	5-HIAA	112,0±9,54	134,2±10,6
	5-HT	81,11±12,7	76,01±7,96
	Amígdala	NA	38,28±6,23
DOPAC		215,2±53,2^a	379,5±48,5^b
DA		238,1±52,5	274,8±32,0
HVA		324,2±75,0^a	672,7±85,8^b
(HVA+DOPAC)/DA		3,22±0,58	4,22±0,50
TotalDA		874,1±166^a	1327±124^b
TotalCAT		913,8±163^a	1371±122^b
5-HIAA		415,6±59,7	578,2±71,6
5-HT		249,3±38,0	294,3±32,4

Las concentraciones se presentan como Media±SE. Las filas muestran los neurotransmisores y metabolitos del hipocampo y la amígdala. Las columnas dividen los animales en función del peso de los lechones al nacer. Los superíndices y en negrita muestran las significancias entre variables, si a ≠ b p < 0,050.

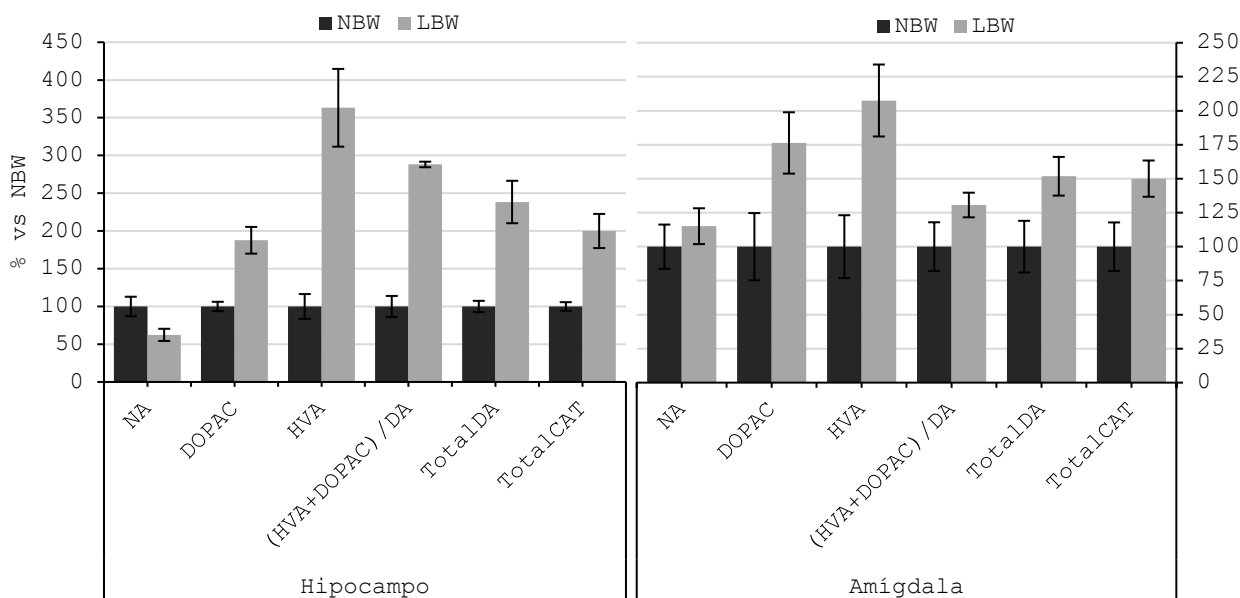


Figura 29: Efecto de la IUGR sobre la concentración de neurotransmisores o metabolitos en el hipocampo y la amígdala. Sólo se representan los que presentaron diferencias significativas en la comparación entre pesos. Los valores se muestran en % con relación a NBW. El eje horizontal divide las dos áreas cerebrales. Las barras de error representan ± 1 SE.

3.2. Efectos de la restricción intrauterina y el sexo:

Teniendo en cuenta la variable del sexo se compararon los niveles de los neurotransmisores en función del peso de los lechones discriminando entre machos y hembras (Tabla 21 y Figura 30).

El área hipocámpal mostró las mismas diferencias significativas que en la comparación sin tener en cuenta el sexo, aumentos significativos en los niveles de DOPAC, HVA, TotalDA y TotalCAT en lechones LBW respecto a NBW tanto en hembras como en machos (en hembras $p = 0,036, 0,003, 0,007$ y $0,014$, en machos $p = 0,002, 0,038, 0,024$ y $0,039$). El mismo patrón se observó para la ratio de degradación de la DA ((HVA+DOPAC)/DA), aumentando significativamente en los LBW respecto a los NBW en ambos sexos (machos $p = 0,017$ y hembras $p = 0,001$). La excepción fue la NA que aumentó con tendencia estadística sólo en las hembras ($p = 0,058$). Al comparar entre hembras y machos del mismo peso, las diferencias estadísticas en el hipocampo se reducen a un aumento en la concentración de DA de las hembras NBW respecto los machos NBW ($p = 0,016$).

Por otro lado, en la amígdala, al tener en cuenta la variable sexo se observó el mismo perfil de NTs en ambos sexos. En este caso, aunque las concentraciones seguían siendo mayores en los animales LBW, las diferencias no llegaron a ser significativas como lo eran al comparar todos los animales, posiblemente por haber disminuido el número de animales por grupo. La única variable con diferencia significativa fue el HVA que mostró un aumento significativo en lechones LBW respecto a NBW, pero sólo en hembras ($p = 0,018$). Sin embargo, no se encontraron diferencias en ningún caso al comparar hembras y machos del mismo peso.

Tabla 21: Concentraciones de neurotransmisores y metabolitos del hipocampo y la amígdala según el sexo y el peso de los lechones al nacer.

NT (ng/g Tejido)	Machos		Hembras		
	NBW	LBW	NBW	LBW	
Hipocampo	NA	43,20±6,66	28,20±5,48	46,23±10,2	27,55±5,08
	DOPAC	34,87±3,49^a	76,09±9,39^b	38,91±3,04^a	64,10±9,08^b
	DA	40,05±1,78^a	50,21±5,98	61,52±6,49^b	48,04±4,94
	HVA	81,29±17,3^a	233,8±31,4^b	64,19±17,5^a	287,0±62,14^b
	(HVA+DOPAC)/DA	2,90±0,44^a	6,44±1,07^b	1,82±0,40^a	7,08±1,03^b
	TotalDA	156,2±19,7^a	360,1±42,6^b	164,6±14,8^a	399,1±74,4^b
	TotalCAT	199,4±17,9^a	388,3±43,4^b	210,9±16,8^a	426,7±76,8^b
	5-HIAA	95,67±7,40	136,5±13,8	128,4±14,9	132,5±16,3
	5-HT	66,54±11,8	78,51±14,2	95,68±22,0	74,14±9,87
Amígdala	NA	43,92±12,5	45,80±7,33	33,78±5,84	42,30±7,56
	DOPAC	240,9±82,6	409,6±66,0	189,5±74,7	349,4±75,2
	DA	219,9±77,5	282,7±42,7	256,3±81,5	267,0±51,5
	HVA	309,9±71,9	573,5±78,9	338,4±141^a	772,0±149^b
	(HVA+DOPAC)/DA	3,72±0,80	3,76±0,47	2,74±0,89	4,68±0,88
	TotalDA	867,3±220	1266±122	881,0±283	1388±227
	TotalCAT	911,2±218	1312±121	916,3±277	1431±222
	5-HIAA	373,8±113	472,7±34,7	457,3±48,2	683,8±130
	5-HT	236,7±42,2	310,1±41,2	259,3±63,8	270,5±57,4

Las concentraciones se presentan como Media±SE. Las filas muestran los neurotransmisores y metabolitos del hipocampo y la amígdala. Las columnas dividen los animales en función del sexo y el peso de los lechones al nacer. Los superíndices y en negrita muestran las significancias entre variables, si $a \neq b$ $p < 0,050$.

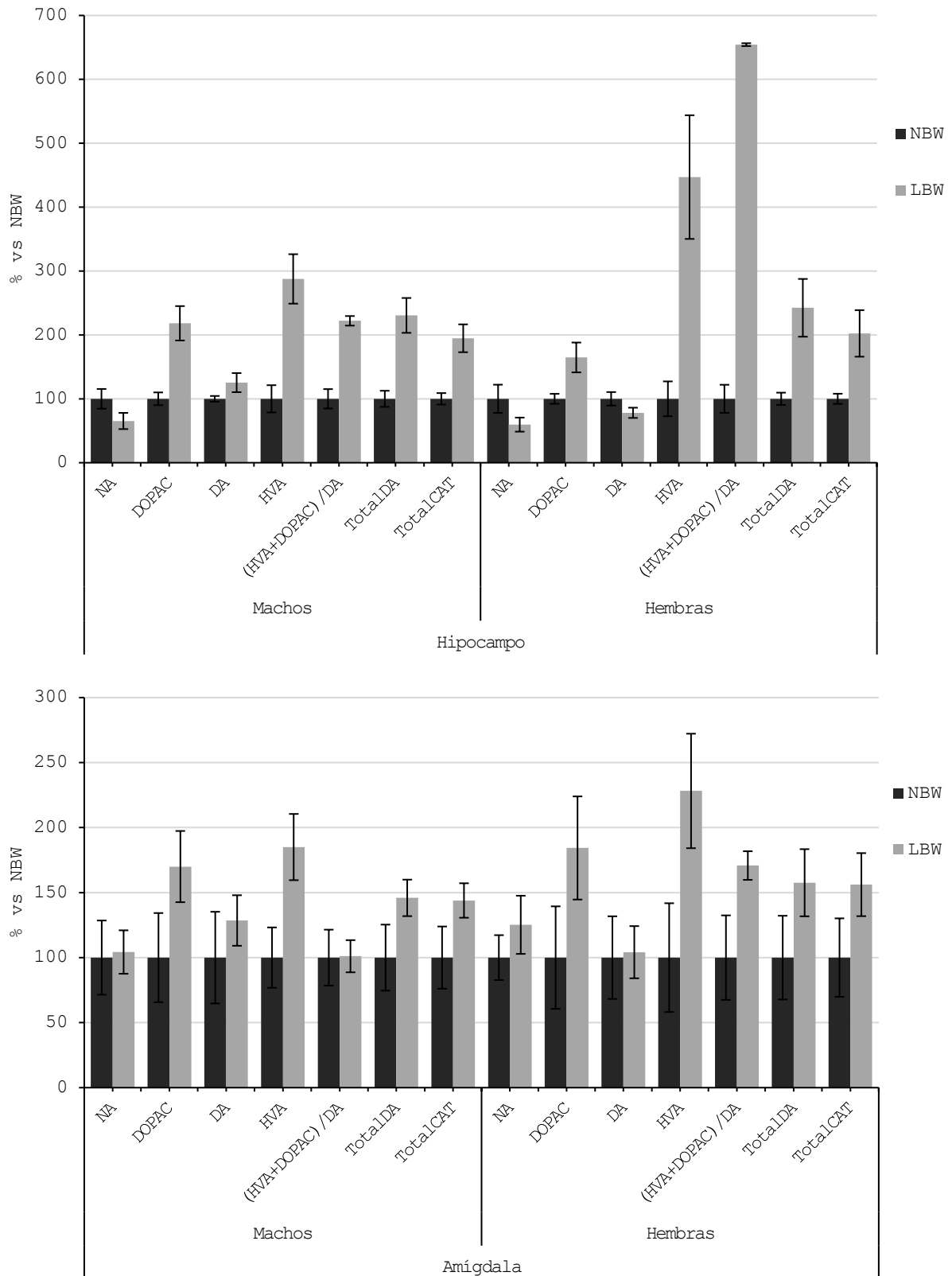


Figura 30: Efecto de la IUGR sobre la concentración de neurotransmisores o metabolitos en el hipocampo y la amígdala según el sexo. Sólo se representan los que presentaron diferencias significativas en la comparación entre pesos teniendo en cuenta el sexo. Los valores se muestran en % con relación a NBW. El eje horizontal divide los lechones entre machos y hembras. Las barras de error representan ± 1 SE.

Estudio 2: Diferencias en el proteoma del hipocampo en lechones producidas por efectos de restricción intrauterina y el sexo

1. Diseño experimental:

Teniendo en cuenta los resultados del estudio anterior, se partió de 7 cerdas Ibéricas gestantes inseminadas con machos Duroc a las que el día 35 de gestación se les redujo la cantidad de comida diaria al 50 % de sus necesidades energéticas. Las cerdas gestantes fueron estabuladas en la granja experimental de INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Madrid). Este estudio fue aprobado por el comité ético en investigación animal IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) de INIA, las cerdas gestantes estabuladas fueron examinadas diariamente y no se detectó ningún problema de salud en el periodo experimental.

A diferencia del otro estudio se cambió el criterio de determinación de los lechones en LBW o NBW, incorporando en este caso el factor madre. Así pues, se descartaron lechones cuyas madres tuvieran camadas inferiores o igual a 5 individuos, dado que no se observaron lechones LBW en camadas con esos números. Al nacer los lechones fueron sexados y pesados, seguidamente se calcularon las medias de sus pesos pero sólo entre individuos de la misma camada y teniendo en cuenta el sexo. A la media se le restó una desviación estándar y ese valor resultante, para cada camada y sexo, fue el corte por el cual los lechones con peso inferior a ese valor fueron catalogados como LBW.

Con estos criterios, de 7 madres iniciales se seleccionaron 5 madres con un total 43 lechones, 22 hembras (5 LBW y 17 NBW) y 21 machos (5 LBW y 16 NBW) (Tabla 22). Los lechones justo después de nacer fueron sacrificados por aturdimiento y desangrado siguiendo la política de protección animal española RD53/2013 vinculada a la europea 2010/63/UE. Una vez sacrificados se abrió el cráneo y se extrajo el cerebro de donde se diseccionó el hipocampo.

Tabla 22: Media de los pesos de los lechones en función del sexo dentro de una misma camada.

Madre	Sexo	Media Pesos (gr)	Desviación Estándar	Media-Desviación
1	Hembras	634,71	98,47	536,24
	Machos	695,33	47,00	648,33
2	Hembras	760,25	115,44	644,81
	Machos	826,00	64,51	761,49
3	Hembras	816,00	11,31	804,69
	Machos	880,40	79,99	800,41
4	Hembras	652,50	51,66	600,84
	Machos	650,60	106,27	544,33
5	Hembras	817,80	62,27	755,53
	Machos	726,67	260,84	465,83

En el diseño del ensayo proteómico SWATH-MS DIA se balancearon el número de los grupos de lechones NBW con los LBW. Tomando como factor limitante los individuos LBW, se eligieron parejas de lechones NBW de la misma madre y sexo para cada lechón LBW. Finalmente, el diseño experimental constó de un total de 20 animales, 10 LBW y 10 NBW con 5 hembras y 5 machos cada uno (Tabla 23).

Tabla 23: Pesos de los lechones seleccionados para el ensayo proteómico SWATH-MS DIA.

Madre	Hembras		Machos	
	LBW	NBW	LBW	NBW
1	501	746	648	742
	522	733	-	-
2	594	856	734	885
3	-	-	777	986
4	584	706	488	773
5	735	884	432	928

La tabla divide los lechones por sexo, IUGR y madre. Los valores de peso se expresan en gramos.

2. Análisis estadístico:

Las áreas de intensidad, que se obtuvieron integrando los picos de los péptidos proteotípicos mediante el programa informático Skyline, se analizaron estadísticamente comparando el sexo y el peso de los lechones usando el programa estadístico IBM SPSS versión 22 (IBM, IL, USA).

Las áreas se transformaron logarítmicamente antes de aplicar el test estadístico UNIANOVA con ajuste de Bonferroni. Se compararon las diferencias debidas al sexo y al peso de los lechones teniendo en cuenta ambas variables. Cada lechón se introdujo como unidad experimental y la significancia bilateral de fijó en un p -valor $\leq 0,050$. Además, se calcularon los Fold-Change para cada comparación estudiada y se fijó un valor mínimo de 1,20 para considerar una abundancia diferencial de la proteína.

3. Identificación de proteínas por SWATH-MS DIA en lisados de hipocampo:

Mediante la técnica de SWATH-MS DIA se analizaron todas las proteínas presentes en los lisados de hipocampo. Para la identificación proteica se introdujo el proteoma completo de *Sus scrofa* de la base de datos de UniProt en el programa informático Skyline. Con la librería DDA de muestras cerebrales porcinas creada previamente como base, el programa Skyline eliminó las proteínas del proteoma de *Sus scrofa* que no se encontraban en ella antes de empezar la identificación. El programa también filtró las proteínas restantes del proteoma de *Sus scrofa* por péptidos trípticos proteotípicos, eliminando así la posibilidad de cuantificaciones cruzadas entre proteínas distintas (tal y como se especifica en el apartado 6.2 de Material y Métodos). Por último, también se descartaron proteínas identificadas a partir de un solo péptido proteotípico identificado.

La identificación de los péptidos se realizó mediante una recta patrón de péptidos sintéticos con los tiempos de retención teóricos y observados de los mismos. Además, se tuvieron en cuenta sólo las 6 últimas transiciones "y" de la fragmentación de residuos (Figura 31).

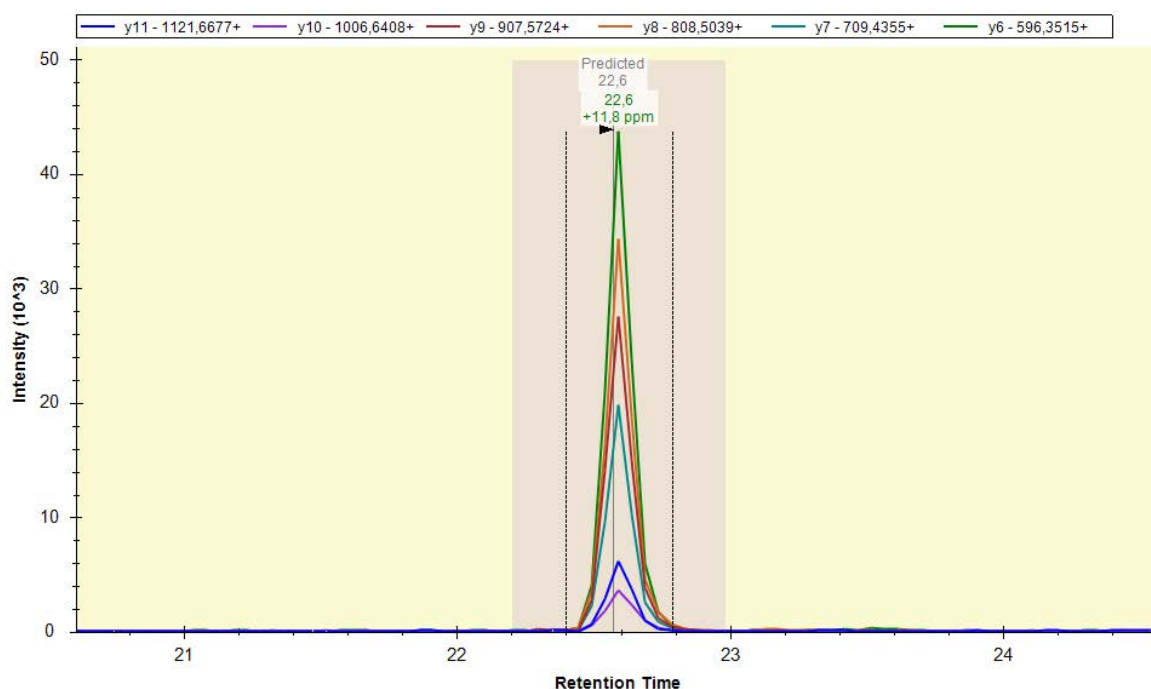


Figura 31: Cromatograma representativo de un péptido analizado mediante SWATH-MS. El eje vertical muestra la intensidad de la señal y el eje horizontal el tiempo de retención. Cada color representa una transición del fragmento "y" del péptido.

Relacionando la identificación de los péptidos en los lisados de hipocampo con la librería se obtuvo la certeza de la correcta identificación peptídica expresada en tanto por uno con el valor "dotp" (Figura 32). Este valor siempre fue igual o mayor a 0,90 en todos los péptidos y en las 20 muestras usadas en este estudio.

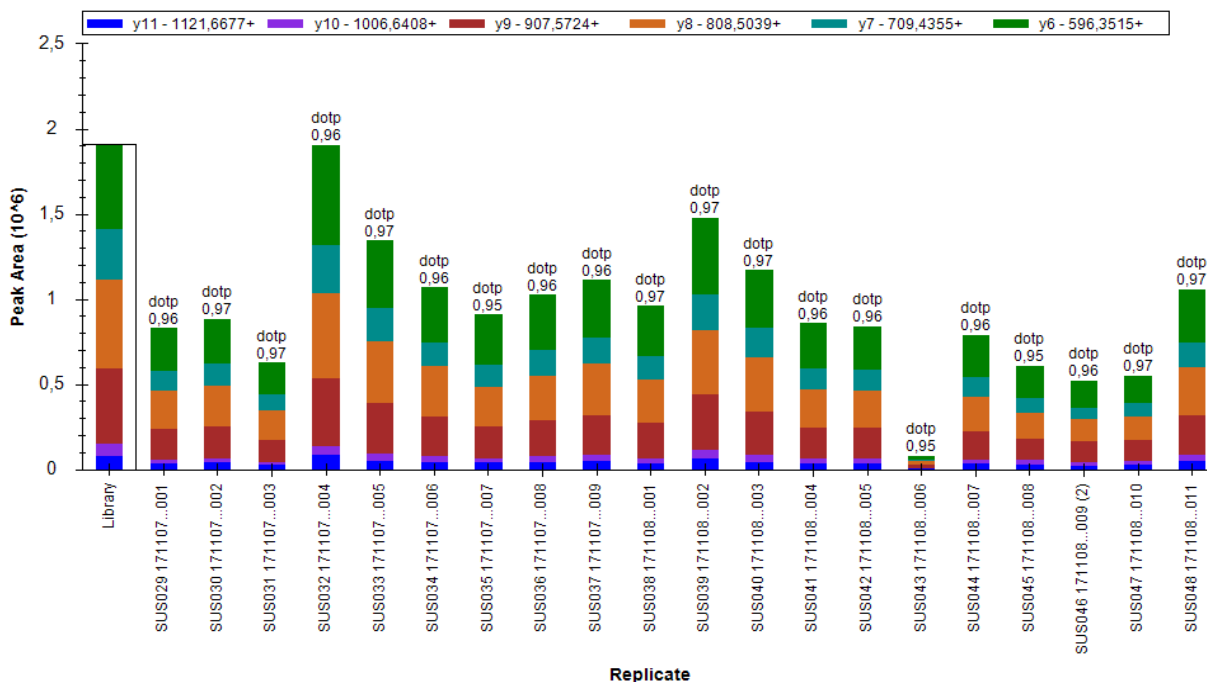


Figura 32: Histograma representativo de las sumas de intensidades de las transiciones de un péptido identificado en todos animales del estudio y en la librería. El eje vertical muestra el valor de la intensidad del área del pico y el horizontal corresponde al péptido en todos los animales analizados para compararlo con el de la librería y obtener el valor "dotp".

Los picos de las transiciones superpuestas de los péptidos proteotípicos se integraron para calcular su área como valor de intensidad. Los valores de las áreas de los péptidos se sumaron para obtener un valor conjunto correspondiente a la abundancia de la proteína en cuestión. Estos valores se utilizaron en el análisis estadístico de la expresión diferencial de proteínas entre las condiciones de sexo y peso mediante el programa estadístico IBM SPSS versión 22 (IBM, IL, USA).

Siguiendo estos criterios se identificaron 101 proteínas distintas que mostraron diferencias significativas en alguna de las comparaciones hechas en este estudio, variable Sexo, variable Peso o la interacción entre ellas.

Los resultados mostraron 86 proteínas que se expresaron diferencialmente en la comparación por Sexo (Hembras versus Machos), 6 en la comparación por Peso (LBW versus NBW), 58 en la comparación Peso*Sexo (Hembras LBW versus Machos LBW y hembras NBW entre machos NBW) y 8 en la comparación Sexo*Peso (Hembras LBW versus Hembras NBW y Machos LBW versus Machos NBW). Como mostró el diagrama de Venn hubo proteínas que presentaron expresión diferencial en más de una comparación (Figura 33).



Figura 33: Diagrama de Venn con el número de proteínas identificadas en todas las comparaciones por sexo, peso y sus interacciones cruzadas.

La cantidad de proteínas diferenciales que se observaron en las comparaciones por sexo respecto a las que se observaron por peso indicaron que la variable Sexo fue la que tuvo mayor relevancia en este estudio.

3.1. Expresión diferencial de proteínas en función del sexo:

Las 86 proteínas que superaron los criterios de $FC > 1,20$ y $p < 0,050$ fueron más abundantes en hembras que en machos (Tabla 24).

Al clasificar estas proteínas por su función, se obtuvieron 6 categorías GO: Ribosoma, Citoesqueleto, Plegamiento, Señalización, Unión ácidos nucleicos, Transporte y Metabolismo (Figura 34). Más de la mitad de las proteínas tuvieron funciones de Señalización y Metabolismo (21 y 26, respectivamente). Además, dentro de las funciones metabólicas, hubo proteínas sobre-expresadas en hembras respecto a machos involucradas en metabolismo de carbohidratos, oxidativo, lipídico y de aminoácidos. Todas las proteínas identificadas y clasificadas por GO que mostraron diferencias significativas en la comparación entre hembras y machos se encuentran en la Tabla 24 junto con los valores de FC calculados de la comparación.

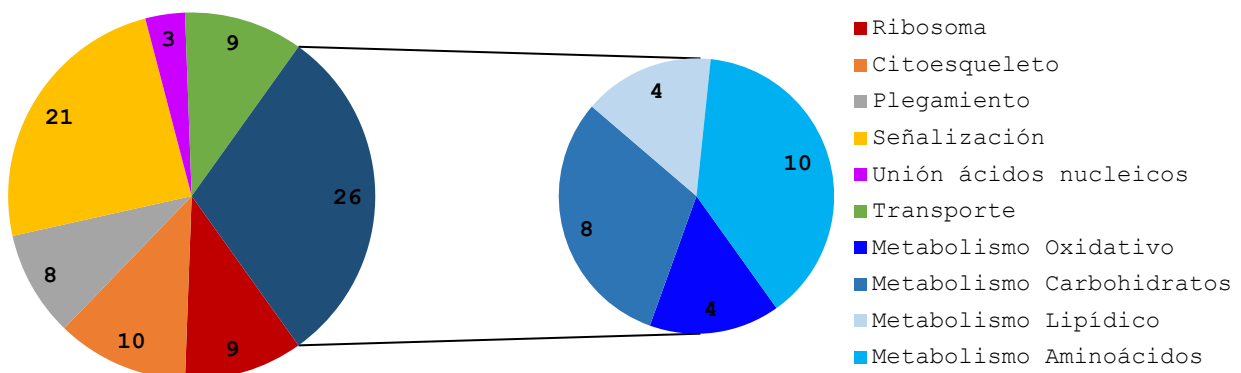


Figura 34: Proteínas diferenciales en la comparación por sexo clasificadas por su GO. El círculo de la derecha clasifica las proteínas metabólicas según el tipo de metabolismo en el que están involucradas. Los valores representan la cantidad de proteínas pertenecientes a ese GO.

Tabla 24: Proteínas diferenciales entre hembras y machos.

	Acceso UniProt	Nombre Gen	Identificación	Hembras/Machos	
				FC	p
Ribosoma	I3LSD3	RL13	60S ribosomal protein L13	1,35	0,044
	Q95307	RL13A	60S ribosomal protein L13a	1,36	0,015
	P67985	RL22	60S ribosomal protein L22	1,34	0,043
	Q29214	RLA0	60S acidic ribosomal protein P0	1,22	0,029
	P62272	RS18	40S ribosomal protein S18	1,23	0,038
	Q29308	RS19	40S ribosomal protein S19	1,34	0,025
	Q0Z8U2	RS3	40S ribosomal protein S3	1,27	0,049
	Q29197	RS9	40S ribosomal protein S9	1,33	0,028
	Q4GWZ2	RSSA	40S ribosomal protein SA	1,27	0,030
Citoesqueleto	I3L5B0	ADDB	Beta-adducin	1,28	0,014
	P10668	COF1	Cofilin-1	1,26	0,040
	I3LJE2	DPYL2	Dihydropyrimidinase-related protein 2	1,33	0,013
	F1SDI9	DPYL4	Dihydropyrimidinase-related protein 4	1,53	0,002
	F1SDQ2	DPYL5	Dihydropyrimidinase-related protein 5	1,34	0,015
	Q2MJV8	PALM	Paralemmin-1	1,25	0,039
	Q6DUB7	STMN1	Stathmin	1,34	0,029
	Q3I5G7	SYUA	Alpha-synuclein	1,56	0,001
	P42639	TPM1	Tropomyosin alpha-1 chain	1,86	2E-05
	P02543	VIME	Vimentin	1,21	0,044
Plegamiento	P28491	CALR	Calreticulin	1,33	0,003
	Q29549	CLUS	Clusterin	1,28	0,007
	O02705	HS90A	Heat shock protein HSP 90-alpha	1,31	0,022
	P62936	PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	1,49	0,004
	F1RTY6	PPID	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D	1,24	0,038
	Q29068	TCPG	T-complex protein 1 subunit gamma	1,33	0,035
	I3LCA2	TCPQ	T-complex protein 1 theta	1,26	0,034
P03974	TERA	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	1,30	0,019	
Señalización	F1SIV3	AN32A	Leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 A	1,42	0,016
	P67872	CSK2B	Casein kinase II beta	1,35	0,035
	Q29036	DAD1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase	1,44	0,001
	I3LJ42	GBG2	Guanine binding protein Gi/Gs/Go gamma-2	1,48	0,002
	E7EI20	DIR1	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	1,39	0,034
	Q2XSV9	GNA11	Guanine nucleotide-binding protein alpha-11	1,58	0,020
	Q2PKF4	GNAQ	Guanine binding protein Gq alpha	1,42	0,013
	P29797	GNAS1	Guanine binding protein Gs alpha XLas	1,40	0,024
	F1S3A2	GRIN1	G protein-regulated inducer of neurite outgrowth 1	1,24	0,039
	P07802	KAP0	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	1,40	0,005
	K9J4L8	KPCB	Protein kinase C beta type	1,25	0,046
	K9IVW4	MTPN	Myotrophin	1,50	0,023
	Q2EN76	NDKB	Nucleoside diphosphate kinase B	1,41	0,007
	Q52NJ6	RAB14	Ras-related protein Rab-14	1,51	0,003
	I3LC07	RAB18	Ras-related protein Rab-18	1,35	0,018
	Q06AU6	RAB5A	Ras-related protein Rab-5A	1,47	0,003
	P63246	RACK1	Receptor of activated protein C kinase 1	1,38	0,019
	Q52NJ1	RB11A	Ras-related protein Rab-11A	1,41	0,014
	F1RLG5	REEP5	Receptor expression-enhancing protein 5	1,48	3E-04
	F2Z5E8	VISL1	Visinin-like protein 1	1,23	0,040
F2Z4Z1	1433G	14-3-3 protein gamma	1,25	0,030	

				Hembras/ Machos		
				FC	p	
	Acceso UniProt	Nombre Gen	Identificación			
Transporte	P05024	AT1B1	Sodium/potassium-transporter ATPase beta-1	1,30	0,023	
	P11607	AT2A2	Sarcoplasmic/endoplasmic calcium ATPase 2	1,65	0,001	
	O02772	FABPH	Fatty acid-binding protein 3	1,20	0,026	
	F1SJ93	RCN2	Reticulocalbin-2	1,47	0,017	
	F1SJ51	SCAM5	Secretory carrier-associated membrane protein 5	1,44	0,007	
	A5A761	SFXN1	Sideroflexin-1	1,48	0,005	
	I3LTQ6	SFXN3	Sideroflexin-3	1,31	0,040	
	A5GFS8	VAPB	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	1,28	0,019	
	I3L9V2	VAT1	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1	1,27	0,039	
Unión ácidos nucleicos	F1SPG1	H1X	Histone H1x	1,25	0,030	
	P62802	H4	Histone H4	1,34	0,042	
	F1S827	PAIRB	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	1,37	0,001	
Metabolismo	Lipídico	I3LUR5	ACAD9	Acyl-CoA dehydrogenase family member 9	1,26	0,046
		P79274	ACADL	Long-chain acyl-CoA dehydrogenase	1,28	0,048
		P41367	ACADM	Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase	1,32	0,047
		P80021	ATPA	ATP synthase alpha	1,39	0,013
	Carbohidratos	Q2XQV4	ALDH2	Aldehyde dehydrogenase	1,23	0,050
		I3LLU0	GPD1L	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein	1,30	0,021
		F1RKJ9	ISOC1	Isochorismatase domain-containing protein 1	1,28	0,024
		P00339	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	1,20	0,043
		P00336	LDHB	L-lactate dehydrogenase B chain	1,29	0,037
		F1SGT3	ODPX	Pyruvate dehydrogenase protein X	1,30	0,009
		Q0R678	PARK7	Protein/nucleic acid deglycase DJ-1	1,26	0,027
		A8U4R4	TKT	Transketolase	1,22	0,028
	Aminoácidos	F1RPC8	CRYM	Ketimine reductase mu-crystallin	1,23	0,020
		F1RFI1	EFTU	Elongation factor Tu	1,23	0,049
		F1RVD2	ENOPH	Enolase-phosphatase E1	1,43	0,004
		I3LN84	LXN	Latexin	1,48	0,011
		P81693	PPAC	Low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase	1,31	0,050
		Q710C4	SAHH	Adenosylhomocysteinase	1,26	0,048
		F1SIJ9	SERC	Phosphoserine aminotransferase	1,27	0,027
		I3LPB8	SPEE	Spermidine synthase	1,59	0,003
		F1S1X3	SYNC	Asparagine-tRNA ligase	1,41	0,049
		Q6SEG5	UCHL1	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1	1,28	0,035
	Oxidativo	P52552	PRDX2	Peroxiredoxin-2	1,34	0,028
		Q9TSX9	PRDX6	Peroxiredoxin-6	1,45	0,003
		P28768	SODM	Superoxide dismutase	1,45	0,031
		P82460	THIO	Thioredoxin	1,27	0,030

La tabla se divide en grupos de proteínas según su GO. Las columnas muestran el código de acceso en UniProt, las siglas y nombre de la proteína. La comparación entre Hembras/Machos se muestran por el Fold-Change (FC) y el p-valor significativo.

3.2. Expresión diferencial de proteínas por efectos del peso y sexo:

Al comparar entre sexos teniendo en cuenta el peso (machos y hembras dentro de cada grupo LBW y NBW), se identificaron 58 proteínas, de las cuales 48 habían sido identificadas previamente. 10 nuevas proteínas aparecieron en el análisis teniendo en cuenta el peso (Figura 35).

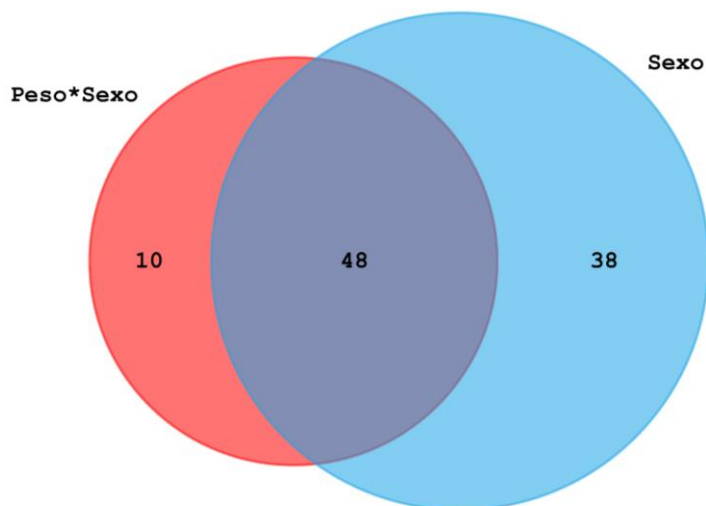


Figura 35: Diagrama de Venn con el número de proteínas identificadas en las comparaciones por sexo y peso*sexo.

De estas 58 proteínas, 49 se encontraron al comparar Hembras NBW con Machos NBW, mostrando todas ellas una mayor abundancia en las hembras. Por otro lado, en la comparación de lechones LBW se obtuvieron 23 proteínas con distinta abundancia, siendo también en todos los casos mayor en hembras. De ellas, 14 proteínas fueron comunes en ambos grupos (Figura 36). Las proteínas identificadas en esta comparación se muestran en la Tabla 25 separadas en grupos de GO, junto con los FC correspondientes para cada comparación. Además, en la Tabla 26 aparecen los sinónimos entre las siglas de los genes de las proteínas identificadas y sus siglas en el programa informático STRING.

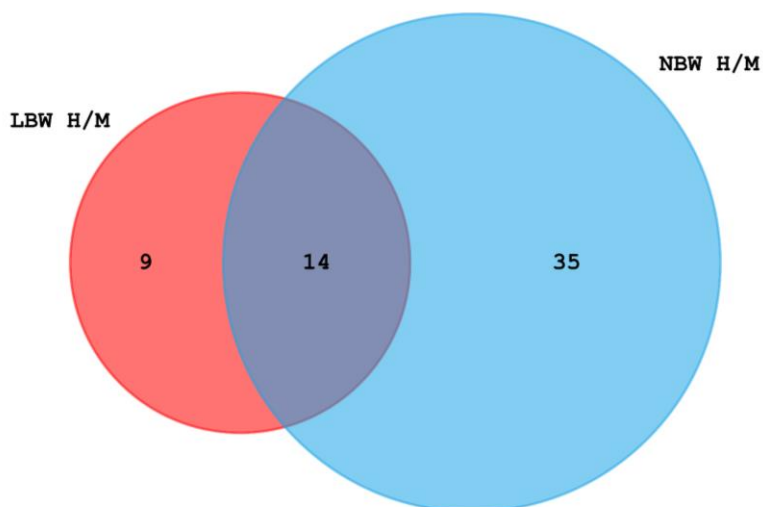


Figura 36: Diagrama de Venn con el número de proteínas identificadas en las comparaciones entre hembras/machos LBW y hembras/machos NBW.

Tabla 25: Proteínas diferenciales entre hembras/machos NBW y hembras/machos LBW.

	Acceso UniProt	Nombre Gen	Identificación	NBW H/M		LBW H/M	
				FC	p	FC	p
Ribosoma	Q95307	RL13A	60S ribosomal protein L13a	1,52	0,021	1,23	0,208
	Q2YGT9	RL6	60S ribosomal protein L6	1,24	0,010	1,12	0,159
	P62272	RS18	40S ribosomal protein S18	1,36	0,028	1,12	0,451
	Q29197	RS9	40S ribosomal protein S9	1,46	0,040	1,22	0,256
Citoesqueleto	F1SDI9	DPYL4	Dihydropyrimidinase-related protein 4	1,51	0,022	1,54	0,022
	F1SDQ2	DPYL5	Dihydropyrimidinase-related protein 5	1,44	0,032	1,26	0,150
	F1SP07	PALM	Paralemmin-1	1,21	0,036	1,28	0,945
	Q6DUB7	STMN1	Stathmin	1,48	0,049	1,23	0,228
	Q3I5G7	SYUA	Alpha-synuclein	1,43	0,035	1,69	0,003
	P42639	TPM1	Tropomyosin alpha-1 chain	1,54	0,009	2,17	6E-05
K9IVR7	WDR1	WD repeat-containing protein 1	1,39	0,027	1,07	0,633	
Plegamiento	P34935	BIP	Endoplasmic reticulum chaperone BiP	1,24	0,028	1,07	0,537
	P28491	CALR	Calreticulin	1,32	0,020	1,34	0,030
	Q29549	CLUS	Clusterin	1,26	0,029	1,30	0,062
	O02705	HS90A	Heat shock protein HSP 90-alpha	1,43	0,036	1,22	0,207
	P62936	PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	1,56	0,049	1,42	0,018
	Q29068	TCPG	T-complex protein 1 gamma	1,47	0,031	1,23	0,393
	I3LCA2	TCPQ	T-complex protein 1 theta	1,36	0,041	1,17	0,308
P03974	TERA	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	1,38	0,037	1,24	0,174	
Señalización	Q29036	DAD1	Dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase	1,51	0,014	1,37	0,004
	F1S1G0	EIF3E	Eukaryotic translation initiation factor 3 E	1,29	0,008	1,09	0,367
	I3LJ42	GBG2	Guanine nucleotide-binding protein Gi/Gs/Go gamma-2	1,53	0,013	1,44	0,032
	Q2XSV9	GNA11	Guanine nucleotide-binding protein alpha-11	1,84	0,021	1,41	0,289
	P29797	GNAS1	Guanine nucleotide-binding protein Gs alpha XLas	1,60	0,031	1,25	0,263
	P07802	KAP0	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	1,49	0,015	1,33	0,076
	Q2EN76	NDKB	Nucleoside diphosphate kinase B	1,42	0,045	1,41	0,042
	F1RKG8	PEBP1	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	1,32	0,048	1,01	0,929
	Q52NJ6	RAB14	Ras-related protein Rab-14	1,42	0,060	1,60	0,012
	I3LC07	RAB18	Ras-related protein Rab-18	1,48	0,032	1,25	0,190
	Q06AU6	RAB5A	Ras-related protein Rab-5A	1,55	0,017	1,41	0,042
	P63246	RACK1	Receptor of activated protein C kinase 1	1,65	0,021	1,21	0,282
	Q52NJ1	RB11A	Ras-related protein Rab-11A	1,30	0,162	1,51	0,027
	F1RLG5	REEP5	Receptor expression-enhancing protein 5	1,30	0,042	1,65	0,001
F2Z5E8	VISL1	Visinin-like protein 1	1,42	0,017	1,09	0,630	
Transporte	P11607	AT2A2	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	1,39	0,141	1,92	0,001
	O02772	FABPH	Fatty acid-binding protein 3	1,10	0,408	1,31	0,019
	Q56P28	PRAF3	PRA1 family protein 3	1,36	0,049	1,12	0,536
	F1SJ51	SCAM5	Secretory carrier-associated membrane protein 5	1,45	0,047	1,43	0,040
	A5A761	SFXN1	Sideroflexin-1	1,40	0,049	1,55	0,024
	P09571	TRFE	Serotransferrin	1,15	0,709	1,66	0,042
Unión ácidos nucleicos	P62802	H4	Histone H4	1,53	0,050	1,21	0,326
	F1S827	PAIRB	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	1,44	0,031	1,28	0,003

	Acceso UniProt	Nombre Gen	Identificación	NBW H/M		LBW H/M	
				FC	p	FC	p
Metabolismo	P80021	ATPA	ATP synthase alpha	1,46	0,034	1,32	0,121
	F1RWY7	BPHL	Valacyclovir hydrolase	1,42	0,046	1,15	0,448
	F1RVD2	ENOPH	Enolase-phosphatase E1	1,53	0,015	1,35	0,052
	Q8MJ76	FETA	Alpha-fetoprotein	1,13	0,561	1,47	0,036
	I3LLU0	GPD1L	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1-like protein	1,38	0,168	1,22	0,045
	Q29577	KCRU	Creatine kinase U-type	1,55	0,041	1,13	0,466
	P00339	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain	1,30	0,041	1,12	0,392
	I3LN84	LXN	Latexin	1,49	0,089	1,48	0,037
	F1SGT3	ODPX	Pyruvate dehydrogenase protein X component	1,33	0,036	1,28	0,073
	Q0R678	PARK7	Protein/nucleic acid deglycase DJ-1	1,19	0,208	1,32	0,048
	P52552	PRDX2	Peroxiredoxin-2	1,49	0,045	1,24	0,234
	Q9TSX9	PRDX6	Peroxiredoxin-6	1,67	0,004	1,27	0,110
	P28768	SODM	Superoxide dismutase	1,78	0,024	1,20	0,404
	I3LPB8	SPEE	Spermidine synthase	1,48	0,044	1,68	0,012
	P82460	THIO	Thioredoxin	1,39	0,038	1,17	0,283
	A8U4R4	TKT	Transketolase	1,30	0,042	1,15	0,240

La tabla se divide en grupos de proteínas según su GO. Las columnas muestran el código de acceso en UniProt, las siglas del nombre del gen y la identificación de la proteína. Las comparaciones entre Hembras/Machos NBW y Hembras/Machos LBW se muestran por el Fold-Change (FC) y el p-valor, cuando ambos valores cumplen el criterio de significancia son resaltados en negra.

Tabla 26: Sinónimos entre las siglas del gen y las siglas en STRING de las proteínas.

Nombre Gen	Nombre STRING	Nombre Gen	Nombre STRING	Nombre Gen	Nombre STRING
AT2A2	ATP2A2	KCRU	CKMT1A	RL13A	RPL13A
ATPA	ATP5A1	LDHA	LDHA	RL6	RPL6
BIP	HSPA5	LXN	LXN	RS18	RPS18
BPHL	BPHL	NDKB	NME1-NME2	RS9	RPS9
CALR	CALR	ODPX	PDHX	SCAM5	SCAMP5
CLUS	CLU	PAIRB	SERBP1	SFXN1	SFXN1
DAD1	DAD1	PALM	PALM	SODM	SOD2
DPYL4	DPYSL4	PARK7	PARK7	SPEE	SRM
DPYL5	DPYSL5	PEBP1	PEBP1	STMN1	STMN1
EIF3E	EIF3E	PPIA	PPIA	SYUA	SNCA
ENOPH	ENOPH1	PRAF3	ARL6IP5	TCPG	CCT3
FABPH	FABP3	PRDX2	PRDX2	TCPQ	CCT8
FETA	AFP	PRDX6	PRDX6	TERA	VCP
GBG2	GNG2	RAB14	RAB14	THIO	TXN
GNA11	GNA11	RAB18	RAB18	TKT	TKT
GNAS1	GNAS	RAB5A	RAB5A	TPM1	TPM1
GPD1L	GPD1L	RACK1	GNB2L1	TRFE	TF
H4	HIST4H4	RB11A	RAB11A	VISL1	VSNL1
HS90A	HSP90AA1	REEP5	REEP5	WDR1	WDR1
KAP0	PRKAR1A				

La clasificación GO de estas proteínas según su función biológica presentó varias diferencias respecto a la comparación simple entre Hembras y Machos (Figura 37). Éstas fueron:

- a) Todas las proteínas identificadas presentaron una abundancia de mínimo 1,20 veces mayor en hembras que en machos.
- b) Menor número de proteínas identificadas en LBW que en NBW.
- c) Ausencia de las proteínas ribosomales en la comparación entre machos y hembras LBW.
- d) La cantidad de proteínas involucradas en plegamiento fue de 2 en el grupo LBW y de 8 en el grupo NBW.
- e) Las proteínas con función de señalización también disminuyeron su número de 13 a 7 en lechones LBW respecto a NBW. Cabe destacar que dos de las proteínas que no aparecen en la comparación entre Hembras y Machos LBW están involucradas en transcripción (EIF3E) y en traducción (RACK1).
- f) La cantidad de proteínas relacionadas con el citoesqueleto también se redujo de 7 a 4 en lechones LBW, destacando la pérdida de la expresión diferencial de proteínas involucradas en el desarrollo axonal (PALM y STMN1).
- g) El número de proteínas metabólicas sufrió una disminución considerable, de 12 a 5, en la misma comparación. Las proteínas metabólicas que sólo aparecían en la comparación entre Hembras y Machos NBW fueron principalmente las involucradas en metabolismo oxidativo (PRDX2, PRDX6, SODM y THIO) y, en menor medida, las de metabolismo de carbohidratos.
- h) Las proteínas involucradas en transporte aumentaron de 3 a 5 en animales LBW, destacando la sobre-expresión de FABPH, implicada en el transporte lipídico.

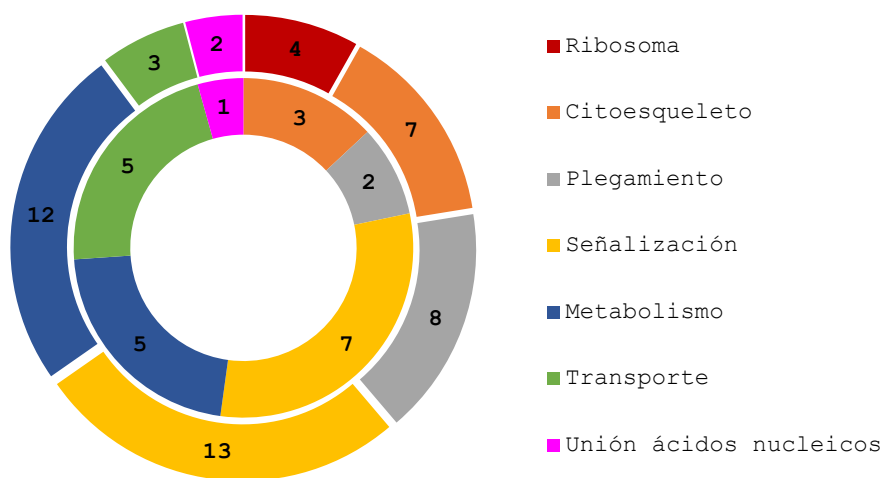


Figura 37: Diagrama circular con la cantidad de proteínas diferenciales en las comparaciones entre hembras/machos LBW y hembras/machos NBW clasificadas por su GO. El anillo externo muestra las proteínas diferenciales en la comparación H/M NBW y el anillo interior las diferenciales en la comparación H/M LBW.

Cuando se analizaron las interacciones entre proteínas mediante STRING se observó claramente que las interacciones entre proteínas ribosomales, de plegamiento e involucradas en señalización aparecían en los animales NBW, pero que la mayoría de ellas se perdieron en lechones LBW. Del mismo modo, también se hicieron patentes una gran cantidad de nodos de interacción entre proteínas de metabolismo de carbohidratos y de metabolismo oxidativo por la respiración celular en lechones NBW, mientras que en lechones LBW no aparecieron dichos nodos de interacción (Figura 38).

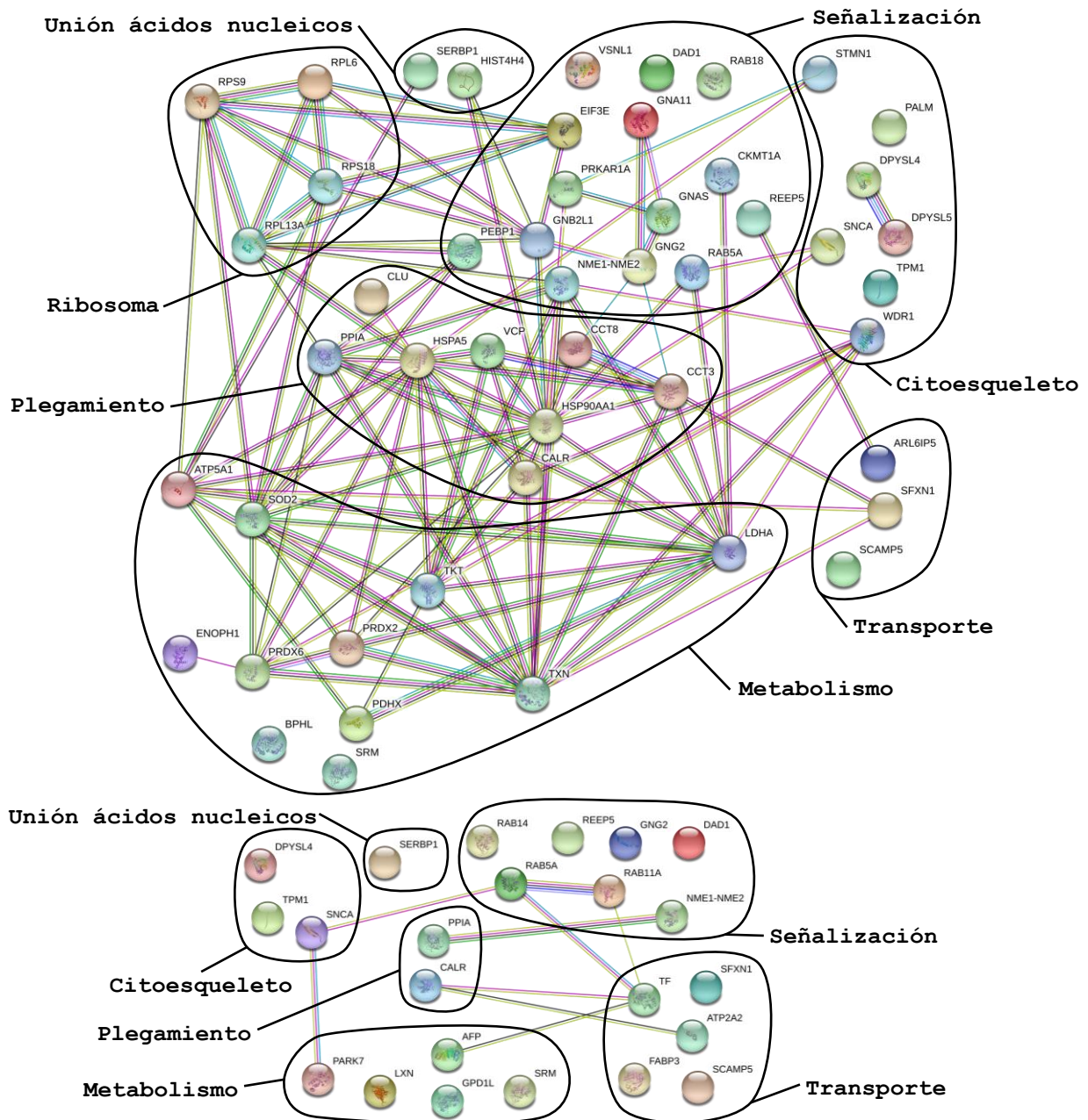


Figura 38: Red de interacción que muestra las asociaciones entre las proteínas identificadas en el SWATH-MS creada por el programa informático STRING. La red superior muestra las proteínas diferenciales en la comparación H/M NBW, la inferior las proteínas diferenciales en la comparación H/M LBW. El color de las líneas de conexión representa distintos tipos de asociación: Cian, base de datos. Rosa, experimental. Verde, cercanía génica. Rojo, fusión génica. Azul, cocurrencia génica. Amarillo, citasiones. Negro, coexpresión. Gris, homología proteica.

Discusión

"Ciencia es todo aquello sobre lo cual siempre cabe discusión". José Ortega y Gasset

Capítulo 1: Efecto del estrés y la relación humano-animal en la inmunofisiología y el proteoma de PBMC del cerdo

Los resultados obtenidos se analizaron en función del tiempo experimental entre t0 y t2 (una semana después de la mezcla de animales y el final del experimento a los dos meses después de la mezcla) por un lado y los efectos producidos por los tratamientos de manejo (PH y NH) por el otro.

1. Efecto del estrés debido a la mezcla de animales a lo largo del tiempo:

En producción porcina, el hecho de mezclar animales que no han estado juntos anteriormente y por tanto no se conocen supone una causa de estrés bien conocida²⁰⁻²². El nivel de estrés en la granja después de la mezcla aleatoria de animales y la posterior readaptación fue evaluado mediante el análisis de la concentración de cortisol en suero, saliva y pelo en los dos tiempos experimentales t0 y t2.

El cortisol en pelo disminuyó significativamente en el tiempo, indicando que el estrés ambiental durante el periodo experimental decreció (Tabla 7). La acumulación de cortisol en el pelo está considerada como marcador de estrés crónico en distintas especies animales^{83,84}. Por otro lado, esta disminución no se observó en los niveles de cortisol en suero y saliva, aunque no resultó inesperado dado que la concentración de cortisol tanto en suero como en saliva son marcadores de estrés agudo y están sujetas a una alta variabilidad interindividual.

Otros marcadores que aumentan su concentración en situaciones de estrés son las proteínas de fase aguda (HP, CRP y Pig-MAP)^{78,85-87}. En este estudio las concentraciones de las proteínas de fase aguda también disminuyeron durante el periodo experimental.

Todos juntos, estos resultados mostraron que los animales sufrieron un estrés al principio del experimento asociado, probablemente, a la mezcla de individuos en la granja. A medida que avanzó el tiempo los animales se readaptaron a la nueva situación en la granja⁸⁸ perdiéndose así el efecto del estresor y provocando la disminución en la concentración de los marcadores anteriormente mentados. Al comparar los dos grupos de manejo PH y NH no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de cortisol de ningún tipo de muestra.

A partir del estudio proteómico, se observó que varios conjuntos de proteínas agrupados por su función biológica se regularon diferencialmente a lo largo del

tiempo experimental en las condiciones de manejo PH y NH. En la Figura 14 se muestra como las proteínas en las distintas categorías funcionales se comportaron del mismo modo, ya fuese incrementando o disminuyendo su abundancia, entre t2 y t0. Además, muchas de las proteínas identificadas compartían la característica de tener una expresión regulada potencialmente por cortisol, indicando que los cambios en su concentración observados entre t2 y t0 fueron, al menos en parte, consecuencia de la disminución del estrés tras la readaptación a las nuevas condiciones en la granja después de la mezcla de individuos.

En el grupo de las Proteínas Inmunomoduladoras (Grupo A) todas las proteínas estuvieron reguladas a la baja con la excepción de EFDH2 (swiprosin-1). La expresión de varias de las proteínas de este grupo está directamente modulada por glucocorticoides (GC), como annexin-1 (ANXA1) que se sobre-expresa por GC en las primeras etapas de una respuesta inflamatoria y promueve la reorganización del citoesqueleto de actina⁸⁹. El regulador de proteasas de neutrófilos SERPINB1 también tiene una expresión regulada por GC y el estrés⁹⁰. El estrés sufrido por los animales, mediado posiblemente por GC, induce la síntesis y la secreción de HMGB1, HSP90B1 y S100A9. Estas proteínas pertenecen a un grupo conocido como DAMPs (*Damage Associated Molecular Pattern*) que son liberadas por células dañadas y secretadas por células involucradas en inflamación⁹¹. Además, se ha descrito mediante estudios proteómicos la regulación directa por cortisol de plastin-2 (LCP1) y HSP90B1 en monocitos *in vitro*⁹²⁻⁹⁴.

En el grupo de Expresión Génica y Transcripción (Grupo C) hubo un conjunto de proteínas involucradas en el procesamiento de RNA cuya concentración disminuyó a lo largo del tiempo experimental (HNRNPA2B1, RCTB, KHSRP). Este efecto podría ser mediado por GC ya que las hormonas esteroideas pueden alterar el *splicing* alternativo de distintos genes⁹⁵ y el procesamiento de pre-mRNA^{96,97}. En experimentos proteómicos con timocitos de ratas sujetas a estrés agudo se han identificado extensamente proteínas involucradas en la maduración de RNA⁷⁴.

Por lo tanto, la modulación de las proteínas de procesamiento de RNA junto con proteínas de transcripción (HIST1H2BF) y de traducción (EEF1A1) definitivamente evidenciaron procesos genómicos en curso o venideros.

Otro grupo de proteínas reguladas a la baja fueron las involucradas en Degradación y Plegamiento de proteínas (Grupo D). En este grupo hubo proteínas implicadas en el ensamblado del inmunoproteosoma (UBE2I, PSMA4, PSME1 y 2) que se ven afectadas por GC y el estrés⁹⁸. Las chaperonas infra-expresadas a t2 (HSP90B1⁹⁹, PPIA¹⁰⁰⁻¹⁰³, CCT2^{104,105}) posiblemente están relacionadas con la activación por GC de la función proteasomal y el recambio proteico^{106,107}.

Por otro lado, el grupo de proteínas relacionadas con el citoesqueleto y la motilidad celular¹⁰⁸ aumentaron su concentración en t2 (Grupo B). Varias de estas

proteínas tienen un papel en la señalización de adhesiones focales (ITGA2B, ILK, VCL, FLNA, MYL9, MYL12B) o en la unión con actina (TPM1¹⁰⁹). Además, fueron identificadas otras proteínas relacionadas con el citoesqueleto (CORO1A, CORO1C, PLECK¹¹⁰, ACTR1A, TES¹¹¹, WDR1¹¹²) y una proteína que recluta otras proteínas hacia el citoesqueleto (PDLIM1). Las proteínas de unión a calcio (CALD1¹¹³, CNN2¹¹⁴) también están relacionadas con la motilidad celular. También incrementó la abundancia de las tres cadenas del fibrinógeno (α , β y γ), bien caracterizadas como ligandos de integrinas. El aumento observado en el estudio proteómico fue validado por *Western Blot* (Figura 16). En la Figura 39 se muestra la ruta de señalización de adhesiones focales obtenida a partir de KEGG resaltando las proteínas identificadas.

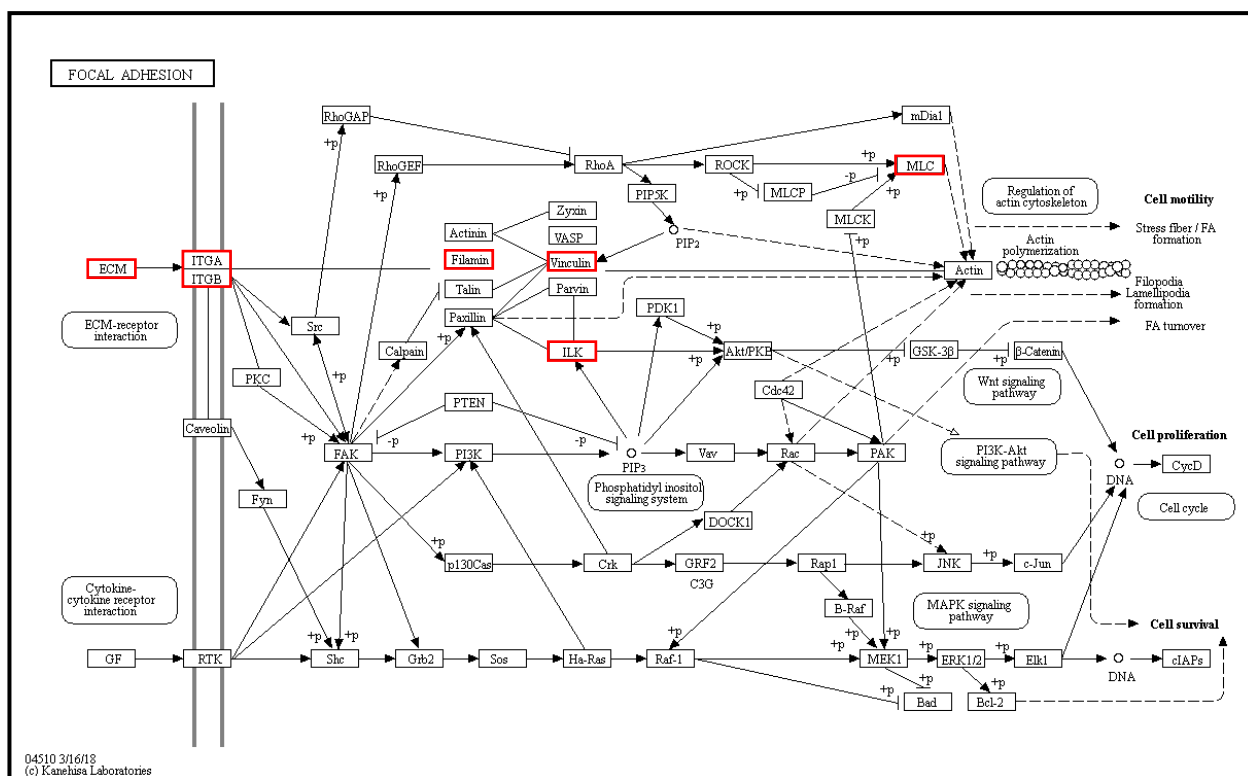


Figura 39: Ruta de señalización de adhesiones focales de la base de datos KEGG. En rojo se destacan las proteínas identificadas en el DIGE.

En cuanto a la vía de señalización de adhesiones focales, se había descrito previamente en un estudio proteómico una disminución de la expresión de los receptores de integrina ITGA2B y ITGB3 en células PBMC durante una infección por virus de diarrea bovina no citopático, mientras que con la forma citopática del virus se observó una sobre-expresión de los mismos receptores de integrina¹¹⁵. Este hecho plantea la posibilidad de que durante el periodo experimental de nuestro estudio los animales sufrieran infecciones subclínicas que produjeran la activación de la señalización del citoesqueleto de actina a t2. No obstante, también puede estar relacionada con la disminución del cortisol endógeno a lo largo del proceso de readaptación, ya que se ha descrito mediante experimentos de proteómica que las hormonas asociadas con el estrés, como el

cortisol, provocan una disminución de la actina y otras proteínas relacionadas con el citoesqueleto en linfocitos T de ratón, disminuyendo además su capacidad de migración¹¹⁶.

Además, existe un solapamiento entre las proteínas identificadas en este estudio con proteínas identificadas en ensayos con timocitos (las PBMC son comparables a los timocitos ya que contienen un 70 % de linfocitos T) de ratas expuestas a estrés agudo. En este caso, el estudio se diseñó para investigar los efectos no genómicos inmediatos del cortisol en la translocación de proteínas entre orgánulos celulares, por lo que la mayoría de proteínas identificadas estaban involucradas en señalización⁷⁴. Los resultados mostraron que los cambios provocados por una exposición aguda a cortisol difieren a los cambios provocados por la exposición variable al cortisol que ocurre durante periodos prolongados de tiempo como el que se ha utilizado en este estudio. No obstante, existen vías de señalización reguladas por cortisol que responden tanto al estrés agudo como al crónico, ya que en el presente estudio se ha identificado bastantes proteínas comunes (HMGB1, HNRNPK, PMSE1, HSP90B1 y CORO1A) y en algunos casos isoformas distintas de la misma proteína (PRDX2/5 y PSMA1/4). Todas estas proteínas participan en procesos celulares regulados por GC como expresión génica, ensamblado de inmunoproteosoma, plegamiento proteico o señales de alarma (DAMP).

Los marcadores de estrés oxidativo frecuentemente se encuentran alterados en situaciones de estrés^{78,117,118}. En este estudio se identificaron proteínas (Grupo E) antioxidantes cuya concentración disminuyó en t2 (PRDX5, CNDP2 y LAP3). Estas enzimas están involucradas en la degradación del glutatión^{119,120}. Teniendo en cuenta estas proteínas junto a las diferencias en la carbonilación de las proteínas y la actividad de la SOD (Figura 17) confirman una alteración del estado oxidativo en las PBMC durante el periodo experimental.

Finalmente, también hubo una modulación de varias proteínas relacionadas con el metabolismo o el transporte de nucleótidos de purinas (Grupo F), como la GMPS que sintetiza GMP y se encontró aumentada en t2, o la HINT1 que hidroliza nucleótidos de purina (GMP y AMP) y disminuyó en t2. Estos dos hechos conllevan un aumento del ATP y GTP intracelular necesarios para la polimerización de actina y la dinámica del citoesqueleto. Otra proteína que disminuyó en el tiempo fue SLC25A24, un transportador de ATP y ADP a través de la membrana mitocondrial, regulando así su disponibilidad en el citoplasma¹²¹. Además, dos enzimas del ciclo de Krebs (MDH1 y ACO2) disminuyeron su concentración en el tiempo, mientras que la enzima del metabolismo lipídico MGLL aumentó sugiriendo, de este modo, una adaptación del metabolismo energético celular.

Así pues, todos los resultados presentados en este estudio, el nivel de cortisol en pelo, las proteínas de fase aguda en suero y el análisis de las distintas proteínas identificadas, sugieren que los cambios en el proteoma de las PBMC entre t2 y t0 se debieron principalmente a la disminución del grado de estrés

de los animales entre t0 y t2 al readaptarse al nuevo grupo de individuos en la granja.

De acuerdo con esta premisa los resultados indicaron que las proteínas inducidas por GC (Grupos A, C y D) disminuyeron en el tiempo paralelamente a la disminución del cortisol en pelo (Figura 40). El aumento de las proteínas relacionadas con el citoesqueleto (Grupo B) puede indicar que, aunque disminuyese el grado de estrés, las PBMC se mantuvieron en un estado de preparación para poder combatir agentes perjudiciales¹²². Por otro lado, el crecimiento y el desarrollo sexual durante esos dos meses también pudieron contribuir a los cambios observados en el proteoma, pero no debería ser relevante en edad prepuberal, tal y como se describe en la literatura^{123,124}.

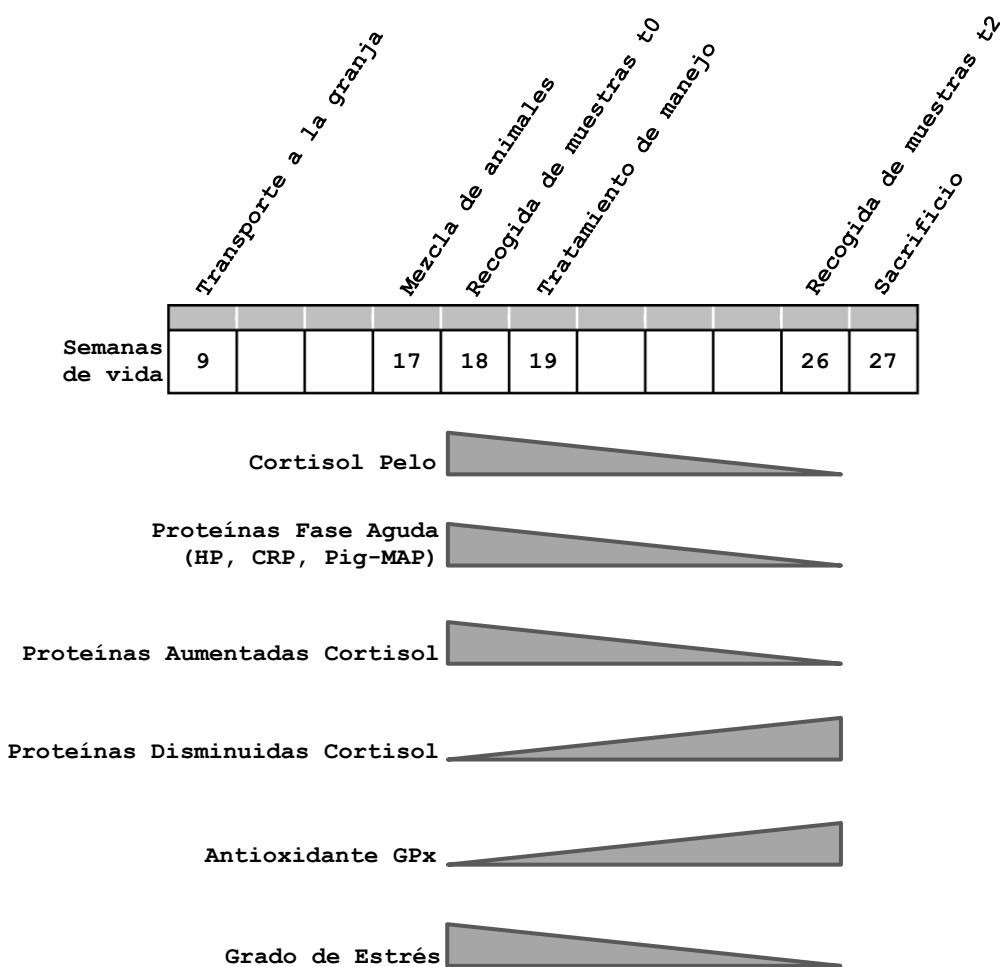


Figura 40: Figura integrativa de los resultados del capítulo 1. Los cambios en el cortisol, proteínas de fase aguda, GPx y las proteínas de los PBMC identificadas en el DIGE reflejan las variaciones en el grado de estrés de los animales.

2. Efectos de los tratamientos de manejo:

No hubo un efecto claro de las condiciones de manejo (PH y NH) en la fisiología porcina, aunque algunos de los resultados sugieren que el contacto humano puede modular la respuesta al ambiente. En el análisis proteómico, el grupo NH mostró más diferencias a lo largo del tiempo que el grupo PH en el número de proteínas identificadas como diferenciales y más variaciones tanto cuantitativas como cualitativas (Figura 13).

Los animales con manejo positivo (PH) presentaron menor estrés oxidativo, indicado por un incremento en la ratio t_2/t_0 de la actividad SOD (Figura 17). Además, la concentración de serotonina (5-HT) aumenta en la corteza prefrontal y disminuye en la amígdala en los animales del grupo PH. El sistema serotoninérgico está involucrado en la regulación del estado de ánimo, estrés y comportamiento agresivo en humanos y otras especies, así como en enfermedades mentales⁵⁰. En el caso porcino, una disminución de 5-HT se ha asociado a estados negativos como estrés, miedo y agresividad¹²⁵⁻¹²⁸, mientras que un aumento de 5-HT en la corteza prefrontal se ha relacionado con condiciones positivas en ratas^{129,130}. Los datos referentes a la amígdala son controvertidos^{131,132}.

Teniendo en cuenta todos los resultados obtenidos en este estudio, es posible que los tratamientos de manejo aplicados no fueran lo suficientemente intensos o prolongados para generar una respuesta fisiológica clara. La falta de diferencias significativas en los niveles de cortisol, proteínas de fase aguda y GPx entre los grupos PH y NH respaldan dicha posibilidad. Los resultados de los test de comportamiento (test de sesgo cognitivo, test del objeto novedoso y test de defensa en cascada) llevados a cabo por nuestros colaboradores de IRTA en estos mismos animales mostraron que tampoco hubo diferencias entre los grupos PH y NH, corroborando la conclusión de que las diferencias en las condiciones de manejo no fueron lo suficientemente claras para provocar un efecto¹³³.

Capítulo 2: Efecto de los cambios en la dieta sobre la señalización por neurotransmisores y neuropéptidos en el sistema nervioso central

Los perfiles de neurotransmisores y sus metabolitos se cuantificaron en distintas áreas cerebrales en animales con dietas distintas (Estudio 1), o cuyas progenitoras tuvieron dietas distintas (Estudio 2). Los resultados obtenidos se analizaron teniendo en cuenta todas las variables.

1. Efecto de una dieta rica en grasas y de su combinación con probióticos y ácidos grasos ω -3 en hipotálamo e hipocampo:

Se analizaron los cambios provocados por la dieta rica en grasas HFD (T2) y la intervención en la dieta de los probióticos (T3) más ácidos grasos ω -3 (T4) en hipotálamo e hipocampo ventral. Aunque se analizaron otras áreas cerebrales, sólo se detectaron cambios en estas dos. Se debe tener en cuenta que el hipotálamo es el responsable del control homeostático de la ingesta³⁸ mientras que el hipocampo ventral está implicado en otros aspectos comportamentales relacionados con la ingesta como el estado de ánimo o la recompensa^{63,134}.

Así pues, en el hipotálamo la concentración de los neuropéptidos orexigénicos NPY y Orexina A disminuyeron en la dieta HFD, al contrario que la concentración del neuropéptido anorexigénico POMC que aumentó, tal y como se ha descrito en varios modelos de obesidad inducida por la dieta en roedores. En estos casos, a pesar de que los efectos específicos pueden depender de la duración y el tipo de dieta, se ha descrito generalmente que una dieta HFD disminuye los niveles de NPY en el hipotálamo, tanto a nivel peptídico como a nivel de mRNA, especialmente durante una dieta HFD prolongada¹³⁵⁻¹³⁹ como la que se llevó a cabo en este estudio de modelo porcino. Con relación a la Orexina A se han descrito resultados similares^{140,141}.

Por otro lado, se ha demostrado que las ratas genéticamente propensas a la obesidad alimentadas con una dieta HFD durante 2 semanas muestran un aumento en la expresión de POMC en el hipotálamo¹⁴². En nuestro estudio, las diferencias en la concentración de neuropéptidos entre los grupos con diferentes dietas (Figura 19) no alcanzaron una significancia estadística debido a una alta variabilidad interindividual, pero se considera que las diferencias son reales, al estar de acuerdo con los datos existentes en la literatura.

Los cambios en el perfil de neuropéptidos vienen condicionados principalmente por la hormona leptina que actúa sobre el núcleo arcuato (NARC) en el hipotálamo. En el NARC se encuentran neuronas secretoras de NPY/AgRP y POMC/CART, de modo que la presencia de leptina inhibe las neuronas secretoras de NPY (orexigénico) y activa las neuronas secretoras de POMC (α -MSH) (anorexigénico). Esto provoca

una disminución del apetito tras la comida^{45,143}. Ambos tipos de neuronas proyectan al núcleo PVN y al área lateral del hipotálamo (LHA). Al inhibirse la secreción de NPY, también se inhibe la secreción de Orexina A, así como la neurosecreción de TRH, CRH y oxitocina en el PVN⁶⁷. Por otro lado, las proyecciones de POMC tienen un efecto totalmente opuesto, provocando un mayor gasto energético sistémico debido a la secreción de TRH, CRH y oxitocina⁶⁴.

Por lo que se refiere a los neurotransmisores y sus metabolitos (Figura 18), en el grupo HFD se observó un aumento en la concentración de DOPAC, que indicó a su vez un aumento en la actividad de la vía dopaminérgica. Se considera que la dopamina ejerce una señal anorexigénica en el hipotálamo, por lo que está involucrada en el control homeostático de la ingesta⁴⁵. El comportamiento del DOPAC fue, por lo tanto, inverso al de NPY/OrexA. Las potentes correlaciones positivas entre DOPAC o HVA y el consumo o el incremento de peso observadas en la dieta HFD (Figura 20) confirman la relación entre la vía dopaminérgica y la ingesta. El sistema serotoninérgico también se ha relacionado con la ingesta, actuando la serotonina como inhibidor de la ingesta⁵². Las correlaciones positivas entre 5-HT o 5-HIAA y el consumo o el incremento de peso mostradas en la dieta HFD concuerdan con lo descrito.

El *heatmap* de la dieta HFD también mostró correlaciones negativas entre el NPY y DA o 5-HT (Figura 20), respaldando la hipótesis que la DA y 5-HT tienen funciones anorexigénicas en el hipotálamo^{45,52}. Además, plantea la posibilidad de una interacción inhibitoria entre NPY y DA o 5-HT.

Por otro lado, en el hipocampo se encuentra afectado sobre todo el sistema dopaminérgico en la dieta HFD, dado que disminuyeron las concentraciones de DA, DOPAC y, además, de la suma de todos los metabolitos dopaminérgicos (TotalDA) (Figura 18). Dicha disminución se observó concretamente en el hipocampo ventral, región que está involucrada en las emociones, estrés y afecto, mientras que al hipocampo dorsal se le atribuyen funciones cognitivas¹⁴⁴.

La inhibición del sistema dopaminérgico en el hipocampo ventral que se observa después de la ingesta de alimentos o en una dieta HFD puede ser debida a dos posibles rutas simultáneamente (Figura 41). La primera ruta de inhibición se da en presencia de leptina que directamente inhibe la secreción de DA en la VTA¹⁴⁵ y, indirectamente, mediante la inhibición de las proyecciones orexigénicas del LHA hacia la VTA⁶⁵. La señal inhibitoria en las neuronas dopaminérgicas del VTA a su vez inhibirán todo el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico^{65,146}. La segunda ruta de inhibición se produce por las proyecciones sinápticas de neuronas secretoras de α -MSH situadas en el NARC del hipotálamo a neuronas GABAérgicas existentes en la VTA, las neuronas GABAérgicas se activan mediante α -MSH (proveniente del procesado de POMC) e inhiben las neuronas dopaminérgicas del VTA⁶⁵.

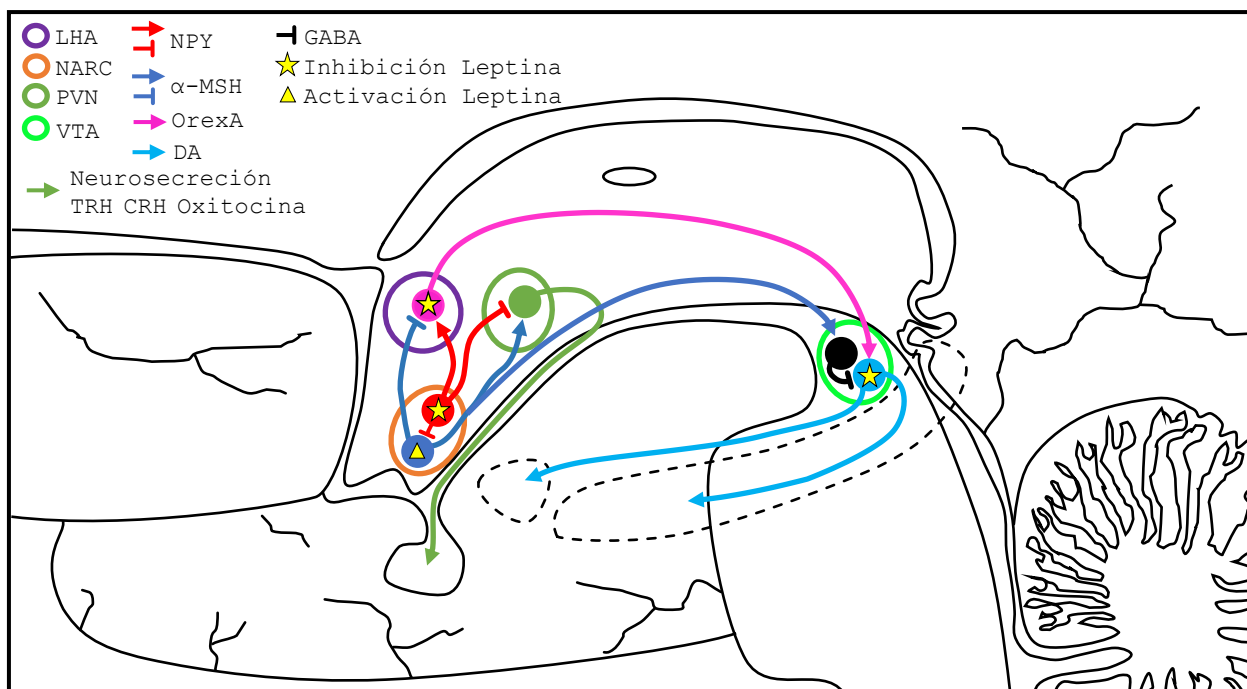


Figura 41: Proyecciones neuronales entre núcleos hipotalámicos con las acciones de los neuropéptidos sobre ellos mismos, el VTA y la hipófisis. LHA: Área Lateral del Hipotálamo. NARC: Núcleo Arcuato. PVN: Núcleo Paraventricular. VTA: Área Tegmental Ventral.

Estos resultados respaldan la hipótesis que la DA tiene funciones orexigénicas en el hipocampo⁴⁵, en contraposición a su función en el hipotálamo. Observando los *heatmaps*, claramente presentan diferencias entre ambas áreas, habiendo correlaciones negativas en el hipocampo ventral entre consumos o incremento de peso y vías monoaminérgicas (Figura 21).

No obstante, los resultados también mostraron una disminución del metabolito de la serotonina 5-HIAA en el hipocampo ventral de animales con la dieta HFD. Esta disminución puede ser consecuencia directa de la presencia de leptina ya que se ha descrito en ratas una disminución de la vía serotoninérgica en el hipocampo al administrarles leptina¹⁴⁷.

Los cambios en las concentraciones de neurotransmisores y sus metabolitos observados en la dieta HFD se revertieron parcialmente al incluir en la dieta los probióticos y los ácidos grasos ω -3. Los parámetros dopaminérgicos del hipocampo ventral disminuidos por la dieta HFD se igualaron a los de la dieta control. Además, los niveles de DOPAC hipotalámico incrementados en la dieta HFD disminuyeron hasta por debajo de los niveles de la dieta control. Al comparar la dieta T3 con la T4, los resultados en general sugirieron que la adición de ácidos grasos omega-3 normalizó, en mayor medida, las concentraciones de neuropéptidos y neurotransmisores tanto en hipotálamo como en hipocampo ventral. Estos resultados respaldarían las recientes evidencias de una existente relación entre el microbioma intestinal y el cerebro^{148,149}.

Las correlaciones entre los datos productivos y los neurotransmisores de las dietas T3 y T4 del hipotálamo (Figura 20) son bastantes similares a la dieta control y diferentes a la dieta HFD. Este patrón respalda la idea de que al añadir probióticos en una dieta HFD se revierten parcialmente los efectos producidos por el alto contenido en grasas. Es más, al añadir los ácidos grasos omega-3 en la dieta T4 las correlaciones entre los datos productivos y los neurotransmisores pasaron a ser negativas. Por otro lado, en el hipocampo, los cambios observados provocados por el probiótico o los ácidos grasos omega-3 en relación con la dieta HFD fueron pequeños, de hecho, los perfiles T3 y T4 se parecieron más a T2 que a la dieta control.

Ya se había descrito con anterioridad la posibilidad de modular el desarrollo cerebral y comportamental mediante probióticos, prebióticos y la dieta empleando la relación entre el microbioma intestinal y el cerebro^{150,151}. Específicamente, se ha descrito que las cepas de *Lactobacillus* pueden modular neurotransmisores (DA y 5-HT) en trastornos afectivos¹⁵¹ y que las sustancias prebióticas son capaces de modular los síntomas de la ansiedad afectando a los receptores de serotonina¹⁵². Además, los ácidos grasos omega-3 pueden contribuir a la protección de la integridad cerebral y la función cognitiva^{153,154}.

2. Efecto de la dieta materna sobre distintas áreas del sistema nervioso central en lechones:

Los cambios debidos a las dietas maternas durante la gestación en las distintas áreas cerebrales diseccionadas (Estudio 2) fueron menores a los cambios observados en animales que recibieron directamente las dietas del estudio (Estudio 1).

No obstante, las diferencias observadas en los animales tratados con placebo entre las distintas dietas maternas siguieron patrones similares a los animales que recibieron directamente las dietas. Así pues, dichas diferencias se centran en los niveles de catecolaminas en las distintas áreas cerebrales diseccionadas (Figura 24).

En los animales tratados con Placebo, los niveles de catecolaminas (TotalCAT) del hipotálamo se elevaron en los grupos de reducción (RPla) o sobrealimentación (SPla) comparando con la dieta maternas control (CPla). Este aumento viene dado sobre todo por la NA. En el hipotálamo una alta concentración de NA se ha relacionado con un incremento en la ingesta⁴⁵, por lo que el hecho de que se encontrase elevada tanto en los lechones cuyas madres tuvieron una dieta reducida como en los lechones cuyas madres tuvieron una dieta sobrealimentada plantea la posibilidad de dos alteraciones diferentes en el hipotálamo. Por un lado, se ha descrito que los lechones cuyas madres tuvieron dietas reducidas pueden sufrir un menor desarrollo en sus órganos y tejidos, especialmente del

tejido adiposo. El tejido adiposo poco desarrollado secreta poca leptina, lo que se traduce en una disminución de su concentración plasmática¹⁵⁵. En esta situación el tejido hipotalámico también presenta falta de desarrollo y deslocalización de los receptores de leptina¹⁵⁶. Además, altos niveles de leptina se han relacionado con una disminución en la concentración de NA y DA en el hipotálamo¹⁵⁷, por lo que el aumento de NA observado en este estudio puede ser efecto de una disminución de leptina en lechones cuyas madres tuvieron una dieta reducida. Tal y como se ha discutido anteriormente, una disminución de la leptina provoca un incremento de la ingesta, esta disminución se traduce en el aumento de la concentración del NPY en el hipotálamo observado en los resultados de este estudio. De ese modo tanto el aumento de los niveles de NA como los del NPY en el hipotálamo y el efecto que provocarán sobre la ingesta puede explicarse mediante la depleción de leptina debido al escaso desarrollo del tejido adiposo. Por otro lado, según la literatura, la descendencia de madres que estuvieron sobrealimentadas presenta niveles altos de leptina plasmática¹⁵⁸⁻¹⁶⁰, por lo que este aumento provocaría que los tejidos como el hipotalámico, hepático o muscular adquieran resistencia a la leptina¹⁶¹. Nuestros resultados indican que este efecto podría ser la causa del aumento en la concentración de NA en el hipotálamo de los lechones cuyas madres tuvieron una dieta sobrealimentada, mediante la falta de inhibición del NPY.

En cambio, se observaron efectos distintos entre las dietas maternas en el resto de áreas diseccionadas. El hipocampo mostró un aumento en el DOPAC en lechones cuyas madres tuvieron una dieta reducida, mientras que hubo una disminución en las madres con dietas sobrealimentadas. Este patrón sugiere que los lechones cuyas madres tuvieron una dieta reducida mantienen una señal orexigénica en el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, dado que, como se ha discutido anteriormente, la DA tiene efectos orexigénicos en áreas cerebrales no hipotalámicas. Por otro lado, en los lechones cuyas madres tuvieron la dieta sobrealimentada disminuyó la concentración de DOPAC. Este hecho sugiere la posibilidad de una disfunción de la conexión entre hipotálamo e hipocampo, ya que la disminución de DA en hipocampo inhibe la ingesta mientras que el hipotálamo mantiene señales orexigénicas por parte de neurotransmisores como la NA.

La disminución de la concentración de 3-MT del grupo de lechones RPla respecto al grupo SPla en el cuerpo estriado sugiere cambios en el sistema dopaminérgico de esta área cerebral. La activación dopaminérgica del cuerpo estriado se ha relacionado con estímulos alimenticios como el olor o la visualización de la comida y su posterior efecto en la activación del sistema de recompensa^{162,163}, estos hechos podrían explicar los cambios observados en el sistema dopaminérgico del cuerpo estriado debidos a las dietas maternas observados en este estudio.

3. Dietas maternas y tratamiento en la lactancia:

La metformina es un fármaco antidiabético e hipoglucemiante de tipo biguanida que al administrarse puede atravesar la barrera hematoencefálica y acumularse en distintas áreas cerebrales como el hipotálamo, cuerpo estriado, hipocampo y corteza prefrontal¹⁶⁴. El efecto principal de la metformina en la célula es la activación indirecta de la AMPK mediante el aumento de la ratio AMP/ATP celular por inhibición del complejo I mitocondrial^{165,166}. A nivel sistémico produce una disminución de los niveles de glucosa sanguíneos y reduce la ingesta de comida en roedores¹⁶⁶⁻¹⁶⁸. Esta reducción en la ingesta se debe en una reducción en los niveles de NPY hipotalámico¹⁶⁸.

De acuerdo con lo expuesto, los resultados de este estudio muestran una disminución del incremento de peso (Peso 28-2) de los animales (Figura 23) normalizándose los pesos entre las distintas condiciones maternas en animales tratados con metformina. Es decir, el efecto de la metformina es mayor en animales con mayor peso. Esta reducción en el incremento de peso puede ser debida tanto al efecto lipolítico que tiene la metformina al incrementar la β -oxidación celular mediante la activación de AMPK¹⁶⁹ como a la inhibición de la ingesta que produce la metformina^{170,171}.

Según estos efectos se hace plausible la posibilidad de que tanto la leptina como la metformina provoquen una inhibición en la ingesta en el área hipotalámica mediante la inhibición de la secreción de NPY. Los resultados en los niveles de NPY (Figura 27) de los animales tratados con metformina de nuestro estudio presentaron un patrón de disminución sobre todo en los lechones cuyas madres tuvieron una dieta reducida. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas debido a la alta variabilidad biológica.

Se ha descrito que la leptina disminuye la expresión de NPY mediante la cascada de señalización JAK-STAT iniciada en el receptor de leptina Ob-Rb a la par que aumenta la expresión de POMC inhibiendo FoxO1 vía PI3K⁶¹. También activa la maquinaria de traducción mediante la señalización de mTORC1 e inhibe la AMPK debido a una fosforilación inhibitoria en S485/491 de la subunidad α por S6K, previamente activada por el complejo mTORC1^{61,165,167}. Por otro lado, el efecto de la metformina hace aumentar mucho la ratio AMP/ATP lo que provoca una potente activación de la AMPK por fosforilación de T172¹⁶⁷, de modo que la AMPK activada fosforila a Raptor inhibiendo el complejo mTORC1 lo que provocaría una inhibición de la vía S6K¹⁶⁵ y, por tanto, la transcripción y la traducción¹⁷² incluyendo la del NPY (Figura 42). Incluso, si esta señal de disminución energética severa producida por la metformina perdura en el tiempo es capaz de provocar autofagia celular⁶¹. De ese modo se podría explicar la disminución de los niveles de NPY y de la ingesta debido a la administración de metformina, aunque en nuestro estudio este efecto sólo se observa entre los grupos RMet y RPla siendo una diferencia no significativa.

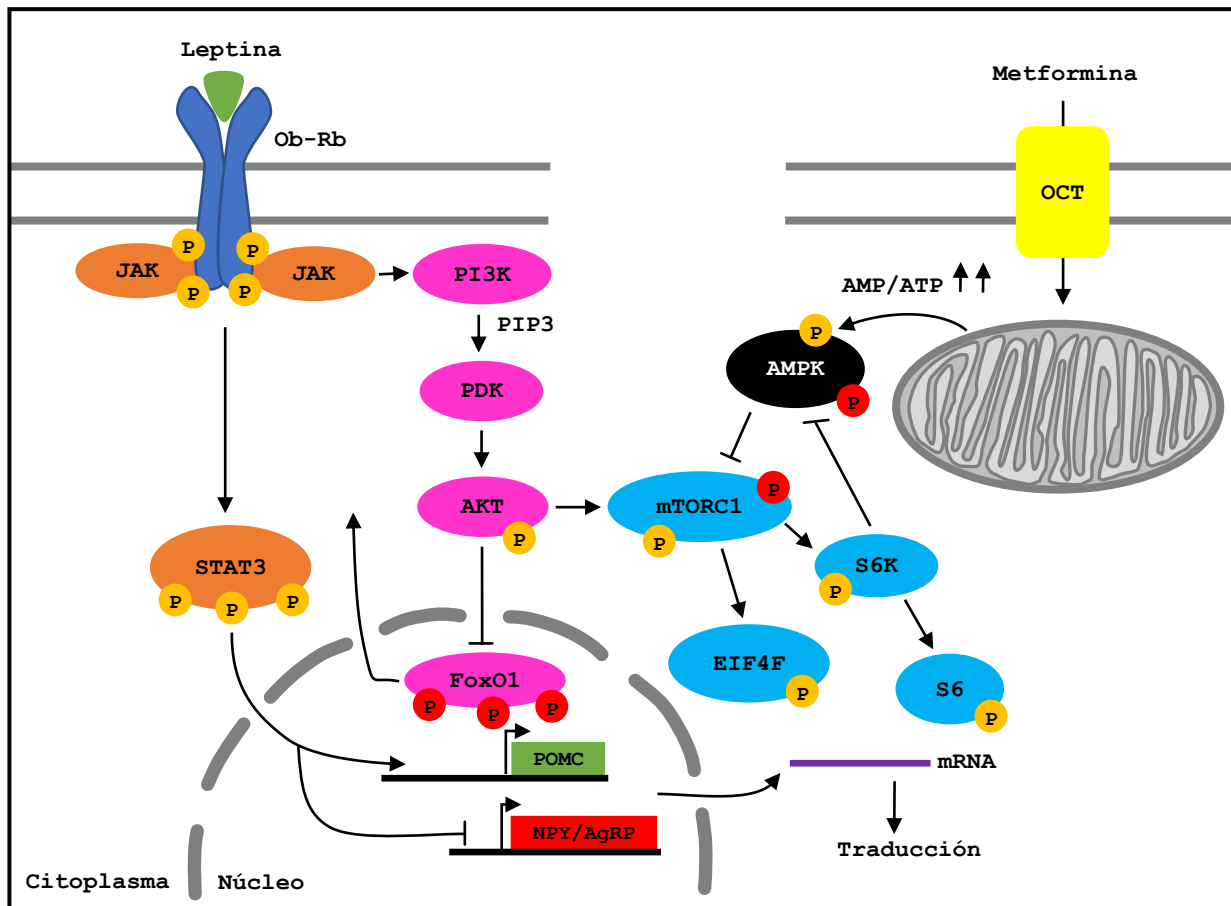


Figura 42: Cascada de señalización celular del receptor de leptina Ob-Rb junto con el efecto de la metformina sobre la célula. Las fosforilaciones amarillas son activadoras mientras que las rojas son inhibitoras.

No hay datos previos en la bibliografía sobre los efectos de la metformina sobre los neurotransmisores del SNC, pero nuestros resultados muestran que los efectos anorexigénicos de la metformina también se pueden observar indirectamente en el perfil de neurotransmisores. Los niveles de NA y TotalCAT hipotalámicos se igualaron entre las distintas dietas maternas, mientras que en el hipocampo y el cuerpo estriado la vía dopaminérgica siguió un patrón de disminución en el grupo SMet en comparación con los grupos RMet y CMet (Figura 25). Así la metformina provoca una señal anorexigénica al resto del cerebro exacerbada sobre todo en el grupo SMet.

Por otro lado, dicha señal se observa claramente al comparar los grupos SPla y SMet en los cuales disminuye significativamente la concentración de TotalDA en el cuerpo estriado (Figura 26) lo que puede provocar una menor reacción ante estímulos alimentación y, en consecuencia, una menor ingesta^{162,163}.

En definitiva, la depleción en los niveles de leptina plasmática descrita en animales que descienden de madres con una dieta de reducción y la resistencia a la leptina adquirida por una sobrealimentación materna se evidencia de manera indirecta en los resultados de este estudio mediante el perfil de

neurotransmisores en áreas cerebrales no hipotalámicas de lechones tratados con metformina. Por lo que la metformina promovió una señal anorexigénica en áreas cerebrales no hipotalámicas.

Al tratar a los lechones con metformina, el perfil de neurotransmisores en el hipotálamo reflejó, también, los efectos de una falta de señalización de la leptina. La metformina promovió una señal anorexigénica mediante el perfil de neurotransmisores, haciendo actuar al hipotálamo en concordancia con el resto de áreas cerebrales con el fin de provocar una disminución en la ingesta.

Finalmente, en ningún caso se observaron cambios en la concentración plasmática de aminoácidos libres. No obstante, sí que se observaron diferencias en los niveles de adrenalina plasmática. Los resultados de nuestro estudio muestran una disminución significativa en los niveles de adrenalina en animales tratados con metformina (Figura 28), aunque la disminución es significativa sólo al comparar el grupo RMet con el grupo RPla. Cabe destacar que esta disminución en la concentración de adrenalina se observa a pesar de que hubo un efecto estresante ambiental importante como el sacrificio de los lechones.

Este hecho puede estar relacionado con el efecto hipotensor de la metformina descrito en roedores. Se ha propuesto que la metformina inhibe el sistema nervioso simpático^{173,174} y reduce por tanto la secreción de noradrenalina y adrenalina al torrente sanguíneo por parte de las glándulas adrenales. Esta reducción en los niveles de noradrenalina y adrenalina causará una hipotensión ya que no se activan los receptores α -adrenérgicos que median la contracción de la musculatura lisa en los vasos sanguíneos. Además, al inhibir el sistema nervioso simpático, la metformina reduce la respuesta simpática de "lucha o huida" frente a un estímulo estresante en ratas¹⁷⁵.

Capítulo 3: Alteraciones en el perfil de neurotransmisores y en el proteoma producidas por la restricción del crecimiento intrauterino en un modelo porcino

La determinación de los neurotransmisores (Estudio 1) y las proteínas identificadas en el hipocampo mediante SWATH-MS DIA (Estudio 2) se analizaron en función del efecto de la restricción del crecimiento intrauterino y el sexo de los animales.

1. Efecto de la restricción intrauterina en el perfil de neurotransmisores del hipocampo y la amígdala:

El efecto de restricción intrauterina (IUGR) se caracteriza por un déficit en el crecimiento y el peso del individuo debido a la falta de nutrientes, oxígeno o una alteración en la placenta que puede llegar a provocar la carencia de dichos componentes esenciales para el desarrollo^{11,14}. El déficit de crecimiento se presenta de modo asimétrico, subdesarrollándose el torso y extremidades y manteniéndose el cráneo en un tamaño normal^{11,14}. Los órganos, por lo tanto, también presentan dicha asimetría por lo que el cerebro se intenta mantener en un desarrollo normal, este efecto se conoce como *brain sparing* y se ha descrito en distintas especies de mamíferos como cerdos, ovejas, humanos y cobayas¹⁷⁶.

Este efecto intenta mantener las funciones básicas críticas para la supervivencia del individuo conocidas como funciones autonómicas, tales como pueden ser la respiración o el reflejo de mamar. A pesar de eso, este efecto no garantiza el desarrollo normal y funcional del cerebro, puesto que se ha descrito que la descendencia afectada por el IUGR (LBW) puede sufrir desórdenes del comportamiento relacionados con la movilidad, cognitivos, memoria y disfunciones neurofisiológicas¹². Los modelos animales estudiados han mostrado que los individuos afectados por IUGR presentaron alteraciones en el hipocampo con consecuencias en el desarrollo neurológico normal¹³.

Los resultados de este estudio en el perfil de neurotransmisores hipocámpales no mostraron diferencias significativas en la concentración de DA entre lechones con peso normal (NBW) y lechones con IUGR (LBW), sin embargo, sí se mostraron aumentos significativos en las concentraciones de los metabolitos de la DA y las sumas de las vías (TotalDA y TotalCAT). Por otro lado, los niveles de NA mostraron un patrón inverso disminuyendo en animales LBW. Las diferencias en las concentraciones de neurotransmisores y sus metabolitos observadas en la amígdala mantenían el mismo perfil que en el hipocampo, pero fueron menos evidentes (Figura 29).

Así pues, la falta de desarrollo cerebral que se da en animales LBW se traduce en cambios en el metabolismo de los neurotransmisores, especialmente de la DA y sus metabolitos, de manera similar en a la descrita en conejos¹⁷⁷. Este aumento puede ser debido a que los individuos que presentan IUGR tienen elevada la actividad enzimática de L-aminoácido aromático descarboxilasa (AADC)¹⁷⁸, enzima involucrada en la síntesis de la DA. El aumento de actividad de esta enzima se ha relacionado con alteraciones neuronales y comportamentales en niños¹⁷⁹. Todas estas evidencias respaldan el hecho que el efecto IUGR en el cerebro puede afectar a las estructuras cerebrales dependientes del sistema dopaminérgico como pueden ser el sistema límbico, corteza prefrontal y cuerpo estriado, teniendo consecuencias en las capacidades fisiológicas e intelectuales del individuo¹⁷⁶.

El sistema dopaminérgico en el hipocampo está relacionado con movilidad y funciones cognitivas como aprendizaje, memoria y comportamientos relacionados con el sistema de recompensa^{180,181}, mientras que el sistema noradrenérgico se asocia con sistemas de atención y respuesta a situaciones de peligro, provocando la respuesta de "lucha o huida"¹⁸². Por lo tanto, la disminución en el nivel de NA observado en el hipocampo de animales LBW sugiere una falta de adaptabilidad al entorno la cual puede comprometer su supervivencia.

El incremento de las concentraciones de los metabolitos de la DA (DOPAC y HVA) en lechones LBW puede atribuirse también al estrés oxidativo producido por IUGR^{183,184}. Debido a esta situación de estrés las enzimas que catabolizan la DA incrementan su actividad en el hipocampo de ratas¹⁸⁵, este incremento en la actividad catabólica de la DA también se mostró en los resultados de este estudio con el aumento significativo de la ratio de degradación de la DA (HVA+DOPAC/DA) en el hipocampo. Todos estos procesos han sido identificados como la principal causa de una disfunción en las neuronas dopaminérgicas originando alteraciones comportamentales y neuropatologías^{186,187}.

Las diferencias en las indolaminas que se observaron en este estudio no fueron demasiado relevantes, salvo por una tendencia al incremento de 5-HIAA en lechones afectados por el IUGR en el hipocampo. Las indolaminas en el hipocampo se han asociado con comportamiento para conseguir alimento y el desarrollo social de los individuos⁵³. Además, se ha descrito que en situaciones de IUGR hay un incremento de la vía serotoninérgica en roedores¹⁸⁸. No obstante, también se han descrito incrementos de 5-HT o 5-HIAA y, sobre todo, la catabolización de la 5-HT en situaciones de estrés oxidativo en tejido hipocampal¹⁸⁵.

2. Efectos del sexo sobre la restricción intrauterina en el perfil de neurotransmisores y el proteoma del hipocampo:

La mayoría de datos describen que las diferencias en el metabolismo neuronal entre machos y hembras son sutiles. No obstante, estas diferencias del metabolismo neuronal se exacerban en situaciones de estrés y privación de nutrientes¹⁸⁹. Por otro lado, la malnutrición u otros factores estresantes durante la gestación tiene efectos contraproducentes en el metabolismo, el crecimiento y desarrollo, la transcripción, la abundancia de proteínas y múltiples vías de señalización celular en cerdos¹⁹⁰. Los niveles de DA cuantificados en este estudio aumentaron en machos NBW respecto a las hembras NBW, este aumento en las hembras respalda la hipótesis de que las neuronas femeninas tienen mejores aptitudes para su supervivencia y su desarrollo¹⁹¹⁻¹⁹³.

El proteoma del hipocampo analizado mediante SWATH-MS DIA también mostró claras diferencias entre hembras y machos. Todas las proteínas que en función del sexo mostraron diferencias significativas se identificaron utilizando una diferencia mínima de 1,20 veces y fue en todos los casos superior en hembras respecto a machos. Los grupos de proteínas identificadas englobaron las principales funciones celulares básicas. La mayoría de las proteínas relacionadas con el citoesqueleto están involucradas en el desarrollo neuronal, la cofilina-1 (COF1) es una proteína esencial en la migración celular para la formación de estructuras neuronales en ratones¹⁹⁴, DPYL2 y sus isoformas 4 y 5 están involucradas en desarrollo axonal de neuronas hipocampales^{195,196}, la paralemina-1 (PALM) está relacionada en la formación y maduración de espinas dendríticas y sinapsis en neuronas del hipocampo¹⁹⁷, la estatmina-1 (STMN1) también está involucrada en el dinamismo de los microtúbulos para la formación axonal y migración durante la neurogénesis del hipocampo¹⁹⁸, la tropomiosina-1 (TPM1) involucrada en el dinamismo del citoesqueleto de actina y la migración celular¹⁰⁹, por último, la α -sinucleína (SYUA) tiene funciones regulatorias en el transporte y secreción de la DA además de proporcionar protección contra estímulos apoptóticos en cultivos neuronales^{199,200}. Los aumentos en la abundancia de estas proteínas en las hembras respaldan la hipótesis discutida anteriormente de un mayor desarrollo y supervivencia neuronal en las hembras que en los machos.

Las proteínas implicadas en señalización muestran, junto con las ribosomales, las relacionadas con el plegamiento proteico y las de unión a ácidos nucleicos, una actividad transcripcional y de síntesis proteica más elevada en las hembras evidenciando, una vez más un mayor desarrollo, crecimiento y proliferación celular en hembras que en machos. Algunas de las proteínas sobre-expresadas que están directamente implicadas en la regulación de la transcripción fueron AN32A²⁰¹ y RACK1²⁰², también hubo proteínas esenciales para la traducción como EIF3E^{203,204}. Las histonas sobre-expresadas (H1X y H4) sugieren de nuevo un incremento en la proliferación celular y la expresión génica en hembras²⁰⁵.

Los incrementos de las proteínas englobadas en el grupo de funciones metabólicas están en consonancia con los procesos celulares descritos, estando la mayoría de las proteínas involucradas en el metabolismo de carbohidratos y ciclo de Krebs (ODPX, ALDH2, LDHA/B o TKT) o en el metabolismo aminoacídico (SYNA, ENOPH1 o EFTU). Además, también se encuentran en mayor abundancia proteínas metabólicas implicadas en el procesado de ROS que se forma durante la respiración celular (PRDX2/6, THIO o SODM). La sobre-expresión de estas proteínas es necesaria para suplir el requerimiento energético celular para la síntesis proteica, proliferación y crecimiento celular e incluso la migración.

Cuando se analizan las proteínas incluyendo el factor IUGR, la cantidad de proteínas identificadas en la comparación entre hembras y machos LBW disminuyó drásticamente. Sin embargo, la clasificación de los grupos GO de proteínas obtenidos comparado hembras y machos se mantiene cuando se incluye el factor IUGR.

La cantidad de proteínas relacionadas con el citoesqueleto en la comparación entre hembras y machos LBW disminuyó respecto a las proteínas entre hembras y machos NBW. En el análisis, desaparecieron proteínas involucradas en desarrollo neuronal y formación axonal (DPYLS, STMN, PALM), mientras que proteínas relacionadas con migración, transducción de señales dopaminérgicas o supervivencia a estímulos apoptóticos (TPM1 y SYUA) se mantuvieron entre hembras y machos LBW. Estos resultados sugieren que ante un efecto de falta de nutrientes como la IUGR se priorizan procesos celulares como la migración para la formación hipocámpal y la supervivencia neuronal en detrimento de creaciones sinápticas y proyecciones neuronales. Teniendo en cuenta que estos procesos se observan comparando hembras y machos, se respalda la hipótesis de una mayor supervivencia de neuronas femeninas que masculinas en situaciones de restricción.

El grupo de expresión de proteínas ribosomales dejó de tener una expresión diferencial entre hembras y machos LBW mientras que en se mantuvo entre hembras y machos NBW. Las proteínas implicadas en plegamiento disminuyeron su número entre hembras y machos LBW. Además, tanto las proteínas de señalización que regulan la traducción y la síntesis proteica (EIF3E y RACK1) como la de unión a ácidos nucleicos (H4) no fueron diferentes entre hembras y machos LBW. Estos resultados evidencian una merma en los procesos celulares de transcripción y traducción de proteínas en las hembras debido al efecto IUGR que afecta negativamente a la proliferación y el desarrollo neuronal.

El número de proteínas con relación en el metabolismo celular también disminuyó en el análisis entre hembras y machos LBW. La respiración celular fue la principal afectada dado que las proteínas relacionadas con la eliminación de las ROS generadas durante ese proceso (PRDX2/6, THIO y SODM) desaparecieron de la lista de proteínas identificadas en las hembras LBW. Las proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos se redujeron también (ODPX). En contraposición, la cantidad de proteínas relacionadas en transporte

aumentaron entre hembras y machos LBW, destacando proteínas relacionadas con el transporte de lípidos (FABPH). Todos estos cambios sugieren una readaptación metabólica de las neuronas femeninas hipocampales debido a la falta de nutrientes provocada por la restricción intrauterina. Esta readaptación se ha asociado a un cambio de la obtención energética celular, las neuronas femeninas en situaciones de desnutrición recurren a un sistema de supervivencia relacionado con la formación de vesículas lipídicas a partir de la membrana celular y la oxidación lipídica para la obtención de energía, mientras que las neuronas masculinas oxidan proteínas sometiéndose a procesos de autofagia^{189,192}. Por lo tanto, las neuronas femeninas en una situación de depleción energética ambiental son capaces de sobrevivir más eficientemente que las neuronas masculinas.

Así pues, todos estos resultados mostraron diferencias sexuales en el desarrollo y formación hipocampal en animales con un peso normal, presentando las hembras evidencias de un desarrollo avanzado respecto a los machos. Al aparecer una situación estresante como la restricción intrauterina dichas diferencias se mitigan y las neuronas hembras recurren a estrategias para la supervivencia del individuo, cambiando su metabolismo y priorizando la estructuración y la supervivencia celular del área hipocampal (Figura 43).

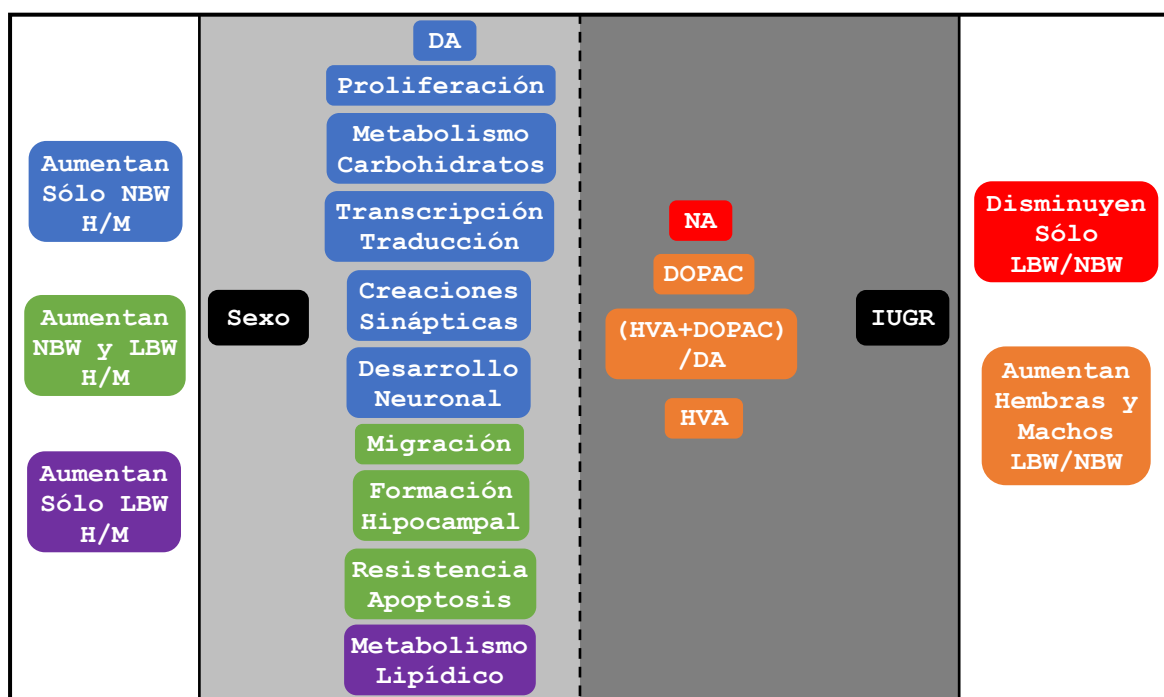


Figura 43: Figura integrativa de los efectos de la IUGR y el sexo. Los cambios en los neurotransmisores, metabolitos y las funciones biológicas en las que están implicadas las proteínas identificadas por SWATH-MS muestran cómo afecta el IUGR al desarrollo hipocampal en función del sexo del lechón.

Conclusiones

"Las causas están ocultas. Los efectos son visibles para todos". Ovidio

Capítulo 1: Efecto del estrés y la relación humano-animal en la inmunofisiología y el proteoma de PBMC del cerdo

1. La variación en los niveles de cortisol en pelo y las proteínas de fase aguda sugieren que los cambios a lo largo de dos meses de experimento se debieron principalmente a la disminución del grado de estrés de los animales al readaptarse a la granja después de la mezcla de individuos.
2. Los cambios en el proteoma de las PBMCs a lo largo del tiempo reflejan la variación del cortisol endógeno y del grado de estrés de los animales.
3. Los tratamientos de manejo aplicados a los animales no fueron lo bastante contundentes como para observar un cambio claro en la fisiología porcina.
4. Todos los resultados descritos en este estudio evidencian una relación compleja entre el estrés, el manejo de los animales y las células del sistema inmune.

Capítulo 2: Efecto de los cambios en la dieta sobre la señalización por neurotransmisores y neuropéptidos en el sistema nervioso central

1. Alimentar a los animales durante 10 semanas con una dieta HFD provoca cambios en la concentración de neuropéptidos hipotalámicos implicados en la ingesta y la de los NTs en el hipocampo ventral e hipotálamo, principalmente los de la vía dopaminérgica.
2. La inclusión de *Bifidobacterium breve* y ácidos grasos ω -3 o la combinación de ambos en la dieta HFD revierten parcialmente los efectos de la dieta HFD sobre los neuropéptidos y los NTs.
3. Las dietas maternas con reducción y sobrealimentación durante la gestación alteran el perfil de NTs de la vía dopaminérgica en el hipocampo e hipotálamo de los lechones.
4. El tratamiento con metformina normaliza el incremento de peso de los lechones cuyas madres tuvieron dietas de reducción y sobrealimentación.
5. La metformina induce una señal anorexigénica en el SNC mediante cambios en el perfil de NTs, además de inhibir el sistema nervioso simpático reduciendo la respuesta de "lucha y huida" del organismo.

Capítulo 3: Alteraciones en el perfil de neurotransmisores y en el proteoma producidas por la restricción del crecimiento intrauterino en un modelo porcino

1. La restricción del crecimiento intrauterino altera de igual manera en hembras y machos los neurotransmisores de la vía dopaminérgica, especialmente la ratio de degradación de la DA.
2. El análisis proteómico del hipocampo de lechones de peso normal muestra evidencias de un mayor desarrollo estructural y neuronal y actividad metabólica en las hembras que en los machos.
3. El análisis proteómico del hipocampo de lechones sometidos a restricción del crecimiento intrauterino muestra menos diferencias en el desarrollo estructural y neuronal del hipocampo entre hembras y machos que los animales de peso normal.
4. En hembras, las neuronas hipocampales afectadas por la restricción del crecimiento intrauterino muestran evidencias de una mayor resistencia ante estresores metabólicos como la falta de nutrientes que en machos.

Referencias

"Hay alguien tan inteligente que aprende de las experiencias de los demás".

Voltaire

1. Marco-Ramell, A., de Almeida, A. M., Cristobal, S., Rodrigues, P., Roncada, P. & Bassols, A. Proteomics and the search for welfare and stress biomarkers in animal production in the one-health context. *Mol. Biosyst.* 12, 2024-2035 (2016).
2. Bassols, A., Bendixen, E. & Miller, I. From Farm to Fork: Proteomics in Farm Animal Care and Food Production. Colgrave, M. L. *Proteomics in food science: from farm to fork.* 9, 145-157 (2017).
3. Bassols, A., Turk, R. & Roncada, P. A Proteomics Perspective: From Animal Welfare to Food Safety. *Curr. Protein Pept. Sci.* 15, 156-168 (2014).
4. Fraser, D. Understanding animal welfare. *Acta Vet. Scand.* 50, 1-7 (2008).
5. Broom, D. M. Animal welfare: concepts and measurement. *J. Anim. Sci.* 69, 4167-4175 (1991).
6. Selye, H. Stress and the general adaptation syndrome. *Br. Med. J.* 1, 1383-92 (1950).
7. Goldstein, D. S. & Kopin, I. J. Evolution of concepts of stress. *Stress* 10, 109-120 (2007).
8. Pacák, K. & Palkovits, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: Implications for stress-related disorders. *Endocr. Rev.* 22, 502-548 (2001).
9. Bell, A. W. & Ehrhardt, R. A. Regulation of placental nutrient transport and implications for fetal growth. *Nutr. Res. Rev.* 15, 211 (2002).
10. Wu, G., Bazer, F. W., Cudd, T. a, Meininger, C. J. & Spencer, T. E. Maternal Nutrition and Fetal Development. *J. Nutr.* 134, 2169-2172 (2004).
11. Yu, V. Y. H. & Upadhyay, A. Neonatal management of the growth-restricted infant. *Semin. Fetal Neonatal Med.* 9, 403-409 (2004).
12. Perry, B. Childhood experience and the expression of genetic potential: What childhood neglect tells us about nature and nurture. *Brain mind* 3, 79-100 (2002).
13. Miller, S. L., Huppi, P. S. & Mallard, C. The consequences of fetal growth restriction on brain structure and neurodevelopmental outcome. *J. Physiol.* 594, 807-823 (2016).
14. McMillen, I. C., Adams, M. B., Ross, J. T., Coulter, C. L., Simonetta G., Owens, J. A., Robinson J. S. & Edwards L. J. Fetal growth restriction: Adaptations and consequences. *Reproduction* 122, 195-204 (2001).
15. Moore, L. G., Niermeyer, S. & Zamudio, S. Human adaptation to high altitude: regional and life-cycle perspectives. *Am. J. Phys. Anthropol.* 27, 25-64 (1998).
16. Baschat, A. A. Fetal responses to placental insufficiency: An update. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* 111, 1031-1041 (2004).
17. Gonzalez-Bulnes, A., Astiz, S., Ovilo, C., Lopez-Bote, C. J., Torres-Rovira, L., Barbero, A., Ayuso, M., Garcia-Contreras, C. & Vazquez-Gomez, M. Developmental Origins of Health and Disease in swine: Implications for animal production and biomedical research. *Theriogenology* 86, 110-119 (2016).
18. Ashworth, C. J., Finch, A. M., Page, K. R., Nwagwu, M. O. & McArdle, H. J. Causes and consequences of fetal growth retardation in pigs. *Reprod. Suppl.* 58, 233-246 (2001).

Referencias

19. Foxcroft, G. R., Dixon, W. T., Novak, S., Putman, C. T., Town, S. C. & Vinsky, M. D. The biological basis for prenatal programming of postnatal performance in pigs. *J. Anim. Sci.* 84 , 105-112 (2006).
20. Stolba, A. & Wood-Gush, D. G. The identification of behavioural key features and their incorporation into a housing design for pigs. *Ann. Rech. Vet.* 15, 287-299 (1984).
21. Arey, D. S. & Franklin, M. F. Effects of straw and unfamiliarity on fighting between newly mixed growing pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 45, 23-30 (1995).
22. Van Staaveren, N., Teixeira, D. L., Hanlon, A. & Boyle, L. A. The effect of mixing entire male pigs prior to transport to slaughter on behaviour, welfare and carcass lesions. *PLoS One* 10, 1-15 (2015).
23. Oliván, M., Fernández-Suárez, V., Díaz-Martínez, F., Sierra, V., Coto-Montes, A., Luxán-Delgado, B., Peña, R., Bassols, A., Fàbrega, E., Dalmau, A. & Velarde, A. Identification of Biomarkers of Stress in Meat of Pigs Managed under Different Mixing Treatments. *Br. Biotechnol. J.* 11, 1-13 (2016).
24. Blanchard, D. C. & Blanchard, R. J. Defensive behaviors, fear, and anxiety. *Handb. Behav. Neurosci.* 17, 63-79 (2008).
25. Lang, P. J., Davis, M. & Öhman, A. Fear and anxiety: Animal models and human cognitive psychophysiology. *J. Affect. Disord.* 61, 137-159 (2000).
26. Waiblinger, S., Boivin X., Pedersen, V., Tossi, M. V., Janczak, A. M., Visser, E. K. & Jones, R. B. Assessing the human-animal relationship in farmed species: A critical review. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 101, 185-242 (2006).
27. Rushen, J., Taylor, A. A. & De Passillé, A. M. Domestic animals' fear of humans and its effect on their welfare. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 65, 285-303 (1999).
28. Hemsworth, P. H. Human-animal interactions in livestock production. in *Applied Animal Behaviour Science* 81, 185-198 (2003).
29. Hemsworth, P. H., Barnett, J. L. & Hansen, C. The influence of handling by humans on the behaviour, reproduction and corticosteroids of male and female pigs. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 15, 303-314 (1986).
30. Herman, J. P. & Cullinan, W. E. Neurocircuitry of stress: Central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci.* 20, 78-84 (1997).
31. Herman, J. P., Figueiredo, H., Mueller, N. K., Ulrich-Lai, Y., Ostrander, M. M., Choi, D. C. & Cullinan, W. E. Central mechanisms of stress integration: Hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front. Neuroendocrinol.* 24, 151-180 (2003).
32. Martínez-Miró, S., Tecles, F., Ramón, M., Escribano, D., Hernández, F., Madrid, J., Orengo, J., Martínez-Subiela, S. & Manteca, X. Causes, consequences and biomarkers of stress in swine: an update. *BMC Vet. Res.* 12, 171-180 (2016).
33. Bassols, A., Costa, C., Eckersall, P. D., Osada, J., Sabrià, J. & Tibau, J. The pig as an animal model for human pathologies: A proteomics perspective. *Proteomics Clin. Appl.* 8, 715-731 (2014).
34. Chrousos, G. P. Stress and disorders of the stress system. *Nat. Rev. Endocrinol.* 5, 374-381 (2009).

35. Tovote, P., Fadok, J. P. & Lüthi, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. *Nat. Rev. Neurosci.* 16, 317-331 (2015).
36. Ledoux, J. E. Emotion Circuits in the Brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 155-184 (2000).
37. Maren, S. & Holmes, A. Stress and fear extinction. *Neuropsychopharmacology* 41, 58-79 (2016).
38. Yu, J. H. & Kim, M. S. Molecular Mechanisms of Appetite Regulation. *Diabetes Metab. J.* 36, 391-398 (2012).
39. Allison, M. B. & Myers, M. G. Connecting leptin signaling to biological function. *J. Endocrinol.* 223, 25-35 (2014).
40. Goto, M., Arima, H., Watanabe, M., Hayashi, M., Bano, R., Sato, I., Nagasaki, H. & Osio, Y. Ghrelin increases neuropeptide Y and agouti-related peptide gene expression in the arcuate nucleus in rat hypothalamic organotypic cultures. *Endocrinology* 147, 5102-5109 (2006).
41. Loh, K., Zhang, L., Brandon, A., Wang, Q., Begg, D., Qi, Y., Fu, M., Kulkarni, R. & Teo, J. Insulin controls food intake and energy balance via NPY neurons. *Mol. Metab.* 6, 574-584 (2017).
42. Nestler, E. J., Hyman, S. E., Holtzman, D. M. & Malenka, R. C. *Molecular Neuropharmacology: a foundation for clinical neuroscience*. The McGraw-Hill Companies (2015).
43. Arnsten, A. F. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 410-422 (2009).
44. Joca, S. R., Ferreira, F. R. & Guimarães, F. S. Modulation of stress consequences by hippocampal monoaminergic, glutamatergic and nitrenergic neurotransmitter systems. *Stress* 10, 227-249 (2007).
45. Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Seeley, R. J. & Baskin, D. G. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404, 661-671 (2000).
46. Ayano, G. Dopamine: Receptors, Functions, Synthesis, Pathways, Locations and Mental Disorders: Review of Literatures. *J. Ment. Disord. Treat.* 2, 2-5 (2016).
47. Neve, K. A., Seamans, J. K. & Trantham-Davidson, H. Dopamine receptor signaling. *J. Recept. Signal Transduct.* 24, 165-205 (2004).
48. Berridge, C. W. & Waterhouse, B. D. The locus coeruleus-noradrenergic system: Modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res. Rev.* 42, 33-84 (2003).
49. Douglas, A. J. Central noradrenergic mechanisms underlying acute stress responses of the Hypothalamo-pituitary-adrenal axis: Adaptations through pregnancy and lactation. *Stress* 8, 5-18 (2005).
50. Albert, P. R., Vahid-Ansari, F. & Luckhart, C. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. *Front. Behav. Neurosci.* 8, 1-13 (2014).
51. Andrews, M. H. & Matthews, S. G. Programming of the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis: Serotonergic Involvement. *Stress* 7, 15-27 (2004).
52. Lam, D. D., Garfield, A. S., Marston, O. J., Shaw, J. & Heisler, L. K. Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 97, 84-91 (2010).

Referencias

53. Berumen, L. C., Rodríguez, A., Miledi, R. & García-Alcocer, G. Serotonin Receptors in Hippocampus. *Sci. World J.* 2012, 1-15 (2012).
54. Nichols, D. E. & Nichols, C. D. Serotonin Receptors. *Chem. Rev.* 108, 1614-1641 (2008).
55. Jansen, A. S., Nguyen, X. V., Karpitskiy, V., Mettenleiter, T. C. & Loewy, A. D. Central Command Neurons of the Sympathetic Nervous System: Basis of the Fight-or-Flight Response. *Science* 270, 644-646 (1995).
56. Elenkov, I. J. & Chrousos, G. P. Stress Hormones, Proinflammatory and Antiinflammatory Cytokines, and Autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 966, 290-303 (2002).
57. Smith, S. M. & Vale, W. W. The role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in neuroendocrine responses to stress. *Dialogues Clin. Neurosci.* 8, 383-395 (2006).
58. Houseknecht, K. L., Baile, C. A., Matteri, R. L. & Spurlock, M. E. The biology of leptin: a review. *J. Anim. Sci.* 76, 1405-20 (1998).
59. Amitani, M., Asakawa, A., Amitani, H. & Inui, A. The role of leptin in the control of insulin-glucose axis. *Front. Neurosci.* 7, 1-12 (2013).
60. Cammisotto, P. G. & Bukowiecki, L. J. Mechanisms of leptin secretion from white adipocytes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283, 244-250 (2002).
61. Varela, L. & Horvath, T. L. Leptin and insulin pathways in POMC and AgRP neurons that modulate energy balance and glucose homeostasis. *EMBO Rep.* 13, 1079-1086 (2012).
62. Sakata, I. & Sakai, T. Ghrelin cells in the gastrointestinal tract. *Int. J. Pept.* 2010, 1-7 (2010).
63. Beck, B. & Pourié, G. Ghrelin, neuropeptide Y, and other feeding-regulatory peptides active in the Hippocampus: Role in learning and memory. *Nutr. Rev.* 71, 541-561 (2013).
64. Konturek, S. J., Konturek, P. C., Konturek, J. W., Czesnikiewicz-Guzik, M., Brzozowski, T. & Sito, E. Neuro-hormonal control of food intake; Basic mechanisms and clinical implications. *J. Physiol. Pharmacol.* 56, 5-25 (2005).
65. Van Zessen, R., Van Der Plasse, G. & Adan, R. A. Contribution of the mesolimbic dopamine system in mediating the effects of leptin and ghrelin on feeding. *Proc. Nutr. Soc.* 71, 435-445 (2012).
66. Schwartz, M. D. & Kilduff, T. S. The Neurobiology of Sleep and Wakefulness. *Psychiatr. Clin. North Am.* 38, 615-644 (2015).
67. Fernø, J., Señarís, R., Diéguez, C., Tena-Sempere, M. & López, M. Orexins (hypocretins) and energy balance: More than feeding. *Mol. Cell. Endocrinol.* 418, 17-26 (2015).
68. Karas, M., Bachmann, D. & Hillenkamp, F. Influence of the Wavelength in High-Irradiance Ultraviolet Laser Desorption Mass Spectrometry of Organic Molecules. *Anal. Chem.* 57, 2935-2939 (1985).
69. Karas, M. & Hillenkamp, F. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons. *Anal. Chem.* 60, 2299-2301 (1988).
70. Kuhla, B., Kuhla, S., Rudolph, P. E., Albrecht, D. & Metges, C. C. Proteomics analysis of hypothalamic response to energy restriction in dairy cows. *Proteomics* 7, 3602-3617 (2007).

71. Lametsch, R., Kristensen, L., Larsen, M. R., Therkildsen, M., Oksbjerg, N. & Ertbjerg, P. Changes in the muscle proteome after compensatory growth in pigs. *J. Anim. Sci.* 84, 918-924 (2006).
72. Ding, Q., Vaynman, S., Souda, P., Whitelegge, J. P. & Gomez-Pinilla, F. Exercise affects energy metabolism and neural plasticity-related proteins in the hippocampus as revealed by proteomic analysis. *Eur. J. Neurosci.* 24, 1265-1276 (2006).
73. Carboni, L., Piubelli, C., Pozzato, C., Astner, H., Arban, R., Righetti, P. G., Hamdan, M. & Domenici, E. Proteomic analysis of rat hippocampus after repeated psychosocial stress. *Neuroscience* 137, 1237-1246 (2006).
74. Billing, A. M., Revets, D., Hoffmann, C., Turner, J. D., Vernocchi, S. & Muller, C. P. Proteomic profiling of rapid non-genomic and concomitant genomic effects of acute restraint stress on rat thymocytes. *J. Proteomics* 75, 2064-2079 (2012).
75. Moore, R. E., Kirwan, J., Doherty, M. K. & Whitfield, P. D. Biomarker discovery in animal health and disease: the application of post-genomic technologies. *Biomark. Insights* 2, 185-196 (2007).
76. Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené, D., Malkmvist, J., Manteca, X., Manteuffel, G. & Prunet, P. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol. Behav.* 92, 317-339 (2007).
77. Russell, E., Koren, G., Rieder, M. & Van Uum, S. Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology* 37, 589-601 (2012).
78. Marco-Ramell, A., Pato, R., Peña R., Saco, Y., Manteca, X., Ruiz de la Torre, J. L. & Bassols, A. Identification of serum stress biomarkers in pigs housed at different stocking densities. *Vet. J.* 190, 66-71 (2011).
79. Lykkesfeldt, J. & Svendsen, O. Oxidants and antioxidants in disease: Oxidative stress in farm animals. *Vet. J.* 173, 502-511 (2007).
80. Arroyo, L., Carreras, R., Valent, D., Peña, R., Mainau, E., Velarde, A., Sabrià, J. & Bassols, A. Effect of handling on neurotransmitter profile in pig brain according to fear related behaviour. *Physiol. Behav.* 167, 374-381 (2016).
81. Sabrià, J., Torres, D., Pastó, M., Peralba, J. M., Allali-Hassani, A. & Parés, X. Release of neurotransmitters from rat brain nerve terminals after chronic ethanol ingestion: Differential effects in cortex and hippocampus. *Addict. Biol.* 8, 287-294 (2003).
82. Caroli, S., Jarvis, J. & Magos, L. Carbon disulphide exposure affects the response of rat adrenal medulla to hypothermia and hypoglycaemia. *Br. J. Pharmacol.* 84, 357-363 (1985).
83. González-de-la-Vara, M. R., Valdez, R. A., Lemus-Ramírez, V., Vázquez-Changoyán, J. C., Villa-Godoy, A. & Romano, M. C. Effects of adrenocorticotrophic hormone challenge and age on hair cortisol concentrations in dairy cattle. *Can. J. Vet. Res.* 75, 216-221 (2011).
84. Gow, R., Thomson, S., Rieder, M., Van Uum, S. & Koren, G. An assessment of cortisol analysis in hair and its clinical applications. *Forensic Sci. Int.* 196, 32-37 (2010).
85. Saco, Y., Docampo, M. J., Fàbrega, E., Manteca, X., Diestre, A., Lampreave, F. & Bassols, A. Effect of transport stress on serum haptoglobin and pig-map in pigs. *Anim. Welf.* 12, 403-409 (2003).

Referencias

86. Salamano, G., Mellia, E., Candiani, D., Ingravalle, F., Bruno, R., Ru, G. & Doglione L. Changes in haptoglobin, C-reactive protein and pig-MAP during a housing period following long distance transport in swine. *Vet. J.* 177, 110-115 (2008).
87. Piñeiro, M., Piñeiro, C., Carpintero, R., Morales, J., Campbell, F. M., Eckersall, P. D., Toussaint, M. J. & Lampreave, F. Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. *Vet. J.* 173, 669-674 (2007).
88. Saco, Y., Fraile, L., Giménez, M., Pato, R., Montoya, M. & Bassols, A. Haptoglobin serum concentration is a suitable biomarker to assess the efficacy of a feed additive in pigs. *Animal* 4, 1561-1567 (2010).
89. Perretti, M. & D'Acquisto, F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 9, 62-70 (2009).
90. Paquerau, L., Vilarem, M. J., Rossi, V., Rouayrenc, J. F. & Le Cam, A. Regulation of two rat serine-protease inhibitor gene promoters by somatotropin and glucocorticoids: Study with intact hepatocytes and cell-free systems. *Eur. J. Biochem.* 209, 1053-1061 (1992).
91. Frank, M. G., Weber, M. D., Watkins, L. R. & Maier, S. F. Stress sounds the alarm: The role of the danger-associated molecular pattern HMGB1 in stress-induced neuroinflammatory priming. *Brain. Behav. Immun.* 48, 1-7 (2015).
92. Forster, F., Paster, W., Supper, V., Schatzlmaier, P., Sunzenauer, S., Ostler, N., Saiba, A., Eckerstrofer, P., Britzen-Lauren, N., Schutz, G., Schmid, J. A., Zlabinger, C. J., Naschberger, E., Sturzl, M. & Strockinger H. Guanylate Binding Protein 1-Mediated Interaction of T Cell Antigen Receptor Signaling with the Cytoskeleton. *J. Immunol.* 192, 771-781 (2014).
93. Oliveira, R. A., Correia-Oliveira, J., Tang, L. J. & Garcia, R. C. A proteomic insight into the effects of the immunomodulatory hydroxynaphthoquinone lapachol on activated macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 14, 54-65 (2012).
94. Billing, A. M., Fack, F., Renaut, J., Olinger, C. M., Schote, A. B., Turner, J. D. & Muller, C. P. Proteomic analysis of the cortisol-mediated stress response in THP-1 monocytes using DIGE technology. *J. Mass Spectrom.* 42, 1433-1444 (2007).
95. Auboeuf, D., Batsché, E., Dutertre, M., Muchardt, C. & O'Malley, B. W. Coregulators: transducing signal from transcription to alternative splicing. *Trends Endocrinol. Metab.* 18, 122-129 (2007).
96. Kornblihtt, A. R. Multiple links between transcription and splicing. *RNA* 10, 1489-1498 (2004).
97. Kornblihtt, A. R. Promoter usage and alternative splicing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 262-268 (2005).
98. Truckenmiller, M. E., Bonneau, R. H. & Norbury, C. C. Stress presents a problem for dendritic cells: Corticosterone and the fate of MHC class I antigen processing and presentation. *Brain. Behav. Immun.* 20, 210-218 (2006).
99. Brenner, B. G. & Wainberg, Z. Heat shock proteins: novel therapeutic tools for HIV-infection? *Expert Opin. Biol. Ther.* 1, 67-77 (2001).
100. Von Hahn, T. & Ciesek, S. Cyclophilin polymorphism and virus infection. *Curr. Opin. Virol.* 14, 47-49 (2015).
101. Zhou, D., Mei, Q., Li, J. & He, H. Cyclophilin A and viral infections. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 424, 647-650 (2012).

102. Liu, X., Zhao, Z. & Liu, W. Insights into the roles of Cyclophilin A during influenza virus infection. *Viruses* 5, 182-191 (2013).
103. de Wilde, A. H., Li, Y., van der Meer, Y., Vuagniaux, G., Lysek, R., Fang, Y., Snijder, E. J. & van Hemert, M. J. Cyclophilin Inhibitors Block Arterivirus Replication by Interfering with Viral RNA Synthesis. *J. Virol.* 87, 1454-1464 (2013).
104. Cao, S., Carlesso, G., Osipovich A. B., Llanes, J., Lin, Q., Hoek, K. L., Khan, W. N. & Ruley, H. E. Subunit 1 of the Prefoldin Chaperone Complex Is Required for Lymphocyte Development and Function. *J. Immunol.* 181, 476-484 (2008).
105. Grantham, J., Brackley, K. I. & Willison, K. R. Substantial CCT activity is required for cell cycle progression and cytoskeletal organization in mammalian cells. *Exp. Cell Res.* 312, 2309-2324 (2006).
106. Braun, T. P. & Marks, D. L. The regulation of muscle mass by endogenous glucocorticoids. *Front. Physiol.* 6, 1-12 (2015).
107. Tonomura, N., McLaughlin, K., Grimm, L., Goldsby, R. A. & Osborne, B. A. Glucocorticoid-induced apoptosis of thymocytes: requirement of proteasome-dependent mitochondrial activity. *J. Immunol.* 170, 2469-24678 (2003).
108. Dupré, L., Houmadi, R., Tang, C. & Rey-Barroso, J. T Lymphocyte Migration: An Action Movie Starring the Actin and Associated Actors. *Front. Immunol.* 6, 1-18 (2015).
109. Lees, J. G., Bach, C. T. & Neill, G. M. Tropomyosin in actin dynamics and cell migration. *Cell Adh. Migr.* 5, 181-186 (2011).
110. Gailani, D., Fisher, T. C., Mills, D. C. & Macfarlane, D. E. P47 phosphoprotein of blood platelets (pleckstrin) is a major target for phorbol ester-induced protein phosphorylation in intact platelets, granulocytes, lymphocytes, monocytes and cultured leukaemic cells: absence of P47 in non-haematopoietic cells. *Br. J. Haematol.* 74, 192-202 (1990).
111. Coutts, A. S., MacKenzie, E., Griffith, E. & Black, D. M. TES is a novel focal adhesion protein with a role in cell spreading. *J. Cell Sci.* 116, 897-906 (2003).
112. Voegtli, W. C., Madrona, A. Y. & Wilson, D. K. The Structure of Aiplp, a WD Repeat Protein That Regulates Cofilin-mediated Actin Depolymerization. *J. Biol. Chem.* 278, 34373-34379 (2003).
113. Arias, M. P. & Pacaud, M. Macrophage caldesmon is an actin bundling protein. *Biochemistry* 40, 12974-12982 (2001).
114. Wu, K. C. & Jin, J. P. Calponin in non-muscle cells. *Cell Biochemistry and Biophysics* 52, 139-148 (2008).
115. Ammari, M., McCarthy, F. M., Nanduri, B. & Pinchuk, L. M. Analysis of Bovine Viral Diarrhea Viruses-infected monocytes: identification of cytopathic and non-cytopathic biotype differences. *BMC Bioinformatics* 11, 1-14 (2010).
116. Flint, M. S., Budiu, R. A., Teng, P. N., Sun, M., Stolz, D. B., Lang, M., Hood, B. L., Vlad, A. M. & Conrads, T. P. Restraint stress and stress hormones significantly impact T lymphocyte migration and function through specific alterations of the actin cytoskeleton. *Brain. Behav. Immun.* 25, 1187-1196 (2011).

Referencias

117. Burke, N. C., Scaglia, G., Boland, H. T. & Swecker, W. S. Influence of two-stage weaning with subsequent transport on body weight, plasma lipid peroxidation, plasma selenium, and on leukocyte glutathione peroxidase and glutathione reductase activity in beef calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 127, 365-370 (2009).
118. Chirase, N. K., Greene, L. W., Purdy, C. W., Loan, R. W., Auvermann, B. W., Parker D. B., Walborg, E. F., Stevenson, D. E., Xu, Y. & Klaunig, J. E. Effect of transport stress on respiratory disease, serum antioxidant status, and serum concentrations of lipid peroxidation biomarkers in beef cattle. *Am. J. Vet. Res.* 65, 860-864 (2004).
119. Cappiello, M., Lazzarotti, A., Buono, F., Scaloni, A., D'Ambrosio, C., Amodeo, P., Méndez, B. L., Pelosi, P. & Del Corso, A. New role for leucyl aminopeptidase in glutathione turnover. *Biochem. J.* 378, 35-44 (2004).
120. Kaur, H., Kumar, C., Junot, C., Tolendano, M. B. & Bachhawat, A. K. Duglp is a Cys-Gly peptidase of the γ -glutamyl cycle of *Saccharomyces cerevisiae* and represents a novel family of Cys-Gly peptidases. *J. Biol. Chem.* 284, 14493-14502 (2009).
121. Palmieri, F. The mitochondrial transporter family SLC25: Identification, properties and physiopathology. *Mol. Aspects Med.* 34, 465-484 (2013).
122. Frank, M. G., Watkins, L. R. & Maier, S. F. Stress-induced glucocorticoids as a neuroendocrine alarm signal of danger. *Brain. Behav. Immun.* 33, 1-6 (2013).
123. Lissner, M. M., Thomas, B. J., Wee, K., Tong, A. J., Kollmann, T. R. & Smale, S. T. Age-Related Gene Expression Differences in Monocytes from Human Neonates, Young Adults, and Older Adults. *PLoS One* 10, 1-18 (2015).
124. Zelnickova, P., Leva, L., Stepanova, H., Kovaru, F. & Faldyna, M. Age-dependent changes of proinflammatory cytokine production by porcine peripheral blood phagocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 124, 367-378 (2008).
125. Adeola, O., Ball, R. O., House, J. D. & O'Brien, P. J. Regional brain neurotransmitter concentrations in stress-susceptible pigs. *J. Anim. Sci.* 71, 968-974 (1993).
126. Belujon, P. & Grace, A. A. Hippocampus, amygdala, and stress: Interacting systems that affect susceptibility to addiction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1216, 114-121 (2011).
127. Poletto, R., Cheng, H. W., Meisel, R. L., Richert, B. T. & Marchant-Forde, J. N. Gene expression of serotonin and dopamine receptors and monoamine oxidase-A in the brain of dominant and subordinate pubertal domestic pigs (*Sus scrofa*) fed a β -adrenoreceptor agonist. *Brain Res.* 1381, 11-20 (2011).
128. Poletto, R., Meisel, R. L., Richert, B. T., Cheng, H.-W. & Marchant-Forde, J. N. Aggression in replacement grower and finisher gilts fed a short-term high-tryptophan diet and the effect of long-term human-animal interaction. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 122, 98-110 (2010).
129. Masís-Calvo, M., Sequeira-Cordero, A., Mora-Gallegos, A. & Fornaguera-Trías, J. Behavioral and neurochemical characterization of maternal care effects on juvenile Sprague-Dawley rats. *Physiol. Behav.* 118, 212-217 (2013).
130. Brenes, J. C., Rodríguez, O. & Fornaguera, J. Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 89, 85-93 (2008).

131. Kirby, L. G., Allen, A. R. & Lucki, I. Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Res.* 682, 189-196 (1995).
132. Rueter, L. E. & Jacobs, B. L. A microdialysis examination of serotonin release in the rat forebrain induced by behavioral/environmental manipulations. *Brain Res.* 739, 57-69 (1996).
133. Carreras, R., Arroyo, L., Mainau E., Valent, D., Bassols, A., Dalmau, A., Faucitano, L., Manteca, X. & Velarde, A. Can the way pigs are handled alter behavioural and physiological measures of affective state? *Behav. Processes* 142, 91-98 (2017).
134. Krishna, S., Keralapurath, M. M., Lin, Z., Wagner J. J., de la Serre, C. B., Harn, D. A. & Filipov, N. M. Neurochemical and electrophysiological deficits in the ventral hippocampus and selective behavioral alterations caused by high-fat diet in female C57BL/6 mice. *Neuroscience* 297, 170-181 (2015).
135. Stricker-Krongrad, A., Cumin, F., Bulet, C. & Beck, B. Hypothalamic neuropeptide Y and plasma leptin after long-term high-fat feeding in the rat. *Neurosci. Lett.* 254, 157-160 (1998).
136. Wang, H., Storlien, L. H. & Huang, X. F. Effects of dietary fat types on body fatness, leptin, and ARC leptin receptor, NPY, and AgRP mRNA expression. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282, 1352-1359 (2002).
137. Dziedzic, B., Szemraj, J., Bartkowiak, J. & Walczewska, A. Various dietary fats differentially change the gene expression of neuropeptides involved in body weight regulation in rats. *J. Neuroendocrinol.* 19, 364-373 (2007).
138. Gumbs, M. C. R., van den Heuvel, J. K. & la Fleur, S. E. The effect of obesogenic diets on brain Neuropeptide Y. *Physiol. Behav.* 162, 161-173 (2016).
139. Morris, M. J., Chen, H., Watts, R., Shulkes, A. & Cameron-Smith, D. Brain neuropeptide Y and CCK and peripheral adipokine receptors: Temporal response in obesity induced by palatable diet. *Int. J. Obes.* 32, 249-258 (2008).
140. Nobunaga, M., Obukuro, K., Kurauchi, Y., Hisatune, A., Seki, T., Tsutsui, M. & Katsuki, H. High fat diet induces specific pathological changes in hypothalamic orexin neurons in mice. *Neurochem. Int.* 78, 61-66 (2014).
141. Park, E. S., Yi, S. J., Kim, J. S., Lee, H. S., Lee, I. S., Seong, J. K., Jin, H. K. & Yoon, Y. S. Changes in orexin-A and neuropeptide Y expression in the hypothalamus of the fasted and high-fat diet fed rats. *J. Vet. Sci.* 5, 295-302 (2004).
142. Ziotopoulou, M., Mantzoros, C. S., Hileman, S. M. & Flier, J. S. Differential expression of hypothalamic neuropeptides in the early phase of diet-induced obesity in mice. *Am. J. Physiol. Metab.* 279, 838-845 (2000).
143. Crespo, C. S., Cachero, A. P., Jiménez, L. P., Barrios, V. & Ferreiro, E. A. Peptides and food intake. *Front. Endocrinol.* 5, 1-13 (2014).
144. Fanselow, M. & Dong, H.-W. Are the Dorsal and Ventral Hippocampus functionally distinct structures. *Neuron* 65, 1-25 (2010).
145. Palmiter, R. D. Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior? *Trends Neurosci.* 30, 375-381 (2007).

Referencias

146. Hommel, J. D., Trinko, R., Sears, R. M., Georgescu, D., Liu, Z. W., Gao, X. B., Thurmon, J. J., Marinelli, M. & DiLeone, R. J. Leptin Receptor Signaling in Midbrain Dopamine Neurons Regulates Feeding. *Neuron* 51, 801-810 (2006).
147. Haleem, D. J., Haque, Z., Inam, Q. A., Ikram, H. & Haleem, M. A. Behavioral, hormonal and central serotonin modulating effects of injected leptin. *Peptides* 74, 1-8 (2015).
148. Bienenstock, J., Kunze, W. & Forsythe, P. Microbiota and the gut-brain axis. *Nutr. Rev.* 73, 28-31 (2015).
149. Mayer, E. A., Tillisch, K. & Gupta, A. Gut / brain axis and the microbiota. *J. Clin. Invest.* 125, 926-938 (2015).
150. Galland, L. The Gut Microbiome and the Brain. *J. Med. Food* 17, 1261-1272 (2014).
151. Liu, Y. W., Liu, W. H., Wu, C. C., Juan, Y. C., Wu, Y. C., Tsai, H. P., Wang, S. & Tsai, Y. C. Psychotropic effects of *Lactobacillus plantarum* PS128 in early life-stressed and naïve adult mice. *Brain Res.* 1631, 1-12 (2016).
152. Savignac, H. M., Couch, Y., Stratford, M., Bannerman, D. M., Tzortzis, G., Anthony, D. C. & Burnet, P. W. Prebiotic administration normalizes lipopolysaccharide (LPS)-induced anxiety and cortical 5-HT_{2A} receptor and IL1- β levels in male mice. *Brain. Behav. Immun.* 52, 120-131 (2016).
153. Kang, J. X. & Gleason, E. D. Omega-3 Fatty acids and hippocampal neurogenesis in depression. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 12, 460-465 (2013).
154. Haast, R. A. & Kiliaan, A. J. Impact of fatty acids on brain circulation, structure and function. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 92, 3-14 (2015).
155. Attig, L., Djiane, J., Gertler, A., Rampin, O., Larcher, T., Boukthir, S., Anton, P. M., Madec, J. Y., Gourdou, I. & Abdennebi-Najar, L. Study of hypothalamic leptin receptor expression in low-birth-weight piglets and effects of leptin supplementation on neonatal growth and development. *AJP Endocrinol. Metab.* 295, 1117-1125 (2008).
156. Reynolds, C. M., Segovia, S. A. & Vickers, M. H. Experimental models of maternal obesity and neuroendocrine programming of metabolic disorders in offspring. *Front. Endocrinol.* 8, 1-11 (2017).
157. Brunetti, L., Michelotto, B., Orlando, G. & Vacca, M. Leptin inhibits norepinephrine and dopamine release from rat hypothalamic neuronal endings. *Eur. J. Pharmacol.* 372, 237-240 (1999).
158. Ramos-Lobo, A. M., Furigo, I., Teixeira, P., Zamperi, T. T., Wasinski, F., Buonfiglio, D. & Donato, J. Maternal metabolic adaptations are necessary for normal offspring growth and brain development. *Physiol. Rep.* 6, 1-15 (2018).
159. Lecoutre, S., Oger, F., Pourpe, C., Butruille, L., Marousez, L., Dickes-Coopman, A., Laborie, C., Guinez, C., Lesage, J., Vieau, D., Junien, C., Eberlé, D., Garbory, A., Eeckhoute, J. & Breton, C. Maternal obesity programs increased leptin gene expression in rat male offspring via epigenetic modifications in a depot-specific manner. *Mol. Metab.* 6, 922-930 (2017).
160. Fruhwürth, S., Vogel, H., Schürmann, A. & Williams, K. J. Novel insights into how overnutrition disrupts the hypothalamic actions of leptin. *Front. Endocrinol.* 9, 1-6 (2018).

161. Santoro, A., Mattace Raso, G. & Meli, R. Drug targeting of leptin resistance. *Life Sci.* 140, 64-74 (2015).
162. Volkow, N. D., Wang, G. J. & Baler, R. D. Reward, dopamine and the control of food intake: Implications for obesity. *Trends Cogn. Sci.* 15, 37-46 (2011).
163. Han, W., Tellez, L. A., Niu, J., Medina, S., Ferreira, T. L., Zhang, X., Su, J., Tong, J., Schwartz, G. J., Van Der Pol, A. & De Araujo, I. E. Striatal Dopamine Links Gastrointestinal Rerouting to Altered Sweet Appetite. *Cell Metab.* 23, 103-112 (2016).
164. Łabuzek, K., Suchy, D., Gabryel, B., Bielecka, A., Liber, S. & Okopień, B. Quantification of metformin by the HPLC method in brain regions, cerebrospinal fluid and plasma of rats treated with lipopolysaccharide. *Pharmacol. Reports* 62, 956-965 (2010).
165. Jeon, S. M. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. *Exp. Mol. Med.* 48, 245-258 (2016).
166. Nakano, M. & Inui, A. Metformin and incretin-based therapies up-regulate central and peripheral Adenosine monophosphate-activated protein affecting appetite and metabolism. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 16, 529-531 (2012).
167. Kim, H.J., Park, E. Y., Oh, M. J., Park, S. S., Shin, K. H., Choi, S. H., Chun, B. G. & Kim, D. H. Central administration of metformin into the third ventricle of C57BL/6 mice decreases meal size and number and activates hypothalamic S6 kinase. *AJP Regul. Integr. Comp. Physiol.* 305, 499-505 (2013).
168. Lv, W. S., Wen, J. P., Li, L., Sun, R. X., Wang, J., Xian, Y. X., Cao, C. X., Wang, Y. L. & Gao, Y. Y. The effect of metformin on food intake and its potential role in hypothalamic regulation in obese diabetic rats. *Brain Res.* 1444, 11-19 (2012).
169. Viollet, B., Guigas, B., Garcia, N. S., Leclerc, J., Foretz, M. & Andreelli, F. Cellular and molecular mechanisms of metformin: an overview. *Clin. Sci.* 122, 253-270 (2012).
170. Duan, Y., Zhang, R., Zhang, M., Sun, L. J., Dong, S. Z., Wang, G., Zhang, J. & Zhao, Z. Metformin inhibits food intake and neuropeptide Y gene expression in the hypothalamus. *Neural Regen. Res.* 8, 2379-2388 (2013).
171. Lee, A. & Morley, J. E. Metformin decreases food consumption and induces weight loss in subjects with obesity with type II non-insulin-dependent diabetes. *Obes. Res.* 6, 47-53 (1998).
172. Larsson, O., Morita, M., Topisirovic, I., Alain, T., Blouin, M. J., Pollak, M. & Sonenberg, N. Distinct perturbation of the transcriptome by the antidiabetic drug metformin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 8977-8982 (2012).
173. Muntzel, M. S., Abe, A. & Petersen, J. S. Effects of adrenergic, cholinergic and ganglionic blockade on acute depressor responses to metformin in spontaneously hypertensive rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281, 618-623 (1997).
174. Petersen, J. S., Liu, W., Kapusta, D. R. & Varner, K. J. Metformin inhibits ganglionic neurotransmission in renal nerves. *Hypertension* 29, 1173-1177 (1997).
175. Petersen, J. S. & DiBona, G. F. Effects of central metformin administration on responses to air-jet stress and on arterial baroreflex function in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.* 15, 285-291 (1997).

Referencias

176. Bauer, R., Walter, B., Brust, P., Füchtner, F. & Zwiener, U. Impact of asymmetric intrauterine growth restriction on organ function in newborn piglets. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 110, 40-49 (2003).
177. Hernández-Andrade, E., Cortés-Camberos, A. J., Díaz, N. F., Flores-Herrera, H., García-López, G., González-Jiménez, M., Santamaría, A. & Molina-Hernández, A. Altered levels of brain neurotransmitter from newborn rabbits with intrauterine restriction. *Neurosci. Lett.* 584, 60-65 (2015).
178. Bauer, R., Walter, B., Vorwieger, G., Bergmann, R., Fuchtnner, F. & Zwiener, U. Intrauterine growth restriction induces up-regulation of cerebral aromatic amino acid decarboxylase activity in newborn piglets: [18F]fluorodopa positron emission tomography study. *Pediatr. Res.* 49, 474-480 (2001).
179. Ernst, M., Zametkin, A. J., Matochik, J. A., Pascualvaca, D., Jons, P. H. & Cohen, R. M. High midbrain [18F]DOPA accumulation in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Psychiatry* 156, 1209-1215 (1999).
180. Schultz, W. Multiple Dopamine Functions at Different Time Courses. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 259-288 (2007).
181. Schultz, W. The Reward Signal of Midbrain Dopamine Neurons. *News Physiol. Sci.* 14, 249-255 (1999).
182. Morishima, M., Harada, N., Hara, S., Sano, A., Seno, H., Takahashi, A., Morita, Y. & Nakaya, Y. Monoamine oxidase A activity and norepinephrine level in hippocampus determine hyperwheel running in SPORTS rats. *Neuropsychopharmacology* 31, 2627-2638 (2006).
183. Burton, G. J. & Jauniaux, E. Oxidative stress. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 25, 287-299 (2011).
184. Biri, A., Bozkurt, N., Turp, A., Kavutcu, M., Himmetoglu, Ö. & Durak, I. Role of oxidative stress in intrauterine growth restriction. *Gynecol. Obstet. Invest.* 64, 187-192 (2007).
185. Ahmad, A., Rasheed, N., Banu, N. & Palit, G. Alterations in monoamine levels and oxidative systems in frontal cortex, striatum, and hippocampus of the rat brain during chronic unpredictable stress. *Stress* 13, 355-364 (2010).
186. Kita, T., Asanuma, M., Miyazaki, I. & Takeshima, M. Protective Effects of Phytochemical Antioxidants Against Neurotoxin-Induced Degeneration of Dopaminergic Neurons. *J. Pharmacol. Sci.* 124, 313-319 (2014).
187. Miyazaki, I. & Asanuma, M. Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. *Acta Med. Okayama* 62, 141-150 (2008).
188. Manjarrez, G. G., Magdaleno, V. M., Chagoya, G. & Hernández, R. J. Nutritional recovery does not reverse the activation of brain serotonin synthesis in the ontogenetically malnourished rat. *Int. J. Dev. Neurosci.* 14, 641-648 (1996).
189. Manole, M. D., Tehranian-DePasquale, R., Du, L., Bayir, H., Kochanek, P. M. & Clark, R. S. Unmasking Sex-Based Disparity in Neuronal Metabolism. *Curr. Pharm. Des.* 17, 3854-3860 (2011).
190. Ji, Y., Wu, Z., Dai, Z., Wang, X., Li, J., Wang, B. & Wu, G. Fetal and neonatal programming of postnatal growth and feed efficiency in swine. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 8, 1-15 (2017).
191. Aiken, C. E. & Ozanne, S. E. Sex differences in developmental programming models. *Reproduction* 145, 1-13 (2013).

192. Du, L., Hickley, R. W., Bayir, H., Watkins, S. C., Tyurin, V. A., Guo, F., Kochanek, P. M., Jenkins, L. W., Ren, J., Gibson, G., Chu, C. T., Valerian, E. & Clark, R. S. Starving neurons show sex difference in autophagy. *J. Biol. Chem.* 284, 2383-2396 (2009).
193. Shah, K., McCormack, C. E. & Bradbury, N. A. Do you know the sex of your cells? *AJP Cell Physiol.* 306, 3-18 (2014).
194. Gurniak, C. B., Perlas, E. & Witke, W. The actin depolymerizing factor n-cofilin is essential for neural tube morphogenesis and neural crest cell migration. *Dev. Biol.* 278, 231-241 (2005).
195. Inagaki, N., Chihara, K., Arimura, N., Kawano, Y., Matsuo N., Nishimura, T., Amano, M. & Kaibuchi, K. CRMP-2 induces axons in hippocampal neurons. *Dev. Dyn.* 216, 781-782 (1999).
196. Cole, A. R., Knebel, A., Morrice, N. A., Robertson, L. A., Irving, A. J., Connolly, C. N. & Sutherland, C. GSK-3 phosphorylation of the Alzheimer epitope within collapsin response mediator proteins regulates axon elongation in primary neurons. *J. Biol. Chem.* 279, 50176-50180 (2004).
197. Gauthier-Campbell, C., Bredt, D. S., Murphy, T. H. & El-Husseini, A. E. Regulation of dendritic branching and filopodia formation in hippocampal neurons by specific acylated protein motifs. *Mol. Biol. Cell* 15, 2205-2217 (2004).
198. Watabe-Uchida, M., John, K. A., Janas, J. A., Newey, S. E. & Van Aelst, L. The Rac Activator DOCK7 Regulates Neuronal Polarity through Local Phosphorylation of Stathmin/Op18. *Neuron* 51, 727-739 (2006).
199. Meloni, G. & Vařák, M. Redox activity of α -synuclein-Cu is silenced by Zn 7-metallothionein-3. *Free Radic. Biol. Med.* 50, 1471-1479 (2011).
200. Da Costa, C. A., Ancolio, K. & Checler, F. Wild-type but not Parkinson's disease-related Ala-53 \rightarrow Thr mutant α -Synuclein protects neuronal cells from apoptotic stimuli. *J. Biol. Chem.* 275, 24065-24069 (2000).
201. Cvetanovic, M., Rooney, R. J., Garcia, J. J., Toporovskaya, N., Zoghbi, H. Y. & Opal, P. The role of LANP and ataxin 1 in E4F-mediated transcriptional repression. *EMBO Rep.* 8, 671-677 (2007).
202. Schaffler, K., Schulz, K., Hirmer, A., Wiesner, J., Grimm, M., Sickmann, A. & Fischer, U. A stimulatory role for the La-related protein 4B in translation. *Rna* 16, 1488-1499 (2010).
203. Lee, A. S., Kranzusch, P. J., Doudna, J. A. & Cate, J. H. EIF3d is an mRNA cap-binding protein that is required for specialized translation initiation. *Nature* 536, 96-99 (2016).
204. Masutani, M., Sonenberg, N., Yokoyama, S. & Imataka, H. Reconstitution reveals the functional core of mammalian eIF3. *EMBO J.* 26, 3373-3383 (2007).
205. Venkatesh, S. & Workman, J. L. Histone exchange, chromatin structure and the regulation of transcription. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 16, 178-189 (2015).
206. Castellanos, M., Van Eendenburg, C. Van, Gubern, C. & Sanchez, J. M. Ethyl-bridged hybrid column as an efficient alternative for HPLC analysis of plasma amino acids by pre-column derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1029-1030, 137-144 (2016).

Referencias

207. Díaz, J., Lliberia, J. L., Comellas, L. & Broto-Puig, F. Amino acid and amino sugar determination by derivatization with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate followed by high-performance liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 719, 171-179 (1996).

Apéndices

"Cuán terrible es lo que los científicos guardan en su portafolio". **Nikita
Khrushchov**

Apéndice 1: Optimización a posteriori de la determinación de aminoácidos libres en plasma por HPLC

1. Optimización de la fase móvil y del gradiente de elución:

La realización de cambios en el protocolo de separación de aminoácidos original, para conseguir el mejor perfil de elución de los 20 aminoácidos proteínogénicos más el GABA, estaba limitada por el uso de la fase móvil comercial (AccQ-Tag Eluent A Concentrate, Waters, MA, USA) (Figura 44) que, al desconocer su composición, imposibilitaba cualquier tipo de modificación.

Así pues, se procedió a emular la fase móvil comercial mediante la utilización de fases móviles descritas en la literatura para la separación de aminoácidos con AQC. Se diseñó la fase móvil no comercial basándose en los artículos de Castellanos et al. (2016)²⁰⁶ y Díaz et al. (1996)²⁰⁷. Cada autor usaba una fase móvil con composiciones distintas, al probarlas se observó que una combinación de los componentes de ambas daba el mismo resultado en el perfil de elución de los aminoácidos que la fase móvil comercial. La composición final de la fase móvil fue 140 mM de acetato de sodio trihidratado, 17 mM trietilamina (TEA), 1 mg/L EDTA y corrigiendo el pH con ácido ortofosfórico (85 %) hasta 5,05. A pesar de conseguir emular la fase móvil comercial el perfil de elución seguía siendo el mismo, por lo que había coelución de los aminoácidos Ser/Asn y His/Gln.

Con el objetivo de conseguir separar estos aminoácidos se procedió a modificar las concentraciones de los componentes de la fase móvil, el pH, el método de gradiente original (Tabla 5) y la temperatura de la columna. Finalmente, la mejor separación se consiguió con una fase móvil de 140 mM de acetato de sodio trihidratado, 12 mM TEA, 1 mg/L EDTA y corrigiendo el pH con ácido ortofosfórico (85 %) hasta 5,03, el método de gradiente de la Tabla 27 y a una temperatura de columna de 37°C. Con esta fase móvil optimizada finalmente se consiguió separar los aminoácidos Gln y His que coelúan usando la fase móvil comercial.

Tabla 27: Método del gradiente optimizado entre fases móviles para la separación cromatográfica de los aminoácidos.

Tiempo (min)	Fase Móvil (%)	ACN 60 % (%)
0	100	0
0,5	98	2
16	94	6
30	92	8
40	68	32
48	30	70
50	0	100
65	0	100
66	100	0
81	100	0

Sin embargo, no se consiguió separar los aminoácidos Ser/Asn pero la fase móvil optimizada permitió también la determinación de los aminoácidos no proteínogénicos citrulina y ornitina (Figura 45).

2. Optimización de la preparación de la muestra:

Usando el método de preparación de la muestra original, descrito en el apartado 4.4.2 de Material y Métodos, se observaron problemas en la estabilidad del pico de la Cys apareciendo desdoblamiento y cambios de intensidad con el tiempo. Para evitar estos problemas se aumentó la concentración de DTT (por lo tanto, la capacidad reductora del medio) que se añade a las mezclas de estándares y a las muestras. Así pues, se probaron distintas concentraciones de DTT y se analizó la estabilidad del pico de Cys a lo largo del tiempo, concluyendo que añadir 10 μ L de DTT 100 mM (concentración final de 9 mM) estabilizaba el pico de Cys sin producir cambios en el resto del cromatograma.

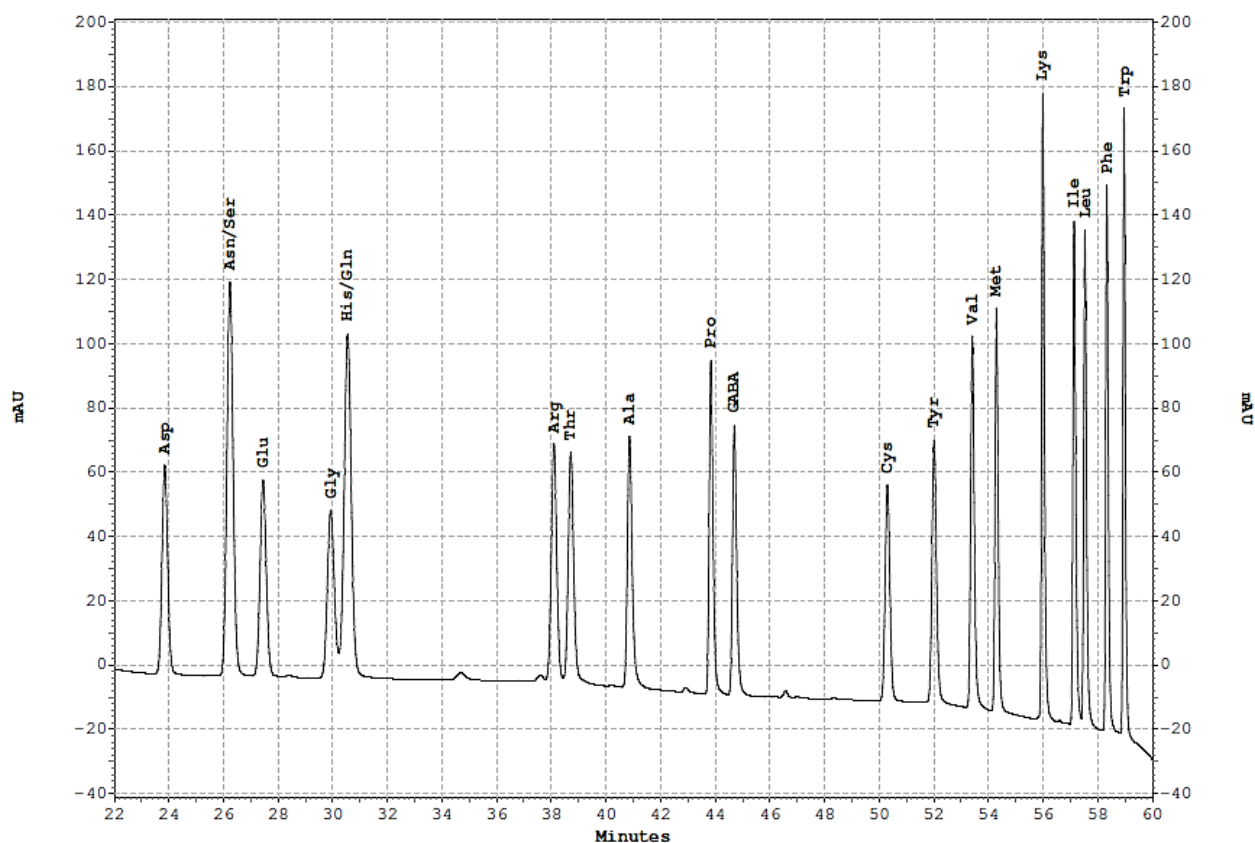


Figura 44: Cromatograma de HPLC de la elución de aminoácidos usando la fase móvil comercial de Waters. El perfil corresponde a la a la inyección de 10 μ L de mezcla de estándares de cada aminoácido a una concentración de 500 μ M.

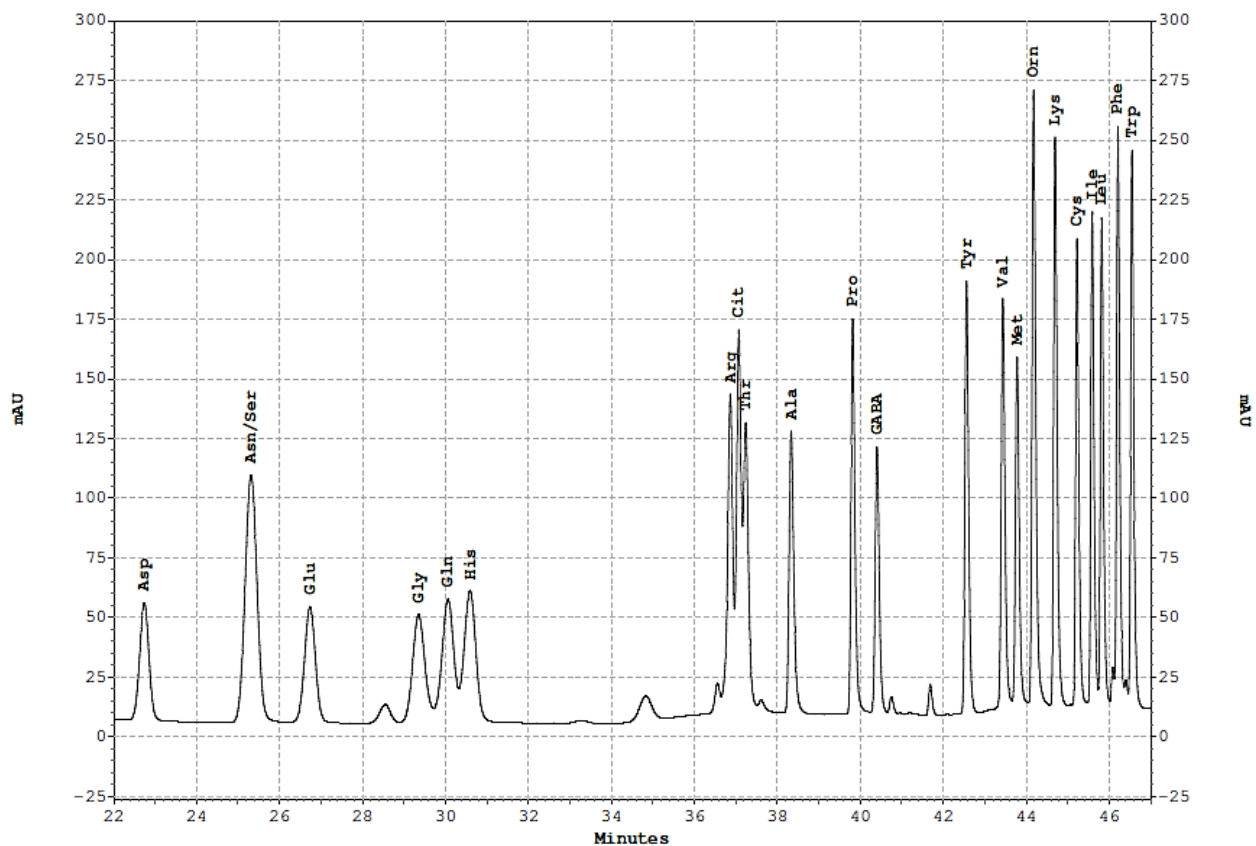


Figura 45: Cromatograma de HPLC de la elución de aminoácidos usando la fase móvil optimizada. El perfil corresponde a la inyección de 10 μ L de mezcla de estándares de cada aminoácido a una concentración de 500 μ M.

Apéndice 2: Proteínas diferenciales identificadas en PBMCs mediante DIGE-MS

Tabla 28: Identificación por espectrometría de masas de los *spots* diferenciales analizados en el DIGE del capítulo 1 usando la base de datos UniProt de *Sus scrofa*.

Spot	Protein name Pig	UniProt Pig	Theor. pI Pig	Theor. MW Pig	Score Pig	# Peptides Pig	% Coverage Pig	Spectral counts	SpC/Mw
183	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa GN=ITGA2B PE=3 SV=2	F1RQY8_PIG	5,8	113,4	2572,4	25	25,5	91	0,8
187	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa GN=ITGA2B PE=3 SV=2	F1RQY8_PIG	5,8	113,4	3206,7	28	28,9	131	1,15
265	Filamin-A (Fragment) OS=Sus scrofa GN=FLNA PE=1 SV=1	Q2YHQ3_PIG	9,9	17,7	1397,6	12	65,9		
267	Filamin-A (Fragment) OS=Sus scrofa GN=FLNA PE=1 SV=1	Q2YHQ3_PIG	9,9	17,7	575	11	65,3	35	1,98
353	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa GN=KHSRP PE=4 SV=2	F1SBT6_PIG	8,4	77,5	2634,5	42	49,7	121	1,56
371	Serotransferrin OS=Sus scrofa GN=TF PE=1 SV=2	TRFE_PIG	7,1	76,9	1711	51	63,8		
408	Coronin (Fragment) OS=Sus scrofa GN=CORO1C PE=3 SV=2	F1RGA9_PIG	6,5	58,9	4015,1	45	45,1		
511	Fibrinogen beta chain OS=Sus scrofa GN=FGB PE=4 SV=2	F1RX37_PIG	8,1	56,4	6685,8	58	76,8	312	5,53
528	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa GN=GMPS PE=4 SV=1	I3LJ73_PIG	6,4	46,5	493,5	17	25,5	25	0,54
	Fibrinogen alpha chain OS=Sus scrofa GN=FGA PE=4 SV=2	F1RX36_PIG	8,4	32,1	274,2	20	50,4	21	0,65
555	Coronin OS=Sus scrofa GN=corola PE=3 SV=1	G8G223_PIG	6	51,1	2520,4	34	35,1	138	2,7
556	Fibrinogen beta chain OS=Sus scrofa GN=FGB PE=4 SV=2	F1RX37_PIG	8,1	56,4	1819,9	38	57,6		
561	tRNA-splicing ligase RtcB homolog OS=Sus scrofa GN=RTCB PE=2 SV=1	RTCB_PIG	6,9	55,2	615,9	21	36,6		
594	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa GN=LOC100627689 PE=4 SV=1	I3LD43_PIG	6,5	25,5	575,9	10	43,4	32	1,25
	Chaperonin containing TCPL1, subunit 2 (Beta) OS=Sus scrofa GN=CCT2 PE=2 SV=1	DOG0C8_PIG	6,1	57,4	441,7	14	25,2	18	0,31
	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa GN=CORO1A PE=4 SV=1	I3LR17_PIG	8,8	43,4	356,4	12	27,4	14	0,32
604	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa GN=LOC100627396 PE=4 SV=2	F1RX35_PIG	6	49,6	3556,3	34	58,4		
613	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa GN=ILK PE=4 SV=1	I3L9C8_PIG	8,3	51,4	1853,9	38	49,8		
620	Testin OS=Sus scrofa GN=TES PE=3 SV=1	TES_PIG	9,1	47,9	2004,9	43	59,6		
705	Pleckstrin OS=Sus scrofa GN=PLEK PE=2 SV=2	F1SJ07_PIG	8,3	40	974,7	24	34,3	42	1,05
	Small calcium-binding mitochondrial carrier 1 OS=Sus scrofa GN=SCAMC-1 PE=2 SV=1	B2MUB6_PIG	8,6	53,2	801,3	32	52,6	49	0,92
725	Pleckstrin OS=Sus scrofa GN=PLEK PE=2 SV=2	F1SJ07_PIG	8,3	40	903,1	24	43,7	45	1,12
	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa GN=ACTR1A PE=3 SV=1	F2Z5G5_PIG	6,2	42,6	557,4	24	56,9	37	0,87
800	Elongation factor 1-alpha OS=Sus scrofa GN=EEF1A PE=2 SV=1	Q0PY11_PIG	9,7	50,1	1308	16	28,4		

861	Annexin OS=Sus scrofa GN=ANXA1 PE=2 SV=2 Leukocyte elastase inhibitor OS=Sus scrofa GN=SERPINB1 PE=1 SV=1	F1SJB5_PIG ILEU_PIG	6,4 6	38,7 42,5	1250,3 842,5	23 19	59,8 41,5	54 45	1,39 1,06
879	PDZ and LIM domain protein 1 OS=Sus scrofa GN=PDLIM1 PE=2 SV=1	T1RTP3_PIG	6,8	36	2800,1	18	44,7		
883	Annexin OS=Sus scrofa GN=ANXA1 PE=2 SV=2	F1SJB5_PIG	6,4	38,7	16819,7	66	89		
893	PDZ and LIM domain protein 1 OS=Sus scrofa GN=PDLIM1 PE=2 SV=1	T1RTP3_PIG	6,8	36	4728,9	28	59,6		
935	Monoglyceride lipase OS=Sus scrofa GN=MGLL PE=2 SV=1 Calponin-2 (Fragment) OS=Sus scrofa GN=CNN2 PE=2 SV=1	B8XSJ9_PIG CNN2_PIG	6,9 9,4	33,3 32	523,6 437	16 18	44,9 46,3	23 19	0,69 0,59
951	Malate dehydrogenase, cytoplasmic OS=Sus scrofa GN=MDH1 PE=1 SV=4	MDHC_PIG	6,2	36,4	1128	28	47,6		
961	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 OS=Sus scrofa GN=HNRNPA2B1 PE=2 SV=1 Calponin-2 (Fragment) OS=Sus scrofa GN=CNN2 PE=2 SV=1	M3UZ37_PIG CNN2_PIG	9,1 9,4	36 32	352,1 240,8	13 7	30,5 20,3	17 8	0,47 0,25
968	Tropomyosin alpha-1 chain OS=Sus scrofa GN=TPM1 PE=1 SV=2 Uncharacterized protein OS=Sus scrofa GN=HNRNPK PE=4 SV=1	TPM1_PIG I3LQS0_PIG	4,6 5,4	32,7 49,2	146,6 140,4	8 5	23,9 11	9 6	0,27 0,12
987	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa GN=EFHD2 PE=4 SV=1	F1SUW3_PIG	5,1	26,6	1250,9	21	55,6		
1027	Proteasome subunit alpha type OS=Sus scrofa GN=PSMA4 PE=3 SV=1	F2Z528_PIG	8,7	29,5	267,6	13	41,8	16	0,54
1046	High mobility group protein B1 OS=Sus scrofa GN=HMGB1 PE=4 SV=1	F2Z594_PIG	5,5	24,9	292,6	10	40,9		
1052	Proteasome activator complex subunit 1 OS=Sus scrofa GN=PSME1 PE=2 SV=1	PSME1_PIG	5,7	28,6	1326,3	23	75,9		
1117	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 OS=Sus scrofa GN=HNRNPA2B1 PE=2 SV=1	M3UZ37_PIG	9,1	36	289,2	8	17,9	17	0,47
1152	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 OS=Sus scrofa GN=HNRNPA2B1 PE=2 SV=1	M3UZ37_PIG	9,1	36	203,8	8	18,8		
1201	Myosin regulatory light polypeptide 9 OS=Sus scrofa GN=MYL9 PE=1 SV=2	MYL9_PIG	4,6	19,8	176,9	8	34,9		
1202	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa GN=MYL12B PE=4 SV=2	F1SM78_PIG	4,5	19,8	195,2	5	29,7		
1240	Calcium-binding protein A9 OS=Sus scrofa GN=S100A9 PE=2 SV=1	C3S7K6_PIG	6,4	15,9	112	8	31,9	12	0,75
1275	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa GN=UBE2I PE=3 SV=1 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A OS=Sus scrofa GN=PPIA PE=1 SV=2	I3LSZ1_PIG PPIA_PIG	9,7 9,4	18 17,9	90,8 76,7	4 3	25,9 12,8	5 4	0,28 0,22
1281	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Sus scrofa GN=RHEB PE=4 SV=2	F2Z5R2_PIG	5,1	20,4	126,4	3	17,9		
1302	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa GN=PRDX5 PE=4 SV=2	F1RQP0_PIG	6,1	17,3	523,3	12	53,1		
1347	Histone H2B OS=Sus scrofa GN=HIST1H2BF PE=3 SV=1	F2Z580_PIG	10,8	13,9	478,9	13	81,7		
1351	Histone H2B OS=Sus scrofa GN=HIST1H2BF PE=3 SV=1	F2Z580_PIG	10,8	13,9	251,2	11	65,1		

Apéndices

1386	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa GN=HINT1 PE=4 SV=1	F1RKI3_PIG	6,4	13,7	109	4	19	5	0,36
1399	Filamin-A (Fragment) OS=Sus scrofa GN=FLNA PE=1 SV=1	Q2YHQ3_PIG	9,9	17,7	365,7	9	61,7		
1445	Pleckstrin OS=Sus scrofa GN=PLEK PE=2 SV=2	F1SJ07_PIG	8,3	40	992,2	14	25,1		
1457	Fibrinogen beta chain OS=Sus scrofa GN=FGB PE=4 SV=2	F1RX37_PIG	8,1	56,4	1676,4	28	48,3		
1486	Aconitate hydratase, mitochondrial (Fragment) OS=Sus scrofa GN=ACO2 PE=4 SV=2	F1SRC5_PIG	7,7	84,3	2116,7	24	26,6		
1563	Hemoglobin subunit beta OS=Sus scrofa GN=HBB PE=3 SV=1	F1RII7_PIG	6,7	16,2	4775,3	13	83	172	10,61
1580	Fibrinogen beta chain OS=Sus scrofa GN=FGB PE=4 SV=2	F1RX37_PIG	8,1	56,4	1446,4	19	36,6		
1585	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa GN=LOC100627396 PE=4 SV=2	F1RX35_PIG	6	49,6	2114,7	20	37,4		
1601	Fibrinogen A-alpha-chain (Fragment) OS=Sus scrofa PE=4 SV=1	Q28936_PIG	6,6	47,3	659,2	21	36,8	59	1,25
1607	High mobility group protein B1 OS=Sus scrofa GN=HMGB1 PE=4 SV=1	F2Z594_PIG	5,5	24,9	487,6	16	47		
1611	WD repeat-containing protein 1 OS=Sus scrofa GN=WDR1 PE=2 SV=1	K9IVR7_PIG	6,2	66,1	446,6	11	17,8	14	0,21
	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa GN=FUBP1 PE=2 SV=2	F1S9S5_PIG	6,8	67,7	425,1	19	32,1	22	0,32
1612	Fibrinogen alpha chain OS=Sus scrofa GN=FGA PE=4 SV=2	F1RX36_PIG	8,4	32,1	532,9	25	60		
1621	von Willebrand factor OS=Sus scrofa GN=VWF PE=2 SV=1	F5XVC2_PIG	7,7	307,8	1445,5	15	5,3		
1623	Endoplasmin OS=Sus scrofa GN=HSP90B1 PE=2 SV=3	ENPL_PIG	4,6	92,4	1924,7	44	35,8		
1674	Histone H2B OS=Sus scrofa GN=HIST1H2BF PE=3 SV=1	F2Z580_PIG	10,8	13,9	313,4	13	67,5		
1686	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa GN=LOC100621569 PE=4 SV=1	F1SNL7_PIG	5,3	52,7	489	15	32,4	32	0,61
1693	Vinculin OS=Sus scrofa GN=VCL PE=1 SV=4	VINC_PIG	5,5	123,9	5623,5	96	59,2		
1700	Proteasome activator complex subunit 2 OS=Sus scrofa GN=PSME2 PE=4 SV=2	F1SGM3_PIG	6	28,6	2484,4	19	55,2		
1718	Coagulation factor XIII, A1 polypeptide OS=Sus scrofa GN=F13A1 PE=2 SV=1	K7GQL2_PIG	6	83,3	1186,9	34	35,2		
1729	Uncharacterized protein (Fragment) OS=Sus scrofa GN=LCP1 PE=4 SV=2	F1RK02_PIG	5,3	71,4	5906,5	42	51,3		
1732	Uncharacterized protein OS=Sus scrofa GN=CALD1 PE=4 SV=1	F1SNH3_PIG	5,9	63	1436,8	39	46,2		
1780	Hemoglobin subunit alpha OS=Sus scrofa GN=HBA PE=1 SV=1	HBA_PIG	9,6	15	1982,1	8	44,7		
1785	WD repeat-containing protein 1 OS=Sus scrofa GN=WDR1 PE=2 SV=1	K9IVR7_PIG	6,2	66,1	475,3	21	24,8	31	0,47
	Fibrinogen beta chain OS=Sus scrofa GN=FGB PE=4 SV=2	F1RX37_PIG	8,1	56,4	346,6	14	23,6	18	0,32

Artículos

"Todo trabajo lleva en sí su misteriosa recompensa". **Charles Van Lerberghe**

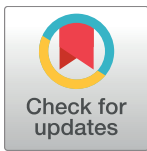
RESEARCH ARTICLE

Effects on pig immunophysiology, PBMC proteome and brain neurotransmitters caused by group mixing stress and human-animal relationship

Daniel Valent¹, Laura Arroyo¹, Raquel Peña^{1,2}, Kuai Yu¹, Ricard Carreras³, Eva Mainau⁴, Antonio Velarde³, Anna Bassols^{1,2*}

1 Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain, **2** Servei de Bioquímica Clínica Veterinària, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain, **3** IRTA, Subprograma de Benestar Animal, Monells, Spain, **4** Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain

* anna.bassols@uab.cat



OPEN ACCESS

Citation: Valent D, Arroyo L, Peña R, Yu K, Carreras R, Mainau E, et al. (2017) Effects on pig immunophysiology, PBMC proteome and brain neurotransmitters caused by group mixing stress and human-animal relationship. *PLoS ONE* 12(5): e0176928. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176928>

Editor: Andrew C. Gill, University of Edinburgh, UNITED KINGDOM

Received: December 19, 2016

Accepted: April 19, 2017

Published: May 5, 2017

Copyright: © 2017 Valent et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: AGL2011-30598-C03-01 (to AV) and grant AGL2011-30598-C03-02 (to AB) from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad, and 2014SGR4 from the Generalitat de Catalunya (to AB). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are an interesting sample for searching for biomarkers with proteomic techniques because they are easy to obtain and do not contain highly abundant, potentially masking proteins. Two groups of pigs (n = 56) were subjected to mixing under farm conditions and afterwards subjected to different management treatments: negative handling (NH) and positive handling (PH). Serum and PBMC samples were collected at the beginning of the experiment one week after mixing (t0) and after two months of different handling (t2). Brain areas were collected after slaughter and neurotransmitters quantified by HPLC. Hair cortisol and serum acute phase proteins decreased and serum glutathione peroxidase increased at t2, indicating a lower degree of stress at t2 after adaptation to the farm. Differential gel electrophoresis (DIGE) was applied to study the effects of time and treatment on the PBMC proteome. A total of 54 differentially expressed proteins were identified, which were involved in immune system modulation, cell adhesion and motility, gene expression, splicing and translation, protein degradation and folding, oxidative stress and metabolism. Thirty-seven protein spots were up-regulated at t2 versus t0 whereas 27 were down-regulated. Many of the identified proteins share the characteristic of being potentially up or down-regulated by cortisol, indicating that changes in protein abundance between t0 and t2 are, at least in part, consequence of lower stress upon adaptation to the farm conditions after group mixing. Only slight changes in brain neurotransmitters and PBMC oxidative stress markers were observed. In conclusion, the variation in hair cortisol and serum APPs as well as the careful analysis of the identified proteins indicate that changes in protein composition in PBMC throughout time is mainly due to a decrease in the stress status of the individuals, following accommodation to the farm and the new group.

Competing interests: AV is currently working in IRTA, a research institution belonging to the catalan government. Also, AV is member of the Animal Health and Welfare Panel of the European Food Safety Authority (EFSA).

Introduction

It is well known that pigs are social and under some circumstances hierarchical animals [1], hence mixing unfamiliar animals on the same pen produce a stressful situation with physiological consequences on the individuals [2±6]. Furthermore, there is considerable research interest in human-animal relationship. In pigs, as well as in other species like dairy cows and poultry, it has been shown that negative human-animal interactions can markedly alter the productivity and the welfare of animals by affecting the animal fear towards humans [7±9]. On the other side, positive interactions such as pats, slaps or talking to the animals reduce fear and human avoidance [9]. For example, the presence of a familiar human, providing gentle handling, may calm the animals in potentially aversive situations (e.g. isolation, tethering, rectal palpation, insemination) thereby reducing distress and the risk of injury to animals and humans [10]. In this work, the effect of human handling after a stressful situation associated to mixing individuals during farm adaptation in pigs is studied.

Despite its importance, information on laboratory biomarkers for the objective evaluation of stress and welfare is scarce. Stress hormones as cortisol have been used, together with other markers such as acute phase proteins (APP) [11±14], but there is a need for more and more specific markers, especially for chronic stress. For the search of new biomarkers, proteomic technologies have become very useful and, recently, these techniques have been used in many studies on farm animals [15±18] and specifically, in stress and welfare-related issues [11,19±22]. Proteomics has the great advantage to look at proteins, which are the real biological actors in the cell and the organism, whereas genomics or transcriptomics analyze genes or RNA transcripts, which can or cannot be translated. Up to now, the majority of studies looking for biomarkers have been performed in serum or plasma, but there are problems associated with the interference of highly abundant proteins in these samples [23,24]. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are an interesting alternative as a convenient biological sample to monitor processes that lead to subtle physiological changes difficult to detect in plasma samples, especially those related with the involvement of the immune system. Protein expression by PBMCs have been characterized in porcine [25,26] and this sample type has been used to gather information about a series of biological conditions in pigs, for example, pregnancy [27], influence of diet [28,29] or heat stress [30].

On the other side, the noradrenergic, dopaminergic and the serotonergic pathways in the central nervous system (CNS) are the most important and well characterized systems underlying the response to stress, fear and reward, among others. The central nervous system controls the action of endocrine glands through the release of catecholamines, indoleamines and other transmitters which can be excitatory or inhibitory mediators. Amygdala, hippocampus and prefrontal cortex (PFC) are recognized to play a role in the stress response organization. In these structures, stressors produce changes in extracellular concentrations of different neurotransmitters (NTs) leading to activation and modulation of processes to cope with stress. These areas have an indirect output to the hypothalamus, which acts modulating the final stress response through the sympathetic nervous system and the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. Therefore, the stress response involves the interaction among these areas through NTs, especially catecholamines (noradrenaline (NA), dopamine (DA)) and the indoleamine serotonin (5-HT). DA is metabolized to homovanillic acid (HVA) and 3,4-dihydroxyphenyl acetic acid (DOPAC), whereas 5-HT is metabolized to 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA)[31±34].

The main goal of the present work was to analyse changes in the PBMC proteome of the pigs throughout the stocking period in the farm after a stressful episode of animal mixing, and to ascertain whether how animals are handled can influence these changes. As a second goal,

the influence of human-animal relationship on brain neurotransmitters (noradrenergic, dopaminergic and serotonergic systems) and PBMC oxidative stress markers (superoxide dismutase (SOD), protein carbonylation) was evaluated.

Materials and methods

Experimental design

In this study, 56 female pigs ((Landrace x Large White) x Pietrain, free of the halothane gene) coming from 21 sows from the same commercial farm were used. At 9 weeks of age, pigs were transported to the experimental facilities of IRTA (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, Monells, Spain) and randomly housed in two rooms of four pens with seven pigs in each. The pens (5 x 2.7 m) had fully slatted floors with natural light conditions at a constant environmental temperature of $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Each pen was provided with one steel drinker bowl (15 x 16 cm) connected to a nipple and a concrete feeder (58 x 34 cm) with four feeding places. Pigs had water and food *ad libitum*, and pigs were provided in all pens with chains as material for manipulation. Pigs were inspected daily and no health problems were observed during the experimental period. The study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of IRTA.

Treatment and sample collection were carried out as shown in Fig 1. Pigs were mixed at week 17 of age and one week later the first samples were collected (t0). Handling treatments started three days later and a second sample was collected after two months (t2). The pigs in one of the rooms received positive handling (PH) and the pigs in the other room received negative handling (NH). During this time, one experimenter entered five days per week for approximately 30 min each day in each room between 9:00 am and 5:00 pm. The time to perform the handling treatment and the order to enter the room and the pens was randomly distributed each day. The PH treatment consisted in entering the room slowly and letting the pigs looking at the experimenter with binocular vision before entering the pens. After 1 min, the experimenter entered the first pen and walked slowly around its perimeter. Then, the experimenter stopped at one corner of the pen and adopted a steady squat posture for 5 min, touching and interacting gently with the approaching pigs. Once finished, the experimenter stood up and tried to have a contact with the remaining pigs as long as they did not escape. This procedure was carried out in each pen of the room. The positive interaction consisted in gently stroking pigs on the nose and behind the ears and, whenever possible, on the back from head to tail in a uniform manner. The NH treatment consisted in entering the room quickly and talking loudly. Inside the pen, after having walked around it and stopped at its centre, the experimenter performed one of the five types of negative interactions with all pigs of the pen. Negative interactions were hurling pressure water with a hose, hurling pressure air with an air gun, loud noise with a horn, immobilization and restraint. To prevent pigs from getting used to negative handling, five different treatments were included and the experimenter did one different negative interaction each day of the week following a random order each week.

At week 27, pigs were transported to the experimental slaughterhouse of IRTA (1.2 km trip), stunned by exposure to 90% CO₂ at atmospheric air for 3 min and exsanguinated.

Sample collection

Blood samples from all animals were collected by jugular venepuncture in 10 ml Vacutainer tubes without anticoagulant for serum (Eurotubo™, Deltalab, Rubí, Spain) and blood from 16 animals in BD Vacutainer® CPT™ tubes (containing sodium heparin anticoagulant with a FICOLL™ Hypaque™ density fluid) for PBMCs isolation.

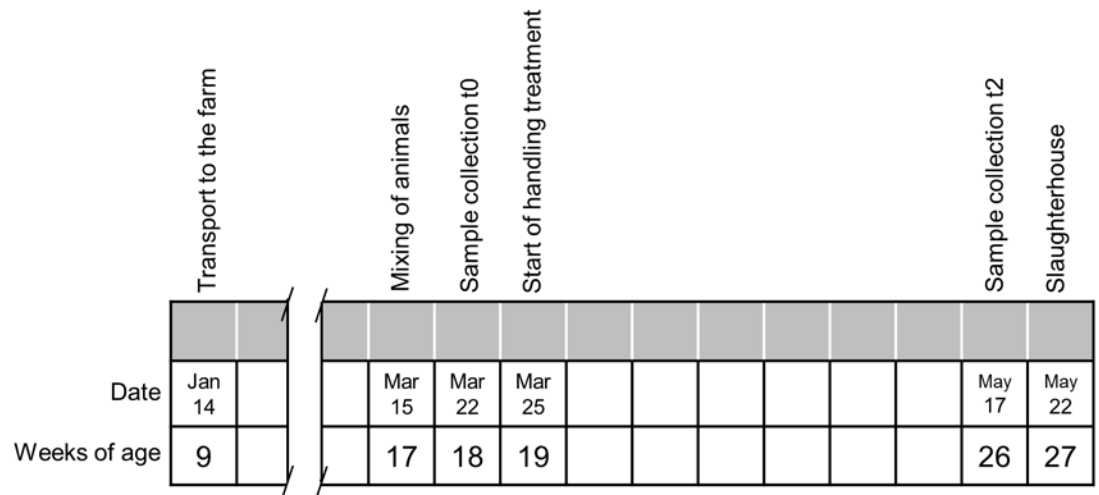


Fig 1. Experimental timeline showing dates for animal handling, treatments and sample collection.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176928.g001>

PBMCs were isolated following the manufacturer recommendations. Briefly, the tubes were centrifuged at 2000 g for 20 min at room temperature within 2 h of blood collection to avoid alterations of cell properties. The PBMC layer was collected immediately, diluted with 15 ml of PBS buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 1.5 mM KH₂PO₄ and pH 7.2±7.4) and centrifuged at 300 g for 15 min at room temperature to obtain the PBMC. Cell pellets were washed with 1 ml of distilled water for 30 s to osmotically lysate the erythrocytes presents in the pellet, and diluted with 15 ml of PBS buffer to stop the osmotic shock. Finally, tubes were centrifuged at 300 g for 15 min at room temperature and rinsed with 15 ml PBS three times to obtain a clean PBMCs pellet and kept frozen at -80°C. Serum from all animals was obtained by centrifugation at 2000 g for 10 min at room temperature. Supernatants were aliquoted and frozen at -80°C until assay.

Saliva samples were collected by allowing pigs chew a cotton swab during approximately 30 s. The saliva was stored in Salivette tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) and later centrifuged at 3000 x g for 10 min. Saliva samples were then collected and stored at -80°C until analysis. Hair was collected by shaving the lumbar area of pigs restrained in a snare.

Brains were removed immediately after slaughter and tissue samples from the selected brain structures (amygdala, hippocampus, hypothalamus and prefrontal cortex (PFC)) were excised, collected as quickly as possible in liquid nitrogen and kept frozen at -80°C until analysis.

Analytical parameters

Serum samples from all animals were analysed for haptoglobin, C-reactive protein (CRP) and Pig-MAP, and glutathione peroxidase (GPx). Haptoglobin was determined spectrophotometrically (Phase Haptoglobin, Tridelata Ltd, County Kildare, Ireland). CRP was determined with an immunoturbidimetric method (OSR #6147, Winston-Salem, NC, USA) validated for porcine samples [35]. Pig-MAP was measured by ELISA (PigChamp ProEuropa, Segovia, Spain). GPx was determined with the Cumene Hydroperoxide method (Ransel, Randox Laboratories Ltd, Crumlin, UK). Superoxide dismutase (SOD) was determined in PBMC lysates with the Xanthine oxidase method (Ransod, Randox Laboratories Ltd, Crumlin, UK). All techniques were adapted to the Olympus AU400 analyser. Cortisol concentrations were determined using

commercial ELISA kits, namely DRG Cortisol ELISA (DRG Diagnostics, Marburg, Germany) for serum samples, DRG Salivary Cortisol ELISA (DRG Diagnostics, Marburg, Germany) for salivary samples and High Sensitivity Salivary Cortisol EIA Kit (Salimetrics, State College, PA, USA) for hair samples. Protocol for hair extraction and assay validation are described in [36].

Preparation of PBMCs extracts

PBMC pellets were suspended with 500 μ l of HBSS solution (PBS buffer and 5.55 mM D-glucose) with protease inhibitors (protease inhibitors cocktail, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and sonicated twice at 30% amplitude for 10 s on ice (Branson Digital Sonifier, model 250, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT). These extracts were used for SOD assay.

For immunoblot and proteomic studies, the PBMC extracts were desalted and precipitated using 2D Clean-Up Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Protein pellets were suspended with a volume of IEF sample buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS and pH 8.5) and protein concentration was quantified using RcdC Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA). Finally, protein extracts from PBMC lysates were frozen at -80°C until DIGE analysis.

Immunoblotting

Slot blot was performed for detection of carbonyl groups contained in proteins [37]. Protein extracts from PBMC (0.5 μ g protein) were applied to each slot and transferred for 20 min onto PVDF membrane (Immuno-Blot PDVF, Bio-Rad, Hercules, CA). Proteins in the membrane were derivatized by incubating the membrane in 0.5 M 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH, Sigma, St. Louis, MO) for 5 min. After washing, the membranes were blocked with 5% skim milk in TBS-T solution (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20 and pH 7.4) and incubated overnight at 4°C with anti-DNP antibody (Anti-dinitrophenyl (DNP), Sigma (St. Louis, MO)). Membranes were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated immunoglobulin (Goat anti-rabbit IgG (H+L) HRP-linked antibody, Cell Signalling, Danvers, MA) and visualized by chemiluminescence (ECL, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Image densitometry was performed using Multi Gauge software (Fujifilm, Tokyo, Japan). A control serum sample was used in all the immunoassays in order to compare results from different membranes.

For western blot, PBMC protein extracts (9 μ g protein) were resolved in SDS-PAGE under reducing conditions (10 \pm 15% acrylamide) and immunoblotted with polyclonal antibodies against MYLC2 (Cell Signaling, Danvers, MA), fibrinogen (Sigma, St. Louis, MO) and β -actin (Santa Cruz, Santa Cruz, CA) as loading control.

Differential gel electrophoresis (DIGE) and protein identification by mass spectrometry (MS)

DIGE. A total of 16 PBMC individual samples (8 animals randomly chosen, t0 and t2 month, 4 animals each handling group) were used in this experiment, without pooling. Using pH strips, pH of protein extracts from PBMC lysates was adjusted at 8.5. Then 50 μ g of protein from protein extracts were labelled with Cy3 or Cy5 cyanine dyes (400 pmol dye/50 μ g protein) (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) for 30 min on ice in dark and reaction was quenched with 10 mM lysine for 10 min. Dye-swap was performed to avoid possible bias introduced by labelling efficiency. A pool of protein extracts from all animals and times (50 μ g total protein) was labelled with Cy2 as internal standard.

Samples were combined according to experimental design at 50 μ g protein/Cy/gel and diluted with a volume of IEF sample buffer adding 2% (w/v) DTT, 2% (v/v) ampholytes pH 3 \pm 10 and 0.002% (v/v) Bromophenol blue. IPG strips (24 cm, linear gradient pH 3 \pm 10, GE

Healthcare) were rehydrated overnight with IEF buffer and first-dimension was performed on an Ettan IPGphor system (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) for a total of 68 kV/h. The strips were equilibrated for 15 min in a reducing solution (6 M urea, 100 mM Tris-HCl pH 8, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 5 mg/mL DTT and 0.002% (w/v) bromophenol blue), and incubated in an alkylating solution (6 M urea, 100 mM Tris-HCl pH 8, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 22.5 mg/mL iodoacetamide, and 0.002% (v/v) bromophenol blue) for 15 min.

Second-dimension was performed using eight SDS-PAGE reducing gels (12.5% acrylamide, 24 x 20 cm) on an EttanDALT system (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Finally, gels were scanned on a Typhon 9400 system (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) at 488 nm/520 nm for Cy2, 532 nm/580 nm for Cy3 and 633 nm/670 nm for Cy5 excitation/emission wavelengths respectively, at a 100 μ M resolution.

Gels images were analysed and statistically quantified using Progenesis SameSpots v4.5 (NonLinear Dynamics, Newcastle, UK) software. Analysis of variance (ANOVA) was applied to matched spots and the data was filtered to retain spots with ANOVA p values of 0.05 or less.

Protein identification by mass spectrometry. A total of 64 spots were selected on the basis of an ANOVA test $P < 0.05$ and >1.5 fold volume difference and digested with trypsin [38]. Only proteins exhibiting a fold change greater than the median fold change for increased and decreased proteins were selected. Dried peptides were resuspended and analysed on an LTQ Velos-Orbitrap mass spectrometer (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany), coupled to a nano-HPLC system (Proxeon, Odense, Denmark). MS/MS fragmentation spectra (200 ms, 100 ± 2800 m/z) of 20 of the most intense ions as detected from a 500 ms MS survey scan (300 ± 1500 m/z), were acquired using a dynamic exclusion time of 20 s for precursor selection and excluding single-charged ions. Precursor scans were acquired in the Orbitrap analyser at a mass resolution of 30000. MS/MS spectra were acquired at the LTQ Velos analyser, using a relative collision energy of 35. An intensity threshold of 1000 counts was set for precursor selection.

Searches were performed using the software suite ProteinScape 3.1 (Bruker, Bremen, Germany), from mascot generic files, mgf, generated from the raw data using Proteome Discoverer 1.4 software (ThermoFisher, Bremen, Germany). MS/MS spectra were searched with a precursor mass tolerance of 10 ppm (Orbitrap measurements were performed enabling the lock mass option (m/z 445.120024) to improve mass accuracy), fragment tolerance of 0.5 Da and trypsin specificity, allowing for up to two missed cleavages. Cysteine carbamidomethylation and methionine oxidation were set as fixed and variable modifications, respectively. Searches were performed against a proteome database constructed with the pig sequenced proteins present in the UniProt database (<http://www.uniprot.org/>).

Bioinformatic analysis. Proteins names identified by mass spectrometry were introduced on PANTHER version 9.0 software (<http://pantherdb.org/>) for Gene Ontology (GO) classifications, together with UniProt databases (<http://www.uniprot.org/>). For proteins interaction network analysis, identified proteins were analysed with STRING version 10 (<http://string-db.org/>) and network interaction was represented.

Quantification of brain neurotransmitters

Brain areas samples from all animals were weighted and homogenized (1:10 w/w) in an ice-cold 0.25 M perchloric acid containing 0.1 M $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ and 0.25 M EDTA. Dihydroxybenzylamine (DHBA) and $N\omega$ -metil-5-hydroxytryptamine ($N\omega$) were added as internal standards for catecholamines and indoleamines, respectively. The mixture was homogenized by sonication (Branson Digital Sonifier, model 250, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT) followed by centrifugation at 3000 g for 10 min at 4°C and the supernatant were kept frozen at -80°C.

After centrifugation at 12000 g for 10 min at 4°C, concentrations of noradrenaline (NA), dopamine (DA), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA), serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA) were determined by HPLC (Elite LaChrom, Merck, Hitachi, Japan) equipped with a Cromolith Rp-18e column (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) with electrochemical detection (ESA Coulochem II 5200, Bedford, MA). Injected volume was 20 µL for all samples. The mobile phase consisted of 0.5 M citrate buffer pH 2.8, 0.05 mM EDTA, 1.2 mM sodium octyl sulphate (SOS) and 1% acetonitrile. The applied voltage was set at 400 mV for electrochemical detection and the flow rate was 1 ml/min.

The chromatographic quantification of NA, dopaminergic and serotonergic NTs showed a good precision, with coefficient of variation between-days and within-days lower than 4%. Linearity was evaluated between 2.5±80 pg/µl for 5-HT, 5±160 pg/µl for NA, 5±240 pg/µl for HVA and 2.5±120 pg/µl for the rest of NTs. Coefficients of determination (R²) were calculated and found to be higher than 0.999 for all analytes. Limit of detection was between 2.14 and 4.97 pg/µL and the limit of quantification was between 6.48 and 15.06 pg/µL for all the analytes. The internal control DHBA allowed the comparison between runs. Dopaminergic total system (DA-system) and serotonergic total system (5-HT-system) are calculated as the sum of all metabolites in the pathway (DA, DOPAC and HVA; and 5-HT and 5-HIAA; respectively). Noradrenergic system (NA-system) is only composed by NA concentration.

Statistical analysis of biochemical and NT data

The Statistical Analyses System (SAS v9.4; software SAS Institute Inc., Cary, NC; 2002±2008) was used to analyse data. Descriptive data is presented with the means and the standard error and the significance level was established at $P < 0.05$ and a tendency was considered at $0.05 \geq P \leq 0.1$.

Normality test of data and residuals was performed for each measure. Whenever possible, data was log transformed to correct the distribution.

The MIXED procedure with repeated measures analysis was performed for biochemical data. The full factorial model includes time (t₀ and t₂) as within-subject factor, handling (PH or NH) as between-subject factor and their interaction. Pig was introduced as the experimental unit and the housing pen as a random effect nested within the two handling treatments.

MIXED procedure with Tukey adjustment was performed for NT and oxidative markers data. Each pig was introduced as the experimental unit, handling (PH or NH) as fixed effect and the housing pen as a random effect nested within the two handling treatments.

Results

Concentration of cortisol, acute phase proteins and GPx

Cortisol was determined in serum, saliva and hair in all individuals under both handling conditions at each time point (t₀ and t₂) (Table 1). Hair cortisol decreased at t₂ vs t₀ and there was a tendency for hair and serum cortisol depending on handling. No differences were observed in saliva cortisol and no interaction between both factors in any of the measurements. Serum acute phase proteins (haptoglobin, CRP ($P < 0.001$) and Pig-MAP ($P < 0.1$)) decreased significantly at t₂, whereas the antioxidant enzyme GPx increased at t₂ ($P < 0.001$) (Table 1). There was no effect of handling, and there was no interaction between time and handling for any variable.

Table 1. Cortisol, acute phase proteins and GPx in pigs subjected to PH and NH.

	t 0				t 2				Handling	Time	Handling * Time
	NH		PH		NH		PH				
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	P	P	P
Hair Cortisol (pg/mg)	24.70	2.05	19.80	1.35	20.80	2.00	17.61	1.53	0.208	0.007	0.852
Serum Cortisol (ng/mL)	23.50	2.22	17.57	1.77	24.21	2.09	21.20	2.09	0.094	0.252	0.410
Saliva Cortisol (ng/mL)	3.47	0.30	4.25	0.57	3.57	0.21	3.60	0.27	0.604	0.172	0.826
Haptoglobin (mg/mL)	0.64	0.07	0.86	0.07	0.39	0.06	0.43	0.04	0.166	<0.0001	0.047
CRP (µg/dL)	16.81	1.29	19.19	1.79	9.23	1.36	8.64	0.91	0.946	<0.0001	0.218
Pig-MAP (mg/mL)	0.98	0.10	1.00	0.10	0.80	0.08	0.92	0.12	0.764	0.021	0.588
GPx (U/L)	6067	214	6149	188	7944	302	7841	246	0.975	<0.0001	0.475

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176928.t001>

Proteomic analysis of PBMCs

The total PBMC proteome was analysed by DIGE. A representative gel is shown in Fig 2. Many of the proteins identified in the present study have been already identified in porcine PBMCs [25]. The 2-DE map obtained in this study was very similar to that reported by these authors with actin as the main spot in the gel (MW ~ 44 kDa, pI ~ 5.7).

A total of 1180 spots were analysed. Comparing differences in protein abundance between t0 and t2 months, 305 spots were localized in the NH group and 153 spots in the PH group with the defined criteria ($P < 0.05$ and >1.5 fold change difference).

Sixty-four differential spots were selected for mass spectrometry analysis on basis of the spot form, distribution and discarding those placed in the side borders of the gel. A total of 54 different proteins of the 64 selected spots were identified by LC-MS/MS (S1 and S2 Tables).

Thirty-seven spots were upregulated at t2 versus t0 whereas 27 were downregulated. In most of the cases the fold-change variation between t0 and t2 was larger in the NH group (54 protein spots) than in the PH group (10 protein spots). Six proteins were altered only in the NH group. No protein was found differentially expressed only in the PH group. Results are presented in Table 2. Only three proteins were differently abundant between NH and PH groups at t0 (KHSRP, PSMA4, and caldesmon) and one at t2 (CCT2).

Functional analysis of identified proteins

Gene Ontology (GO) analysis is shown in Fig 3A. The GO analysis of the proteins identified in NH and PH groups, clearly revealed that the NH group had more GO terms and greater percentage of annotations compared to the PH group (Fig 3B).

Biological processes illustrated in Fig 4 are classified in six groups: A) Immunomodulatory proteins, including Inflammatory response (GO:00006954), Innate immune response (GO:0045087), Viral process (GO:0016032), T cell activation involved on immune response (GO:0002286); B) Cytoskeleton proteins, including specific GO: Cell-matrix adhesion (GO:0007160), Positive regulation of actin depolymeration (GO:0030836), Movement of cell component (GO:0006928), Regulation of cell shape (GO:0008360), Actomyosin structure organization (GO:0031032), Extracellular matrix organization (GO:0030198), Actin rod

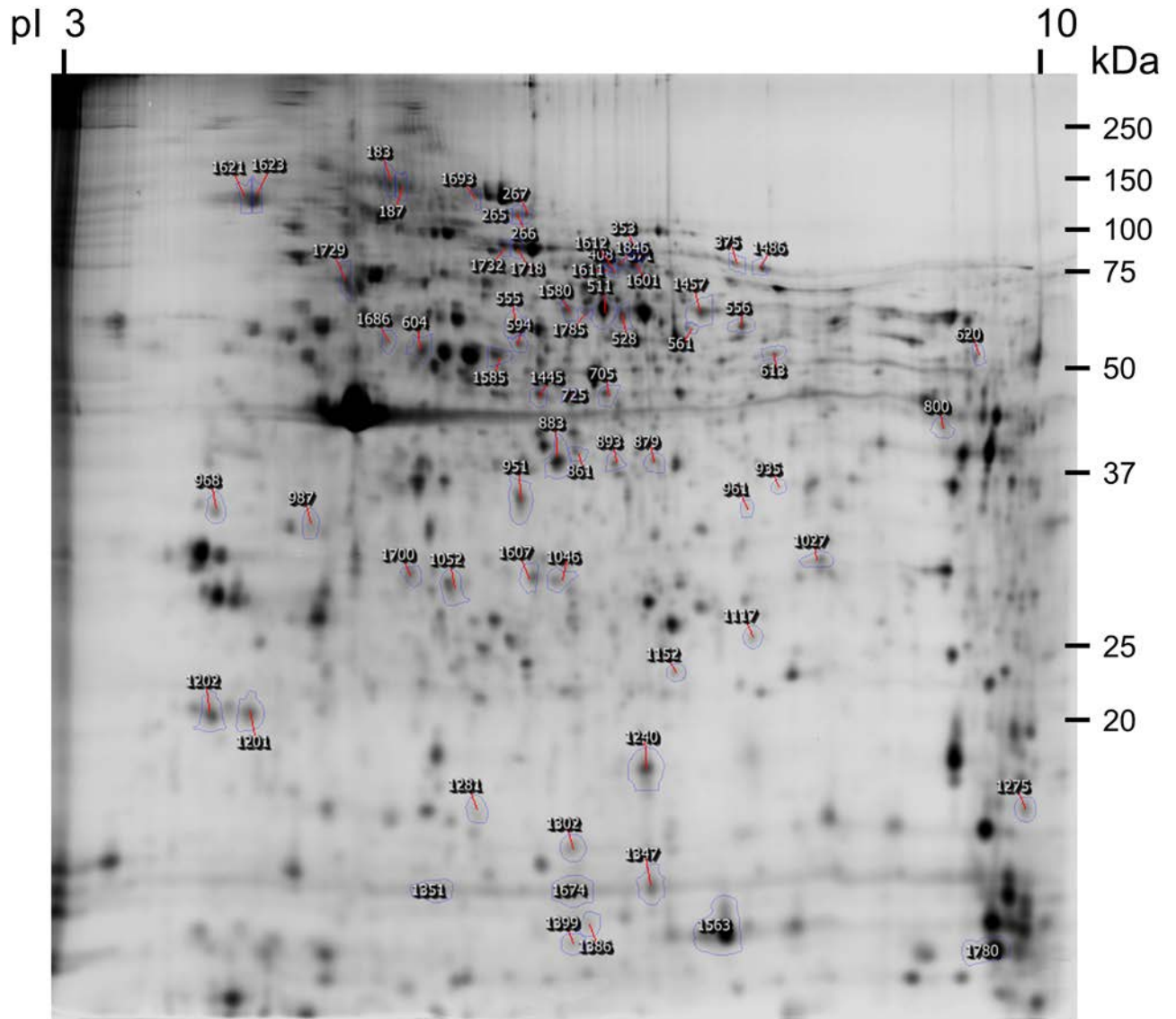


Fig 2. Master gel from porcine PBMC. The position of the differentially abundant spots that were identified is shown.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176928.g002>

assembly (GO:0031247), Cytoskeleton organization (GO:0007010), Integrin-mediated signaling pathway (GO:0007229); C) Gene expression, splicing and translation proteins, including Transcription regulation (GO:0006355), tRNA splicing (GO:0008033), Gene expression (GO:0010467); D) Protein degradation and folding, including Protein polyubiquitination (GO:0000209), Regulation of proteasomal protein catabolic process (GO:0061136), Protein folding (GO:0006457); E) Proteins related to oxidative stress, including Glutathione biosynthetic process (GO:0006750), Response to oxidative stress (GO:0006979) and F) Cellular metabolism proteins, including TCA cycle (GO:0006099), Purine nucleotide biosynthetic process (GO:0006164), Fatty acid biosynthetic process (GO:0006633).

All the identified proteins were analysed with the STRINGv10 software for functional networks. Nodes and interaction between identified proteins are shown in Fig 5.

Table 2. List of proteins differentially expressed in PBMC at t2 versus t0 in PH and NH groups. Proteins with a Fold-change ≥ 1.5 and $P < 0.05$ in at least one of the comparisons are included. The ratio between NH t2/t0 and PH t2/t0 is shown to visualize which group shows the larger variation. ND: not determined if one of the groups does not comply with the criteria of Fold-change ≥ 1.5 and $P < 0.05$. NR: Not represented on STRING.

Spot	Identifi@cation UniProt Pig	Gene	Accession Number UniProt Pig	STRING Name	NH		PH		Fold-change Ratio NH/PH
					t2/t0	P	t2/t0	P	
Group A									
861	Annexin	ANXA1	F1SJB5_PIG	ANXA1	-4.1	0.004	-2.8	0.0003	1.46
	Leukocyte elastase inhibitor	SERPINB1	ILEU_PIG	SERPINB1					
883	Annexin	ANXA1	F1SJB5_PIG	ANXA1	-5.7	0.002	-2.7	0.049	2.11
987	EF-hand domain-containing protein D2	EFHD2	F1SUW3_PIG	EFHD2	1.8	0.042	2.1	0.026	0.86
1046	High mobility group protein B1	HMGB1	F2Z594_PIG	HMGB1	-2.2	0.002	-2.4	0.018	0.92
1240	Calcium-binding protein A9	S100A9	C3S7K6_PIG	S100A9	-11.8	0.0007	-4.3	0.025	2.74
1275	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	PPIA	PPIA_PIG	PPIA	-2.1	0.046	-1.7	0.036	1.24
1607	High mobility group protein B1	HMGB1	F2Z594_PIG	HMGB1	-1.9	0.006	-2	0.014	0.95
1729	Plastin-2	LCP1	F1RK02_PIG	LCP1	-2.9	0.01	-2	0.016	1.45
Group B									
183	Integrin alpha-IIb	ITGA2B	F1RQY8_PIG	ITGA2B	2.1	0.003	1.6	0.027	1.31
187	Integrin alpha-IIb	ITGA2B	F1RQY8_PIG	ITGA2B	2.6	0.017	1.7	0.024	1.53
265	Filamin-A	FLNA	Q2YHQ3_PIG	FLNA	4.2	0.0007	3.3	0.008	1.27
267	Filamin-A	FLNA	Q2YHQ3_PIG	FLNA	3.5	0.003	2.8	0.015	1.25
408	Coronin 1 C	CORO1C	F1RGA9_PIG	CORO1C	2.4	9.6E-05	4.3	0.022	0.56
511	Fibrinogen Beta Chain	FGB	F1RX37_PIG	FGB	3.9	0.007	2.1	0.041	1.86
528	Fibrinogen Alpha Chain	FGA	F1RX36_PIG	FGA	3	0.001	2	0.025	1.50
555	Coronin 1 A	CORO1A	G8G223_PIG	CORO1A	-2	0.003	-1.4	0.035	ND
556	Fibrinogen beta chain	FGB	F1RX37_PIG	FGB	3.9	0.012	1.9	0.044	2.05
594	Coronin 1A	CORO1A	I3LR17_PIG	CORO1A	-2	0.047	-1.4	0.032	ND
604	Fibrinogen gamma chain	FGG	F1RX35_PIG	FGG	3	0.001	2	0.046	1.50
613	Integrin-linked protein kinase	ILK	I3L9C8_PIG	ILK	4.5	0.01	2.6	0.025	1.73
620	Testin	TES	TES_PIG	TES	1.5	0.046	2.4	0.027	0.63
705	Pleckstrin	PLEK	F1SJ07_PIG	PLEK	2.6	0.005	2.1	0.019	1.24
725	Pleckstrin	PLEK	F1SJ07_PIG	PLEK	2.4	0.0005	2	0.042	1.20
	Alpha-actinin	ACTR1A	F2Z5G5_PIG	ACTR1A					
879	PDZ and LIM domain protein 1	PDLIM1	T1RTP3_PIG	PDLIM1	1.5	0.009	2	0.048	0.75
893	PDZ and LIM domain protein 1	PDLIM1	T1RTP3_PIG	PDLIM1	3.4	0.006	4.1	0.011	0.83
935	Calponin-2	CNN2	CNN2_PIG	CNN2	2.2	0.008	1.7	0.019	1.29
961	Calponin-2	CNN2	CNN2_PIG	CNN2	-4.4	2.8E-05	-3.8	0.007	1.16
968	Tropomyosin alpha-1 chain	TPM1	TPM1_PIG	TPM1	2.4	0.04	1.7	0.03	1.41
1201	Myosin regulatory light polypeptide 9	MYL9	MYL9_PIG	MYL9	4	0.01	2.5	0.032	1.60
1202	Myosin regulatory light chain 12B	MYL12B	F1SM78_PIG	MYL12B	2.1	0.006	1.6	0.031	1.31
1399	Filamin-A	FLNA	Q2YHQ3_PIG	FLNA	-2.6	0.011	-1.7	0.022	1.53
1445	Pleckstrin	PLEK	F1SJ07_PIG	PLEK	5.7	0.0008	3.4	0.026	1.68
1457	Fibrinogen beta chain	FGB	F1RX37_PIG	FGB	3.5	0.0005	2.5	0.014	1.40
1580	Fibrinogen beta chain	FGB	F1RX37_PIG	FGB	3.1	0.001	2.2	0.042	1.41
1585	Fibrinogen gamma chain	FGG	F1RX35_PIG	FGG	3	0.007	1.8	0.02	1.67

(Continued)

Table 2. (Continued)

Spot	Identification UniProt Pig	Gene	Accession Number UniProt Pig	STRING Name	NH		PH		Fold-change Ratio NH/PH
					Fold	P	Fold	P	
1601	Fibrinogen alpha chain	FGA	Q28936_PIG	FGA	9.4	0.005	8	0.003	1.18
1611	WD repeat-containing protein 1	WDR1	K9IVR7_PIG	WDR1	3.3	0.004	6.7	0.017	0.49
1612	Fibrinogen alpha chain	FGA	F1RX36_PIG	FGA	8.6	0.015	6.4	0.004	1.34
1621	von Willebrand factor	VWF	F5XVC2_PIG	VWF	4.1	0.016	2.2	0.021	1.86
1623	Endoplasmic reticulum chaperone protein	HSP90B1	ENPL_PIG	HSP90B1	2.7	0.018	2	0.004	1.35
1693	Vinculin	VCL	VINC_PIG	VCL	5	0.003	2.7	0.023	1.85
1718	Coagulation factor XIII, A1 polypeptide	F13A1	K7GQL2_PIG	NR	2.6	0.009	1.6	0.047	1.63
1732	Caldesmon	CALD1	F1SNH3_PIG	CALD1	2.5	0.014	1.6	0.036	1.56
1785	WD repeat-containing protein 1	WDR1	K9IVR7_PIG	WDR1	2.7	0.029	1.7	0.015	1.59
	Fibrinogen beta chain	FGB	F1RX37_PIG	FGB					
Group C									
353	Far upstream element-binding protein 2	KHSRP (FUBP2)	F1SBT6_PIG	KHSRP	-3.4	0.001	-1.2	0.23	ND
561	tRNA-splicing ligase RtcB homolog	RTCB	RTCB_PIG	C22orf28	-2	0.003	-1.4	0.018	ND
800	Elongation factor 1-alpha	EEF1A1	Q0PY11_PIG	EEF1A1	-2.3	0.007	-1.5	0.031	1.53
961	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	HNRNPA2B1	M3UZ37_PIG	HNRNPA2B1	-4.4	2.8E-05	-3.8	0.007	1.16
968	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK	I3LQS0_PIG	HNRNPK	2.4	0.04	1.7	0.03	1.41
1117	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	HNRNPA2B1	M3UZ37_PIG	HNRNPA2B1	-5.6	0.044	-2.9	0.014	1.93
1152	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	HNRNPA2B1	M3UZ37_PIG	HNRNPA2B1	-11.6	0.048	-5.2	0.002	2.23
1281	GTP-binding protein Rheb	RHEB	F2Z5R2_PIG	RHEB	-1.9	0.022	-2.3	0.005	0.83
1347	Histone H2B	HIST1H2BF	F2Z580_PIG	HIST1H2BF	-1.9	0.009	-2.3	0.0002	0.83
1351	Histone H2B	HIST1H2BF	F2Z580_PIG	HIST1H2BF	-1.8	0.014	-2.6	0.006	0.69
1611	Far upstream element-binding protein 1	FUBP1	F1S9S5_PIG	FUBP1	3.3	0.004	6.7	0.017	0.49
1674	Histone H2B	HIST1H2BF	F2Z580_PIG	HIST1H2BF	-2.4	0.008	-2.4	0.0001	1.00
Group D									
594	Chaperonin containing TCP1, subunit 2 (Beta)	CCT2	D0G0C8_PIG	CCT2	-2	0.047	-1.4	0.032	ND
1027	Proteasome subunit alpha type-4	PSMA4	F2Z528_PIG	PSMA4	2.2	0.009	1.4	0.016	ND
1052	Proteasome activator complex subunit 1	PSME1	PSME1_PIG	PSME1	-2.2	0.0005	-1.7	0.034	1.29
1275	SUMO-conjugating enzyme UBC9	UBE2I	I3LSZ1_PIG	UBE2I	-2.1	0.046	-1.7	0.036	1.24
1700	Proteasome activator complex subunit 2	PSME2	PSME2_PIG	PSME2	-2.9	0.001	-2.2	0.008	1.32
Group E									
594	Cytosol aminopeptidase	LAP3	I3LD43_PIG	LAP3	-2	0.047	-1.4	0.032	ND
1302	Peroxisome oxidoreductin-5, mitochondrial	PRDX5	F1RQP0_PIG	PRDX5	-2.6	0.005	-1.8	0.016	1.44
1686	Cytosolic non-specific dipeptidase	CNDP2	F1SNL7_PIG	CNDP2	-2.3	0.003	-2.3	0.008	1.00
Group F									
528	GMP synthase	GMPS	I3LJ73_PIG	GMPS	3	0.001	2	0.025	1.50

(Continued)

Table 2. (Continued)

Spot	Identification UniProt Pig	Gene	Accession Number UniProt Pig	STRING Name	NH		PH		Fold-change Ratio NH/PH
					t2/t0	P	t2/t0	P	
705	Small calcium-binding mitochondrial carrier 1	SLC25A24	B2MUB6_PIG	SLC25A24	2.6	0.005	2.1	0.019	1.24
935	Monoglyceride lipase	MGLL	B8XSJ9_PIG	MGLL	2.2	0.008	1.7	0.019	1.29
951	Malate dehydrogenase, cytoplasmic	MDH1	MDHC_PIG	MDH1	-2.3	0.002	-1.6	0.031	1.44
1386	Histidine triad nucleotide-binding protein 1	HINT1	F1RKI3_PIG	HINT1	-2.8	0.011	-1.9	0.026	1.47
1486	Aconitate hydratase, mitochondrial	ACO2	F1SRC5_PIG	ACO2	-2	0.028	-1.5	0.044	1.33

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176928.t002>

Validation of handling-related proteins

Two proteins, myosin-light chain (MYLC2) and fibrinogen (FG) were selected to validate their intrinsic expression using immunoblot analysis with antibodies specific for porcine proteins. Western blot analysis corroborated that both proteins increased at t2 versus t0 (Fig 6).

Markers of oxidative stress

Since the bioinformatic analysis of data revealed alterations in redox metabolism, and serum GPx activity increased at t2, other markers of oxidative stress were analysed in PBMC extracts from the individuals included in the DIGE experiment: total protein carbonylation and SOD activity, measured as the ratio of oxidized proteins and the ratio of SOD between t2 and t0. As shown in Fig 7, three of the PH-pigs and only one NH-pig showed a SOD activity ratio higher than 1, whereas one PH-pig and two NH-pig showed a protein carbonylation lower than 1.5. Due to the high individual variability, statistical analysis showed no significance for the ratio of oxidized proteins ($P = 0.244$) and a tendency for the ratio of SOD ($P = 0.078$).

Neurotransmitter profile

Neurotransmitters from the catecholamine and serotonin pathways in four brain areas (amygdala, hippocampus, PFC and hypothalamus) were analysed. Statistical tendencies were observed in the concentration of serotonin (5-HT), which increases in the PFC in animals with PH, whereas it decreases in the amygdala in animals in the same condition (Table 3).

Discussion

The stress degree in the farm after mixing of the animals and their subsequent adaptation to the farm was assessed by analysing the concentration of cortisol in serum, saliva and hair at both time points. Hair cortisol showed a significant decrease, indicating that environmental stress decreased throughout time. The deposition of cortisol in hair is considered a good marker of chronic stress in several animal species [39±41]. The decrease in hair cortisol was not accompanied by changes in cortisol in serum and saliva, but this is not unexpected since serum and salivary cortisol are markers of acute stress and display high biological variability. Acute phase proteins (haptoglobin, CRP and Pig-MAP) decreased throughout the experimental period. APPs are markers of inflammation, but they also increase in stress situations [11±13,42]. Taken together, these results indicate that the animals had suffered stress at the beginning of the experiment, probably associated to group mixing on farm, but later they adapt to

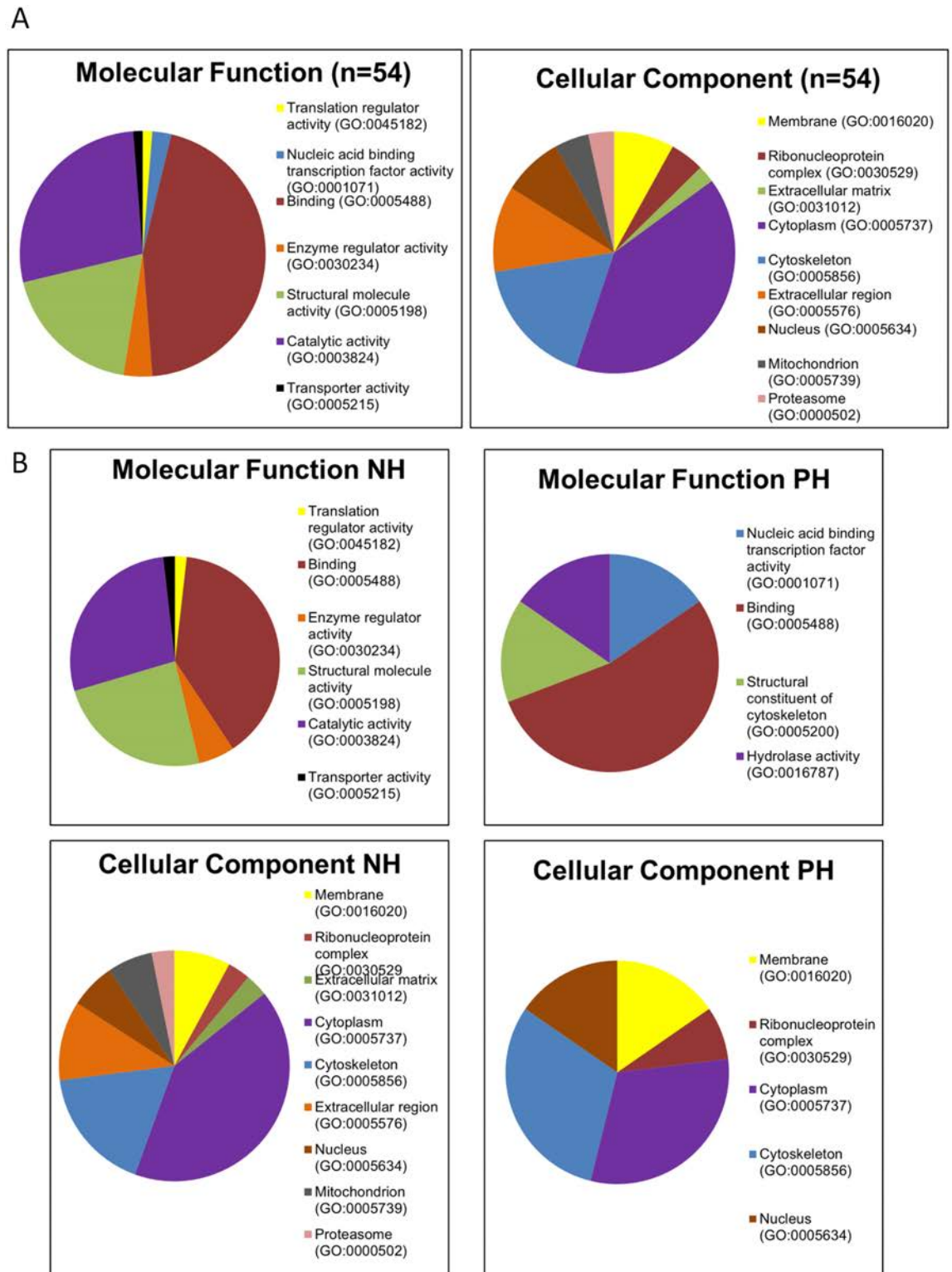


Fig 3. Gene Ontology analysis of proteins identified by DIGE with fold change ≥ 1.5 and $P < 0.05$ criteria, classified as molecular function and cellular component. A) Global analysis of GO categories. Molecular function defined mainly binding proteins (40%) mostly related to protein-protein interaction, structural proteins involved in cell cytoskeleton (23%) and proteins with catalytic activity (28%), specifically hydrolase activity. Regarding cell component, cytoplasm (40%) and cytoskeleton (17%) were predominant. B) GO categories as displayed in NH and PH groups.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176928.g003>

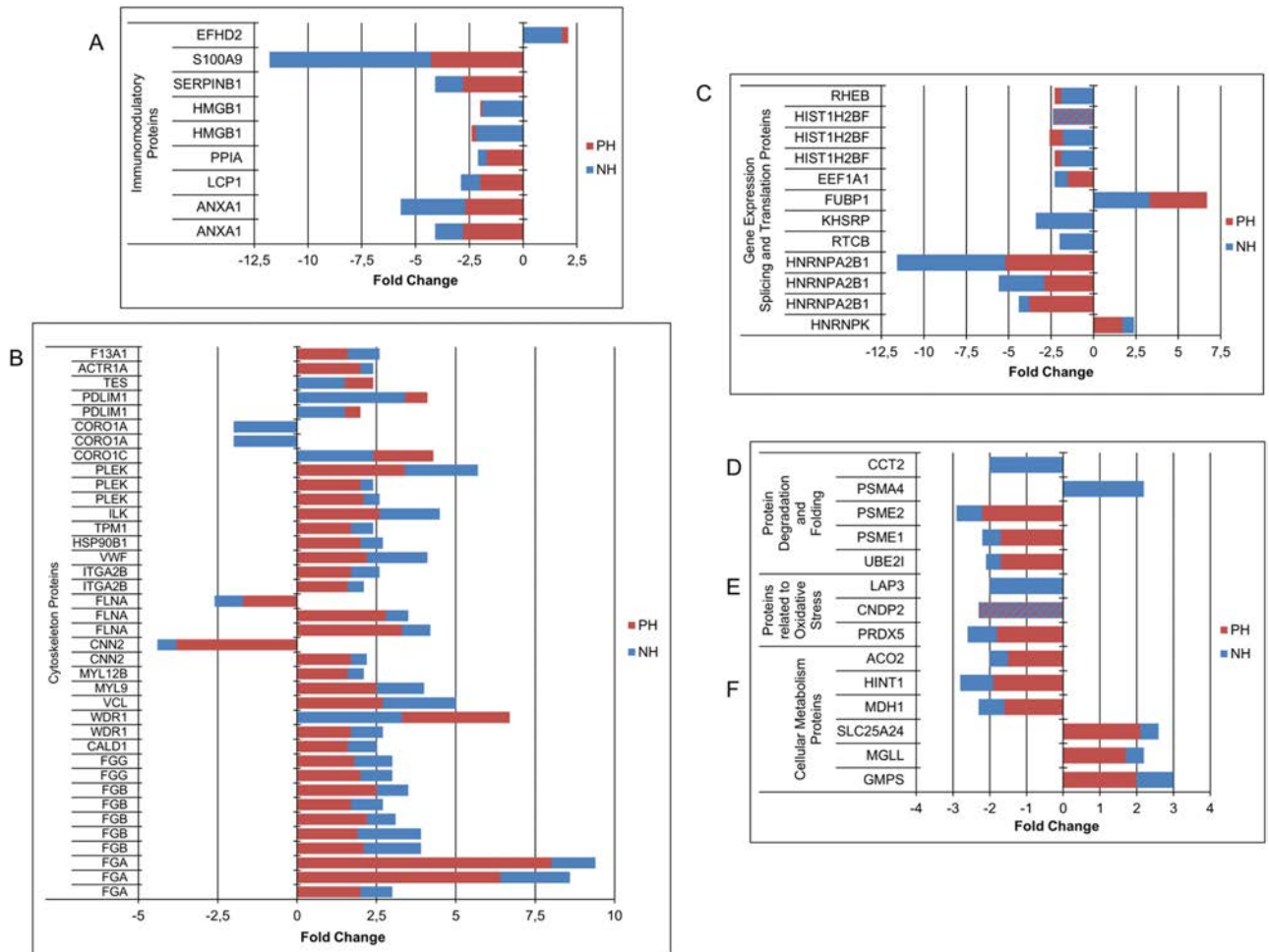


Fig 4. Changes in protein abundance classified by their biological function. Horizontal axes represent fold change (≥ 1.5 and $P < 0.05$) in NH (blue) and PH (red) groups over time.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176928.g004>

the farm environment [43]. There were no differences in hair, serum and saliva cortisol between handling treatments.

Several sets of proteins were differentially regulated over time in PH and NH conditions, which are shown grouped by their biological function in Fig 4. The figure clearly shows that these sets of proteins are altogether up- or downregulated between t0 and t2. Many of the identified proteins share the characteristic of being potentially regulated by cortisol, indicating that changes in protein abundance between t0 and t2 are, at least in part, consequence of lower stress upon adaptation to the farm conditions after group mixing, as discussed above for cortisol, APPs and GPx.

Amongst these protein groups, immunomodulatory proteins (group A in Fig 4) are all downregulated, with the exception of EFHD2 (swiprosin 1). Several of these proteins have been reported to be directly modulated by glucocorticoids (GC), as annexin 1 (ANXA1), that plays a role in GC-mediated downregulation of the early phase of the inflammatory response and promotes rearrangement of the actin cytoskeleton [44]. Leukocyte elastase inhibitor (SERPINB1), a regulator of neutrophil proteases, can be also under the regulation by GC and stress [45]. Stress, possibly mediated by GCs, induces the synthesis and release of HMGB1, HSP90B1

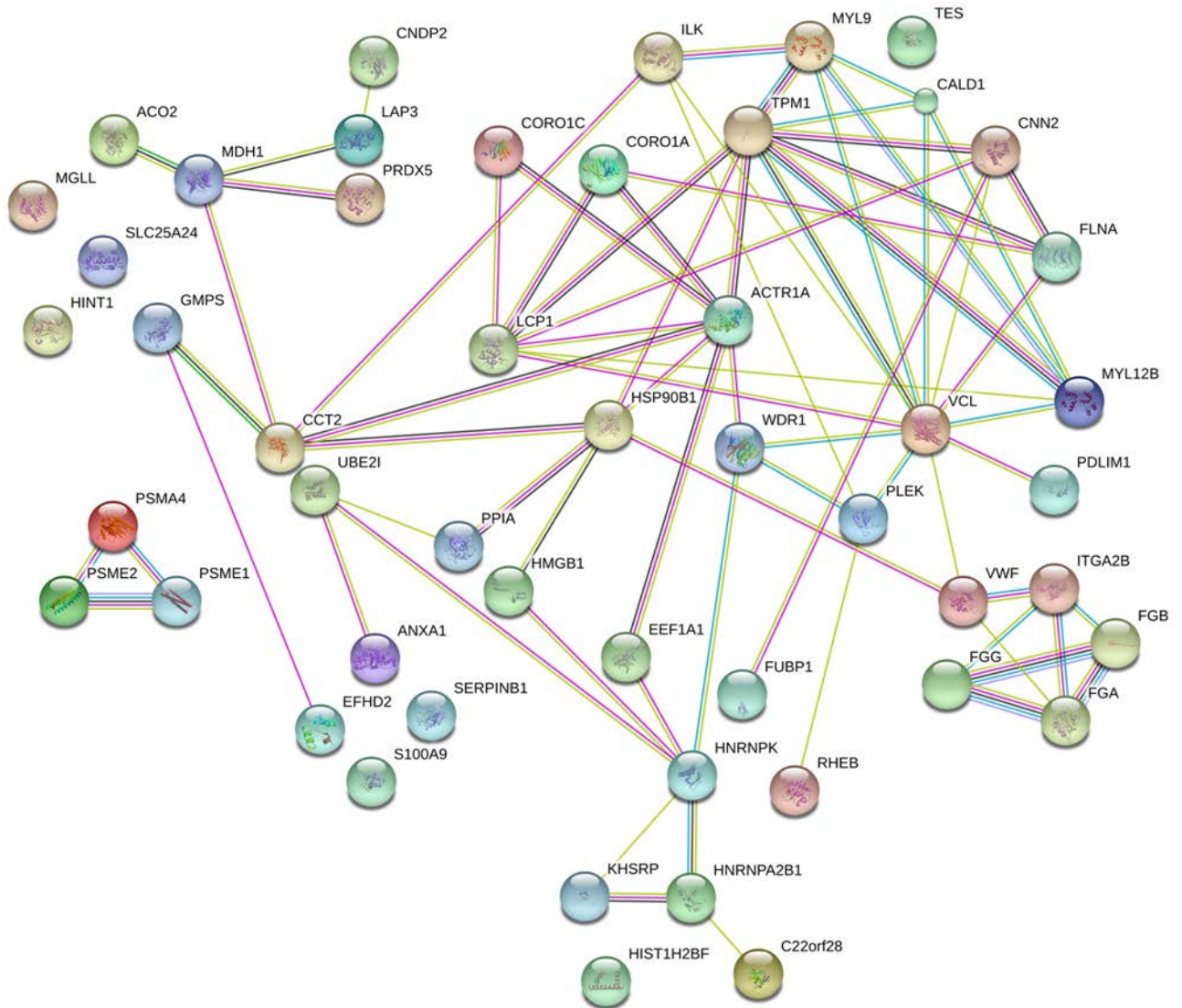


Fig 5. STRING network of 54 proteins identified by DIGE. Links between nodes represent different types of evidence for association (Yellow = Text mining, Pink = Experiments, Cyan = Databases, Black = Coexpression, Green = Neighbourhood, Grey = Homology).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176928.g005>

and S100A9. These proteins are DAMPs (damage associated molecular pattern), which are released by damaged cells and secreted by inflammatory cells [46]. HSP90B1 and plastin-2 (LCP1) [47±49] have been found to be directly regulated by cortisol *in vitro* in monocytes in proteomic studies [50].

One of the most striking findings is the conspicuous set of proteins involved in mRNA splicing (group C): Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2B1 and K (HNRNPA2B1 and HNRNPK), tRNA-splicing ligase RtcB homolog (RTCB), and far upstream element-binding protein 2 (KHSRP, FUSE2). All these proteins, except HNRNPK, are downregulated at t2 and this may be a GC-mediated effect, since steroid hormones can affect the alternative splicing of several genes [51] and affect the processing of pre-mRNA [52,53]. Interestingly, splicing factors were widely identified by proteomic approaches in thymocytes from rats subjected to acute restraint stress [54]. The modulation of proteins involved in splicing as well as in

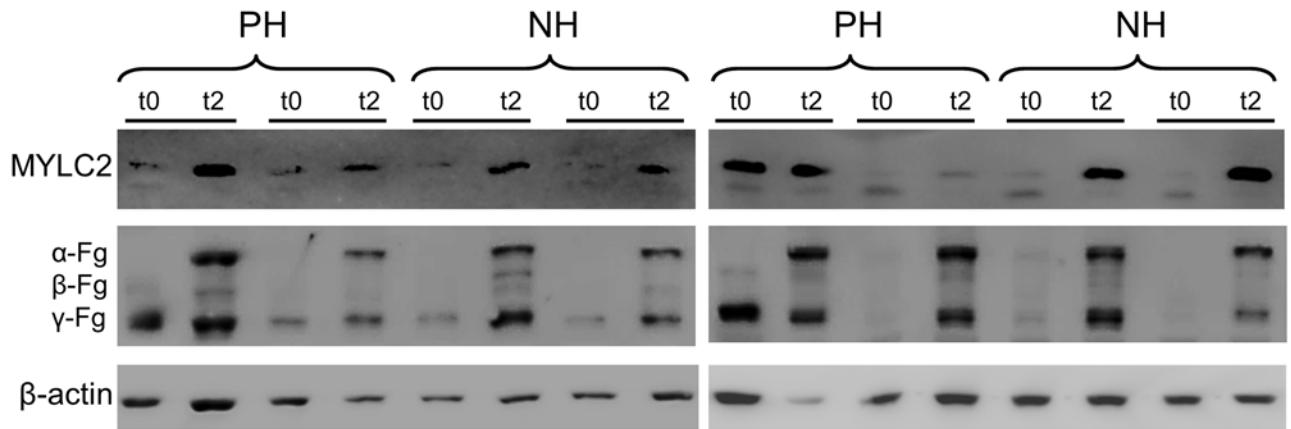


Fig 6. Western blot of myosin light chain 2 (MYLC2) and fibrinogen (chains α , β , γ) from PBMCs from the individuals included in the DIGE study at t0 and t2 in NH and PH groups. β -actin was used as loading control.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176928.g006>

transcription (histone 2B (HIST1H2BF)) or translation (elongation factor 1 alpha 1 (EEF1A)) definitively represent ongoing or upcoming genomic effects.

Another group of downregulated proteins are related to protein degradation and folding (group D): proteasome activator complex subunit 1 and 2 (PSME1/2), proteasome subunit alpha type-4 (PSMA4) and SUMO conjugating enzyme UBC9 (UBE2I), which are implicated

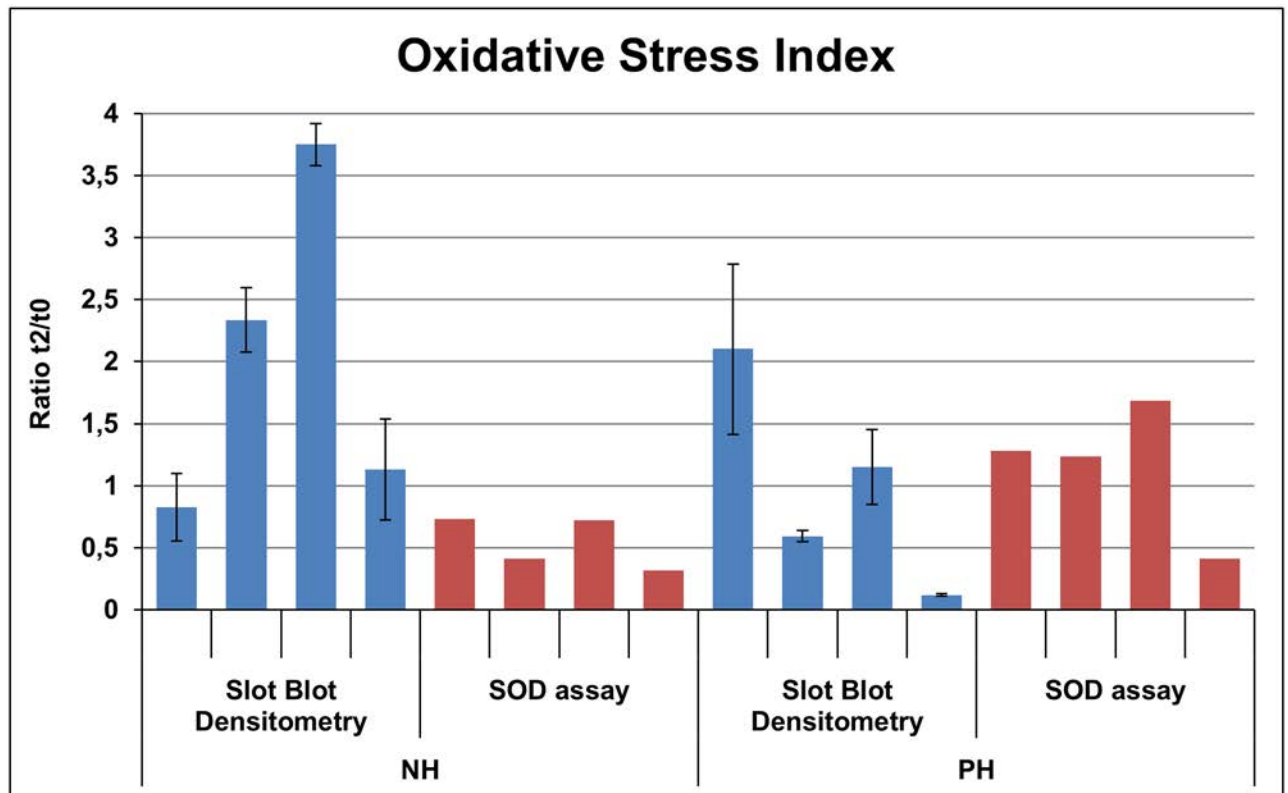


Fig 7. Protein carbonylation (blue) and SOD activity (red) in PBMC extracts from the eight individuals included in the DIGE study. The ratio between t2 and t0 is shown. Error bars correspond to the SE from three independent replicates for each assay.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176928.g007>

Table 3. Brain serotonin (5-HT) concentration (ng/g tissue) in the prefrontal cortex and amygdala of pigs subjected to PH or NH.

Brain area	NH		PH		P
	Mean	SE	Mean	SE	
Prefrontal cortex	200.45	12.90	229.18	10.19	0.093
Amygdala	683.86	22.46	627.61	20.90	0.073

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176928.t003>

in immunoproteasome assembly and are affected by GC and stress [55]. Downregulated chaperones include HSP90B1 [56], peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (PPIA) [57±60] and chaperonin containing TCP1, subunit 2 (Beta) (CCT2) [61,62]. These proteins are downregulated at t2, possibly related to the positive action of GC in proteasome activity and protein turnover [63,64].

On the other side, a set of proteins related to the cytoskeleton and cell-motility [65] are upregulated at t2 (group B). Several of them are components of the focal adhesion signalling pathway: ITGA2B, the integrin alpha chain 2b [66]; ILK, the integrin-linked kinase; PDZ and LIM domain protein 1 (PDLIM1), a scaffold protein that brings other proteins to the cytoskeleton, and several actin-binding proteins such as vinculin (VCL), filamin A (FLNA), tropomyosin alpha 1 chain (TPM1) and the myosin regulatory light chains (MYL9, MYL12B). Other proteins related to the cytoskeleton are coronin (CORO1A, CORO1C), α -centractin (ACTR1A, ARP1), pleckstrin (PLECK) [67], testin (TES) [68] and WD repeat-containing protein 1 (WDR1) [69]. Calcium-binding proteins, as caldesmon (CALD1) [70] and calponin-2 (CNN2) [71] are also related to cell motility. The three fibrinogen chains (α , β , γ), a well characterized integrin ligand, have been found increased in our proteomic analysis. Interestingly, ITGA2B and integrin beta 3 (ITGB3) were found to be downregulated in PBMCs in infection by non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus (ncp BVDV) and upregulated by the cytopathic biotype (cp BVDV) in proteomic studies [66]. That would open the possibility of subclinical infections appearing in our study, which would lead to the activation of the actin cytoskeleton signalling at t2. The mechanism for the upregulation of the cytoskeletal system following adaptation to the farm may be also related to the decrease in endogenous cortisol. Indeed, Flint et al. reported, by using a proteomic approach, that stress hormones in mice provoke a decrease in actin and actin-associated proteins of the cytoskeleton in T lymphocytes, and decrease their migration ability [72].

It is worth to note that there is little overlapping between proteins identified in the present work and the proteins identified in thymocytes (which may be comparable to PBMC in the sense that PBMC contain 70% T lymphocytes) from rats subjected to short acute restraint stress. In this case, the study was designed to investigate the immediate, non-genomic effects of cortisol on the translocation of proteins between subcellular organelles, and mainly signalling proteins were identified [54]. These results indicate that most cellular changes provoked by acute exposition to cortisol differ from the exposition to variable concentrations of the hormone in a real-life, long term experiment, as the one described in the present study. Nevertheless, some main pathways regulated by cortisol are common to short as well as long-term responses to stress since several proteins were identified in both studies (HMGB1, HNRNPK, PSME1, HSP90B1 and CORO1A, and in some cases different isoforms of the same protein (PRDX2/5, PSMA1/4)). All these proteins participate in processes regulated by GCs (gene expression and splicing, immunoproteasome assembly, protein folding and danger signals).

Markers of oxidative stress are also usually altered in stress conditions [11,73,74]. In our case we have found that antioxidant peroxiredoxin-5 (PRDX5) is downregulated at t2, as well as cytosolic non-specific dipeptidase (CNDP2, also known as PepA) and cytosol aminopeptidase (LAP3) (group E). These enzymes are involved in glutathione degradation [75,76]. The

differences in carbonylated proteins and SOD activity confirm the alterations in the oxidative status of PBMC throughout the experiment.

Finally, several proteins related with the metabolism or transport of purine nucleotides are also modulated, as GMP synthase (GMPS), which is upregulated at t2, whereas histidine triad nucleotide-binding protein 1 (HINT1), that hydrolyses purine nucleotides (AMP, GMP), is downregulated. That would lead to an increase in ATP concentration, which is necessary for actin polymerization and cytoskeleton dynamics. Another regulated protein involved in the transport of ATP or ADP across the mitochondrial membrane and consequently in the regulation of its availability in the cytoplasm is the small calcium binding mitochondrial carrier (SLC25A24) [77]. Two enzymes from the Krebs cycle, malate dehydrogenase (MDH1) and aconitate hydratase (ACO2) are downregulated, whereas monoglyceride lipase (MGLL) is upregulated, suggesting an adaptation of energy metabolism (group F).

Fig 8 illustrates the conclusion of the present work. The variation in hair cortisol and serum APPs as well as the careful analysis of the identified proteins suggest that changes in protein composition in PBMC between t0 and t2 is mainly due to a decrease in the stress status of the individuals, following accommodation to the farm and the new group. According to this, our results show that a set of GC-induced proteins (groups ^aA°, ^aC° and ^aD°) are downregulated at t2, concomitantly to the lower concentration of hair cortisol. The upregulation at t2 of proteins related to the cytoskeleton (group ^aB°) may indicate that, after the stress is over, PBMC remain in a state of "readiness" so that they can potentially successfully combat injurious agents, as suggested by Frank et al. [78]. Proteome changes can be associated to shifts in the PBMC subpopulations, well described in situations of stress [79], but the aim of this study was to identify variations in a whole PBMC sample without taking into account changes in the cell type composition, in order to find new potential biomarkers on a PBMC sample. Physiological growth and/or sexual development may also contribute to the proteome changes, but those should be small in a 2-month period at the prepuberal age as indicated by the existing literature [80,81].

Regarding management, there are no clear effects of handling on the pig's physiology, although some of our results may suggest that human care modulate the response to the environment. In the proteomic analysis, the NH group shows more differences than the PH group in number of differentially expressed proteins, and quantitative and qualitative (GO) variations. Animals raised in PH show a lower oxidative stress indicated by higher SOD ratio between t2 and t0. In particular, serotonin (5-HT) increases in the PFC and decreases in the amygdala in animals with PH. It is well-known that the serotonergic system is involved in the regulation of mood, stress, aggressive behaviour and mental disorders in humans and other species [34,82]. In pigs, a decrease in 5-HT has been associated to negative states as stress, fear and aggression [33,83±86] whereas an increase in 5-HT in the PFC has been related to positive conditions in the rat [87,88]. Controversial results have been reported for the amygdala [89,90]. The present study has been performed in parallel to another study in these same pigs regarding to their performance in behavioural tests (the cognitive bias test (CBT), the novel object test (NOT) and the defence cascade test (DCT)) and it did not show either an effect of handling in the tests responses. It is plausible that the handling treatment applied in the present study was not sufficiently intense or long to clearly alter the pigs' physiological response. Lack of effect on cortisol, APP and GPx concentration due to handling would support this possibility.

In conclusion, our results show that many of the identified proteins in the proteomic approach are targets of GCs and, hence, indicate that changes in the PBMC proteome mirror the variations of endogenous cortisol and the degree of stress, since they vary concomitantly with hair cortisol and APPs (Fig 8). Taken together, these findings suggest that changes in the

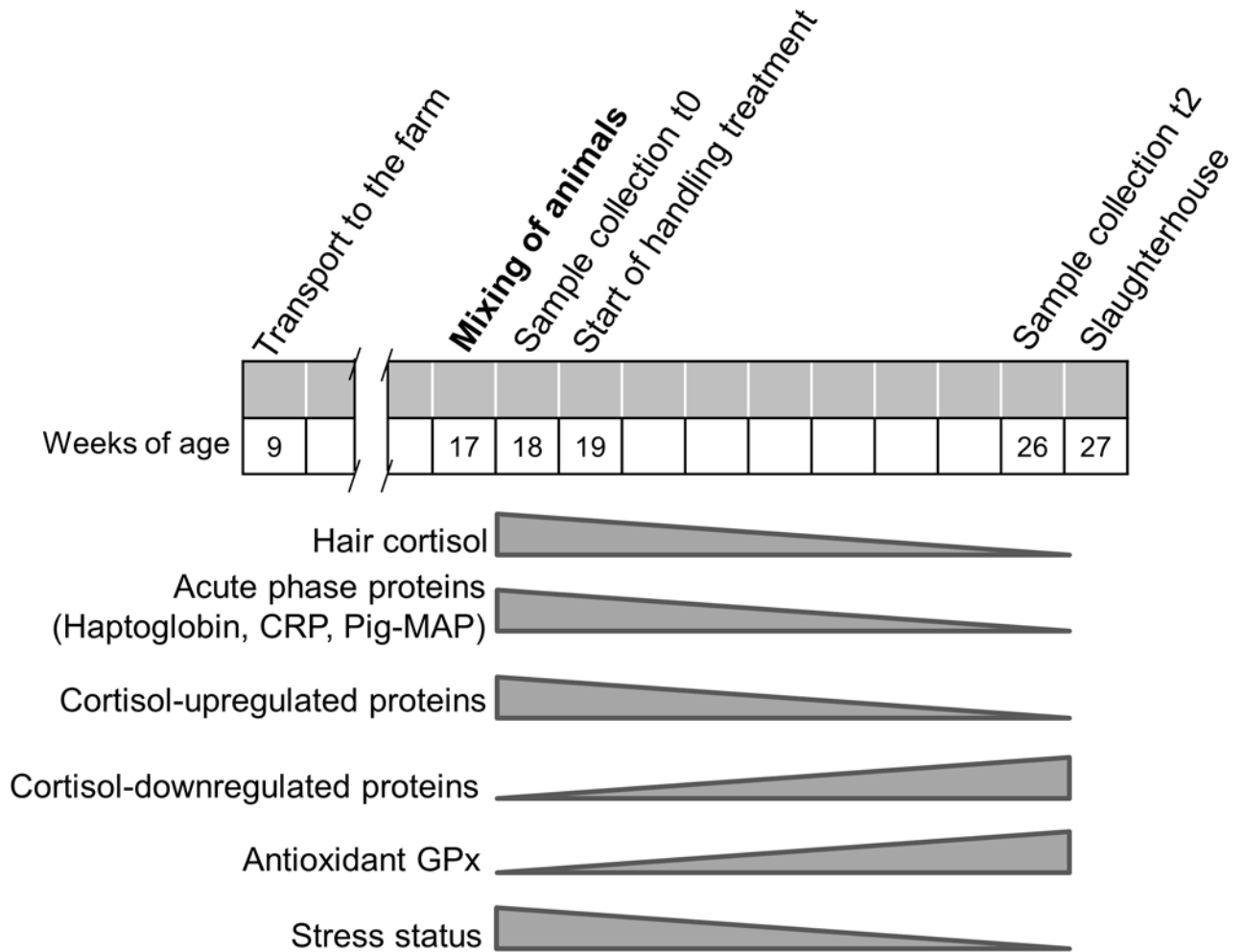


Fig 8. Diagram showing the conclusions of the present work. Changes in hair cortisol, serum acute phase proteins and GPx, and results of the proteomic analysis throughout the experimental 2-month period indicate that changes in PBMC proteins mainly reflect variations in the stress status of the pigs.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176928.g008>

PBMC proteome may be sensitive indicators of animal stress. While still preliminary, the results described in the present work indicate a complex relationship between stress, handling, immune cells and brain neurotransmitters and indicate that further research in these topics should be worthwhile.

Supporting information

S1 Table. List of identified proteins after DIGE labelling of porcine PBMC.
(XLSX)

S2 Table. Peptide list of the identified PBMC proteins.
(XLSX)

S3 Table. Brain neurotransmitters concentration.
(XLSX)

Acknowledgments

We are grateful to Dr. F. Canals and Dr. N. Colomé (Servei de Proteòmica, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona, Spain) for their help with proteomic analysis. The authors thank Anna Vilalta and Susana Benítez for their excellent technical assistance.

Author Contributions

Conceptualization: AB AV.

Data curation: DV AB.

Formal analysis: DV LA AB.

Funding acquisition: AB AV.

Investigation: DV LA RP KY RC EM.

Project administration: AB AV.

Supervision: AB AV.

Validation: DV LA.

Visualization: DV LA AB.

Writing ± original draft: DV AV AB.

Writing ± review & editing: EM.

References

1. Stolba A, Wood-Gush D. The identification of behavioural key features and their incorporation into a housing design for pigs. *Ann Rech Vet.* 1984; 15: 287±299. PMID: [6486700](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6486700/)
2. Rubio-González a., Potes Y, Illán-Rodríguez D, Vega-Naredo I, Sierra V, Caballero B, et al. Effect of animal mixing as a stressor on biomarkers of autophagy and oxidative stress during pig muscle maturation. *Animal.* 2015; 9: 1188±1194. <https://doi.org/10.1017/S1751731115000518> PMID: [25851611](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25851611/)
3. Terlouw EMC, Arnould C, Auperin B, Berri C, Le Bihan-Duval E, Deiss V, et al. Pre-slaughter conditions, animal stress and welfare: current status and possible future research. *Animal.* 2008; 2: 1501±1517. <https://doi.org/10.1017/S1751731108002723> PMID: [22443909](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22443909/)
4. van Staaveren N, Teixeira DL, Hanlon A, Boyle LA. The effect of mixing entire male pigs prior to transport to slaughter on behaviour, welfare and carcass lesions. Hillmann E, editor. *PLoS One.* 2015; 10: e0122841. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122841> PMID: [25830336](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25830336/)
5. Arey D, Franklin M. Effects of straw and unfamiliarity on fighting between newly mixed growing pigs. *Appl Anim Behav Sci.* 1995; 45: 23±30.
6. Oliván M, Fernández-Suárez V, Díaz-Martínez F. Identification of Biomarkers of Stress in Meat of Pigs Managed under Different Mixing Treatments. *Br Biotechnol J.* 2016; 11: 1±13.
7. Rushen J, Taylor AA, de Passille AM. Domestic animals' fear of humans and its effect on their welfare. *Appl Anim Behav Sci.* 1999; 65: 285±303.
8. Hemsworth P. Human±animal interactions in livestock production. *Appl Anim Behav Sci.* 2003; 81: 185±198.
9. Hemsworth PH, Barnett JL, Hansen C. The influence of handling by humans on the behaviour, reproduction and corticosteroids of male and female pigs. *Appl Anim Behav Sci.* 1986; 15: 303±314.
10. Waiblinger S, Boivin X, Pedersen V, Tosi M-V, Janczak AM, Visser EK, et al. Assessing the human±animal relationship in farmed species: A critical review. *Appl Anim Behav Sci.* Elsevier B.V.; 2006; 101: 185±242.
11. Marco-Ramell A, Pato R, Pena R, Saco Y, Manteca X, Ruiz de la Torre JL, et al. Identification of serum stress biomarkers in pigs housed at different stocking densities. *Vet J.* 2011; 190: e66±71. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.01.003> PMID: [21330171](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21330171/)

12. Saco Y, Docampo MJ, Fabrega E, Manteca X, Diestre A, Lampreave F, et al. Effect of stress transport on serum haptoglobin and Pig-MAP in pigs. *Anim Welf.* 2003; 12: 403±409.
13. Salamano G, Mellia E, Candiani D, Ingravalle F, Bruno R, Ru G, et al. Changes in haptoglobin, C-reactive protein and pig-MAP during a housing period following long distance transport in swine. *Vet J.* 2008; 177: 110±115. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.03.015> PMID: 17509918
14. Piñeiro C, Piñeiro M, Morales J, Carpintero R, Campbell FM, Eckersall PD, et al. Pig acute-phase protein levels after stress induced by changes in the pattern of food administration. *Animal.* 2007; 1: 133±139. <https://doi.org/10.1017/S1751731107283909> PMID: 22444216
15. Bendixen E, Danielsen M, Hollung K, Gianazza E, Miller I. Farm animal proteomics: a review. *J Proteomics.* 2011; 74: 282±93. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.11.005> PMID: 21112346
16. Almeida AM, Bassols A, Bendixen E, Bhide M, Ceciliani F, Cristobal S, et al. Animal board invited review: advances in proteomics for animal and food sciences. *Animal.* 2015; 9: 1±17. <https://doi.org/10.1017/S1751731114002602> PMID: 25359324
17. Di Girolamo F, D'Amato A, Lante I, Signore F, Muraca M, Putignani L. Farm animal serum proteomics and impact on human health. *Int J Mol Sci.* 2014; 15: 15396±15411. <https://doi.org/10.3390/ijms150915396> PMID: 25257521
18. Ceciliani F, Restelli L, Lecchi C. Proteomics in farm animals models of human diseases. *Proteomics Clin Appl.* 2014; 8: 677±88. <https://doi.org/10.1002/prca.201300080> PMID: 24595991
19. Bassols A, Turk R, Roncada P. A proteomics perspective: from animal welfare to food safety. *Curr Protein Pept Sci.* 2014; 15: 156±168. PMID: 24555902
20. Kumar B, Manuja A, Aich P. Stress and its impact on farm animals. *Front Biosci (Elite Ed).* 2012; 4: 1759±1767.
21. Marco-Ramell A, Arroyo L, Saco Y, Garcia-Heredia A, Camps J, Fina M, et al. Proteomic analysis reveals oxidative stress response as the main adaptative physiological mechanism in cows under different production systems. *J Proteomics.* 2012; 75: 4399±4411. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.002> PMID: 22543282
22. Marco-Ramell A, de Almeida AM, Cristobal S, Rodrigues P, Roncada P, Bassols A. Proteomics and the search for welfare and stress biomarkers in animal production in the one-health context. *Mol Biosyst.* 2016; 12: 2024±2035. <https://doi.org/10.1039/c5mb00788g> PMID: 26931796
23. Anderson NL, Anderson NG. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics.* 2002; 1: 845±867. PMID: 12488461
24. Shen Y, Kim J, Strittmatter EF, Jacobs JM, Camp DG 2nd, Fang R, et al. Characterization of the human blood plasma proteome. *Proteomics.* 2005; 5: 4034±4045. <https://doi.org/10.1002/pmic.200401246> PMID: 16152657
25. Ramirez-Boo M, Garrido JJ, Ogueta S, Calvete JJ, Gomez-Diaz C, Moreno A. Analysis of porcine peripheral blood mononuclear cells proteome by 2-DE and MS: analytical and biological variability in the protein expression level and protein identification. *Proteomics.* 2006; 6 Suppl 1: S215±25.
26. Ramirez-Boo M, Nunez E, Jorge I, Navarro P, Fernandes LT, Segales J, et al. Quantitative proteomics by 2-DE, 16O/18O labelling and linear ion trap mass spectrometry analysis of lymph nodes from piglets inoculated by porcine circovirus type 2. *Proteomics.* 2011; 11: 3452±3469. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000610> PMID: 21751353
27. Chae JI, Kim J, Lee SG, Koh MW, Jeon YJ, Kim DW, et al. Quantitative proteomic analysis of pregnancy-related proteins from peripheral blood mononuclear cells during pregnancy in pigs. *Anim Reprod Sci.* 2012; 134: 164±176. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.07.008> PMID: 22917877
28. Sarr O, Louveau I, Kalbe C, Metges CC, Rehfeldt C, Gondret F. Prenatal exposure to maternal low or high protein diets induces modest changes in the adipose tissue proteome of newborn piglets. *J Anim Sci.* 2010; 88: 1626±1641. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2542> PMID: 20081074
29. Sejersen H, Sørensen MT, Larsen T, Bendixen E, Ingvarsten KL. Liver protein expression in young pigs in response to a high-fat diet and diet restriction. *J Anim Sci.* 2013; 91: 147±58. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5303> PMID: 23048158
30. Cruzen SM, Pearce SC, Baumgard LH, Gabler NK, Huff-Lonergan E, Lonergan SM. Proteomic changes to the sarcoplasmic fraction of predominantly red or white muscle following acute heat stress. *J Proteomics.* 2015; 128: 141±53. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.07.032> PMID: 26254011
31. Mora F, Segovia G, Del Arco A, de Blas M, Garrido P. Stress, neurotransmitters, corticosterone and body-brain integration. *Brain Res. Elsevier B.V.*; 2012; 1476: 71±85.
32. Asan E, Steinke M, Lesch K-P. Serotonergic innervation of the amygdala: targets, receptors, and implications for stress and anxiety. *Histochem Cell Biol.* 2013; 139: 785±813. <https://doi.org/10.1007/s00418-013-1081-1> PMID: 23494464

33. Belujon P, Grace AA. Hippocampus, amygdala, and stress: interacting systems that affect susceptibility to addiction. *Ann N Y Acad Sci.* 2011; 1216: 114±21. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05896.x> PMID: 21272015
34. Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. Principles of neural science. 5th editio. Sydor A, Lebowitz H, editors. McGraw-Hill Companies, Inc.; 2013.
35. Saco Y, Fraile L, Giménez M, Canalias F, Bassols A. Validation of an immunoturbidimetric method for determination of porcine serum C-reactive protein. *Res Vet Sci.* 2010; 89: 159±162. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2010.02.006> PMID: 20202659
36. Casal N, Manteca X, Peña L R, Bassols A, Fàbrega E. Analysis of cortisol in hair samples as an indicator of stress in pigs. *J Vet Behav Clin Appl Res.* 2017; 19: 1±6.
37. Robinson CE, Keshavarzian A, Pasco DS, Frommel TO, Winship DH, Holmes EW. Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting. *Anal Biochem.* 1999; 266: 48±57. <https://doi.org/10.1006/abio.1998.2932> PMID: 9887212
38. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 1996; 68: 850±858. PMID: 8779443
39. González-de-la-Vara M del R, Valdez RA, Lemus-Ramirez V, Vázquez-Chagoyán JC, Villa-Godoy A, Romano MC. Effects of adrenocorticotrophic hormone challenge and age on hair cortisol concentrations in dairy cattle. *Can J Vet Res.* 2011; 75: 216±21. PMID: 22210998
40. Gow R, Thomson S, Rieder M, Van Uum S, Koren G. An assessment of cortisol analysis in hair and its clinical applications. *Forensic Sci Int.* 2010; 196: 32±7. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.12.040> PMID: 20096513
41. Martelli G, Sardi L, Stancampiano L, Govoni N, Zannoni A, Nannoni E, et al. A study on some welfare-related parameters of hDAF transgenic pigs when compared with their conventional close relatives. *Animal.* 2014; 8: 810±6. <https://doi.org/10.1017/S1751731114000433> PMID: 24739353
42. Pineiro M, Pineiro C, Carpintero R, Morales J, Campbell FM, Eckersall PD, et al. Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. *Vet J.* 2007; 173: 669±674. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.02.006> PMID: 16584904
43. Saco Y, Fraile LJ, Gimenez M, Pato R, Montoya M, Bassols A. Haptoglobin serum concentration is a suitable biomarker to assess the efficacy of a feed additive in pigs. *Animal.* 2010; 4: 1561±1567. <https://doi.org/10.1017/S1751731109991418> PMID: 22444704
44. Perretti M, D'Acquisto F. Annexin A1 and glucocorticoids as effectors of the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9: 62±70. <https://doi.org/10.1038/nri2470> PMID: 19104500
45. Paquereau L, Vilarem MJ, Rossi V, Rouayrenc JF, Le Cam A. Regulation of two rat serine-protease inhibitor gene promoters by somatotropin and glucocorticoids. Study with intact hepatocytes and cell-free systems. *Eur J Biochem.* 1992; 209: 1053±1061. PMID: 1425686
46. Frank MG, Weber MD, Watkins LR, Maier SF. Stress sounds the alarmin: The role of the danger-associated molecular pattern HMGB1 in stress-induced neuroinflammatory priming. *Brain Behav Immun.* 2015; 48: 1±7. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.03.010> PMID: 25816800
47. Oliveira RAS, Correia-Oliveira J, Tang L-J, Garcia RC. A proteomic insight into the effects of the immunomodulatory hydroxynaphthoquinone lapachol on activated macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2012; 14: 54±65. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2012.05.022> PMID: 22705049
48. Zhou DH, Yuan ZG, Zhao FR, Li HL, Zhou Y, Lin RQ, et al. Modulation of mouse macrophage proteome induced by *Toxoplasma gondii* tachyzoites in vivo. *Parasitol Res.* 2011; 109: 1637±1646. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2435-z> PMID: 21584632
49. Forster F, Paster W, Supper V, Schatzlmaier P, Sunzenauer S, Ostler N, et al. Guanylate binding protein 1-mediated interaction of T cell antigen receptor signaling with the cytoskeleton. *J Immunol.* 2014; 192: 771±781. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1300377> PMID: 24337748
50. Billing AM, Fack F, Renaut J, Olinger CM, Schote AB, Turner JD, et al. Proteomic analysis of the cortisol-mediated stress response in THP-1 monocytes using DIGE technology. *J Mass Spectrom.* 2007; 42: 1433±1444. <https://doi.org/10.1002/jms.1270> PMID: 17960574
51. Auboeuf D, Batsché E, Dutertre M, Muchardt C, O'Malley BW. Coregulators: transducing signal from transcription to alternative splicing. *Trends Endocrinol Metab.* 2007; 18: 122±129. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2007.02.003> PMID: 17320409
52. Kornblihtt AR, de la Mata M, Fededa JP, Munoz MJ, Nogues G. Multiple links between transcription and splicing. *RNA.* 2004; 10: 1489±1498. <https://doi.org/10.1261/rna.7100104> PMID: 15383674
53. Kornblihtt AR. Promoter usage and alternative splicing. *Curr Opin Cell Biol.* 2005; 17: 262±268. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.04.014> PMID: 15901495

54. Billing AM, Revets D, Hoffmann C, Turner JD, Vernocchi S, Muller CP. Proteomic profiling of rapid non-genomic and concomitant genomic effects of acute restraint stress on rat thymocytes. *J Proteomics*. 2012; 75: 2064±2079. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.01.008> PMID: 22270012
55. Truckenmiller ME, Bonneau RH, Norbury CC. Stress presents a problem for dendritic cells: corticosterone and the fate of MHC class I antigen processing and presentation. *Brain Behav Immun*. 2006; 20: 210±218. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2006.01.002> PMID: 16504465
56. Brenner BG, Wainberg Z. Heat shock proteins: novel therapeutic tools for HIV-infection? *Expert Opin Biol Ther*. 2001; 1: 67±77. <https://doi.org/10.1517/14712598.1.1.67> PMID: 11727548
57. von Hahn T, Ciesek S. Cyclophilin polymorphism and virus infection. *Curr Opin Virol*. 2015; 14: 47±49. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.07.012> PMID: 26281011
58. Liu X, Zhao Z, Liu W. Insights into the roles of cyclophilin A during influenza virus infection. *Viruses*. 2013; 5: 182±191. <https://doi.org/10.3390/v5010182> PMID: 23322171
59. Zhou D, Mei Q, Li J, He H. Cyclophilin A and viral infections. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012; 424: 647±50. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.024> PMID: 22814107
60. de Wilde AH, Li Y, van der Meer Y, Vuagniaux G, Lysek R, Fang Y, et al. Cyclophilin inhibitors block arterivirus replication by interfering with viral RNA synthesis. *J Virol*. 2013; 87: 1454±1464. <https://doi.org/10.1128/JVI.02078-12> PMID: 23152531
61. Grantham J, Brackley KI, Willison KR. Substantial CCT activity is required for cell cycle progression and cytoskeletal organization in mammalian cells. *Exp Cell Res*. 2006; 312: 2309±2324. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.03.028> PMID: 16765944
62. Cao S, Carlesso G, Osipovich AB, Llanes J, Lin Q, Hoek KL, et al. Subunit 1 of the prefoldin chaperone complex is required for lymphocyte development and function. *J Immunol*. 2008; 181: 476±484. PMID: 18566413
63. Tonomura N, McLaughlin K, Grimm L, Goldsby RA, Osborne BA. Glucocorticoid-induced apoptosis of thymocytes: requirement of proteasome-dependent mitochondrial activity. *J Immunol*. 2003; 170: 2469±2478. PMID: 12594272
64. Braun TP, Marks DL. The regulation of muscle mass by endogenous glucocorticoids. *Front Physiol*. 2015; 6: 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00012> PMID: 25691871
65. Dupré L, Houmadi R, Tang C, Rey-Barroso J. T Lymphocyte Migration: An Action Movie Starring the Actin and Associated Actors. *Front Immunol*. 2015; 6: 586. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00586> PMID: 26635800
66. Ammari M, McCarthy FM, Nanduri B, Pinchuk LM. Analysis of Bovine Viral Diarrhea Viruses-infected monocytes: identification of cytopathic and non-cytopathic biotype differences. *BMC Bioinformatics*. 2010; 11 Suppl 6: S9.
67. Gailani D, Fisher TC, Mills DC, Macfarlane DE. P47 phosphoprotein of blood platelets (pleckstrin) is a major target for phorbol ester-induced protein phosphorylation in intact platelets, granulocytes, lymphocytes, monocytes and cultured leukaemic cells: absence of P47 in non-haematopoietic cells. *Br J Haematol*. 1990; 74: 192±202. PMID: 2317454
68. Coultts AS. TES is a novel focal adhesion protein with a role in cell spreading. *J Cell Sci*. 2003; 116: 897±906. PMID: 12571287
69. Voegtli WC, Madrona AY, Wilson DK. The structure of Aip1p, a WD repeat protein that regulates Cofilin-mediated actin depolymerization. *J Biol Chem*. 2003; 278: 34373±34379. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302773200> PMID: 12807914
70. Arias MP, Pacaud M. Macrophage caldesmon is an actin bundling protein. *Biochemistry*. 2001; 40: 12974±12982. PMID: 11669635
71. Wu K-C, Jin J-P. Calponin in non-muscle cells. *Cell Biochem Biophys*. 2008; 52: 139±148. <https://doi.org/10.1007/s12013-008-9031-6> PMID: 18946636
72. Flint M, Budiu R, Teng P, Sun M, Stolz D, Lang M, et al. Restraint stress and stress hormones significantly impact T lymphocyte migration and function through specific alterations of the actin cytoskeleton. *Brain, Behavior, and Immunity* 2011; 25, 1187±1196. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.03.009> PMID: 21426930
73. Burke NC, Scaglia G, Boland HT, Swecker WS Jr. Influence of two-stage weaning with subsequent transport on body weight, plasma lipid peroxidation, plasma selenium, and on leukocyte glutathione peroxidase and glutathione reductase activity in beef calves. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009; 127: 365±370. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.11.017> PMID: 19110316
74. Chirase NK, Greene LW, Purdy CW, Loan RW, Auvermann BW, Parker DB, et al. Effect of transport stress on respiratory disease, serum antioxidant status, and serum concentrations of lipid peroxidation biomarkers in beef cattle. *Am J Vet Res*. 2004; 65: 860±864. PMID: 15198229

75. Kaur H, Kumar C, Junot C, Toledano MB, Bachhawat AK. Dug1p is a Cys-Gly peptidase of the gamma-glutamyl cycle of *Saccharomyces cerevisiae* and represents a novel family of Cys-Gly peptidases. *J Biol Chem*. 2009; 284: 14493±502. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808952200> PMID: 19346245
76. Cappiello M, Lazzarotti A, Buono F, Scaloni A, D'Ambrosio C, Amodeo P, et al. New role for leucyl aminopeptidase in glutathione turnover. *Biochem J*. 2004; 378: 35±44. <https://doi.org/10.1042/BJ20031336> PMID: 14583094
77. Palmieri F. The mitochondrial transporter family SLC25: identification, properties and physiopathology. *Mol Aspects Med*. 2013; 34: 465±484. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2012.05.005> PMID: 23266187
78. Frank MG, Watkins LR, Maier SF. Stress-induced glucocorticoids as a neuroendocrine alarm signal of danger. *Brain Behav Immun*. 2013; 33: 1±6. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.02.004> PMID: 23459026
79. Bush B. White blood cells. In: Bush B, editor. Interpretation of laboratory results for small animals clinicians. 1st ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1991. pp. 132±195.
80. Lissner MM, Thomas BJ, Wee K, Tong A-J, Kollmann TR, Smale ST. Age-Related Gene Expression Differences in Monocytes from Human Neonates, Young Adults, and Older Adults. *PLoS One*. 2015; 10: e0132061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132061> PMID: 26147648
81. Zelnickova P, Leva L, Stepanova H, Kovaru F, Faldyna M. Age-dependent changes of proinflammatory cytokine production by porcine peripheral blood phagocytes. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008; 124: 367±378. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2008.04.016> PMID: 18534689
82. Albert PR, Vahid-Ansari F, Luckhart C. Serotonin-prefrontal cortical circuitry in anxiety and depression phenotypes: pivotal role of pre- and post-synaptic 5-HT1A receptor expression. *Front Behav Neurosci*. Frontiers Media SA; 2014; 8: 199.
83. Adeola O, Ball RO, House JD, O'Brien PJ. Regional brain neurotransmitter concentrations in stress-susceptible pigs. *J Anim Sci*. 1993; 71: 968±974. PMID: 8097511
84. Poletto R, Cheng H-W, Meisel RL, Richert BT, Marchant-Forde JN. Gene expression of serotonin and dopamine receptors and monoamine oxidase-A in the brain of dominant and subordinate pubertal domestic pigs (*Sus scrofa*) fed a β -adrenoreceptor agonist. *Brain Res*. 2011; 1381: 11±20. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.11.035> PMID: 21094150
85. Poletto R, Meisel RL, Richert BT, Cheng H-W, Marchant-Forde JN. Aggression in replacement grower and finisher gilts fed a short-term high-tryptophan diet and the effect of long-term human±animal interaction. *Appl Anim Behav Sci*. 2010; 122: 98±110.
86. Li YZ, Kerr BJ, Kidd MT, Gonyou HW. Use of supplementary tryptophan to modify the behavior of pigs. *J Anim Sci*. 2006; 84: 212±220. PMID: 16361509
87. Brenes JC, Rodríguez O, Fornaguera J. Differential effect of environment enrichment and social isolation on depressive-like behavior, spontaneous activity and serotonin and norepinephrine concentration in prefrontal cortex and ventral striatum. *Pharmacol Biochem Behav*. 2008; 89: 85±93. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2007.11.004> PMID: 18096212
88. Masas-Calvo M, Sequeira-Cordero A, Mora-Gallegos A, Fornaguera-Trías J. Behavioral and neurochemical characterization of maternal care effects on juvenile Sprague-Dawley rats. *Physiol Behav*. 2013; 118: 212±217. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.05.033> PMID: 23711565
89. Kirby LG, Allen AR, Lucki I. Regional differences in the effects of forced swimming on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindoleacetic acid. *Brain Res*. 1995; 682: 189±196. PMID: 7552310
90. Rueter LE, Jacobs BL. A microdialysis examination of serotonin release in the rat forebrain induced by behavioral/environmental manipulations. *Brain Res*. 1996; 739: 57±69. PMID: 8955925



Sex and intrauterine growth restriction modify brain neurotransmitters profile of newborn piglets



M. Vázquez-Gómez^a, D. Valent^b, C. García-Contreras^c, L. Arroyo^b, C. Óvilo^c, B. Isabel^a, A. Bassols^b, A. González-Bulnes^{c,*}

^a Faculty of Veterinary, UCM, Madrid, Spain

^b Faculty of Veterinary, UAB, Barcelona, Spain

^c INIA, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 July 2016

Received in revised form 7 September 2016

Accepted 7 September 2016

Available online 9 September 2016

Keywords:

Catecholamines

Indoleamines

Intrauterine growth restriction

Limbic system

Neurotransmitters

Swine

ABSTRACT

The current study aimed to determine, using a swine model of intrauterine growth restriction (IUGR), whether short- and long-term neurological deficiencies and interactive dysfunctions of Low Birth-Weight (LBW) offspring might be related to altered pattern of neurotransmitters. Hence, we compared the quantities of different neurotransmitters (catecholamines and indoleamines), which were determined by HPLC, at brain structures related to the limbic system (hippocampus and amygdala) in 14 LBW and 10 Normal Body-Weight (NBW) newborn piglets. The results showed, firstly, significant effects of sex on the NBW newborns, with females having higher dopamine (DA) concentrations than males. The IUGR processes affected DA metabolism, with LBW piglets having lower concentrations of noradrenaline at the hippocampus and higher concentrations of the DA metabolites, homovanillic acid (HVA), at both the hippocampus and the amygdala than NBW neonates. The effects of IUGR were modulated by sex; there were no significant differences between LBW and NBW females, but LBW males had higher HVA concentration at the amygdala and higher concentration of 5-hydroxyindoleacetic acid, the serotonin metabolite, at the hippocampus than NBW males. In conclusion, the present study shows that IUGR is mainly related to changes, modulated by sex, in the concentrations of catecholamine neurotransmitters, which are related to adaptation to physical activity and to essential cognitive functions such as learning, memory, reward-motivated behavior and stress.

© 2016 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Intrauterine growth restriction (IUGR), or fetal growth restriction, is defined as the failure of the fetus to reach its potential growth-rate and is mainly due to insufficient supply of nutrients and oxygen, which causes Low Birth-Weight (LBW) offspring. Traditionally, IUGR has been related to maternal malnutrition (which induces nutrient shortage to the fetus; Bell and Ehrhardt, 2002; Wu et al., 2004) and/or maternal hypobaric hypoxia in case of pregnant women living or visiting high-altitudes (which induces oxygen shortage to the fetus; Keyes et al., 2003). IUGR incidence at low-altitude is estimated in around 6 and 15% for affluent and

less-favored areas, respectively (Baschat, 2004; Moore et al., 1998). The combination of high-altitude and scarcity is related to IUGR rates around 17% (Jensen and Moore, 1997; Mortola et al., 2000). However, there is also a concerning increase in IUGR occurrence under adequate social, environmental and nutritional conditions in developed countries. More than 60% of IUGR offspring in developed countries are triggered by placental insufficiency due to abnormal placental development (Ghidini, 1996; Krebs et al., 1996), which impairs nutrient and oxygen transfer to the fetus and, hence, adequate growth.

The growth deficiencies related to shortage of oxygen and nutrients are typically asymmetrical, since fetuses are able to adapt their physiology to optimize or preserve the growth of vital organs, like the brain (effect known as 'brain-sparing'), at the expense of others (Yu and Upadhyay, 2004). The objective of the 'brain-sparing' effect is to protect the development of the brain (Miller et al., 2016), the most relevant organ for survival, to ensure essential functions necessary for life; the so-called 'autonomic functions' like breathing, recognition the surrounding environment and suckling (Perry,

Abbreviations: DA, dopamine; HVA, homovanillic acid; IQ, intelligence quotient; IUGR, intrauterine growth restriction; LBW, low birth-weight; NBW, normal body-weight.

* Corresponding author.

E-mail address: bulnes@inia.es (A. González-Bulnes).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.09.004>

0736-5748/© 2016 ISDN. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

2002). However, this does not guarantee normal brain development and function, thus there is still an increased risk of short- and long-term neurological deficiencies, specifically at the limbic system of the IUGR offspring, which cause cognitive, emotional and interactive impairments (Geva et al., 2012; Miller et al., 2016). These alterations in case of IUGR may occur due to changes in the neurotransmitters of limbic system (Bauer et al., 2003), catecholamines and indoleamines are among the most important (Berumen et al., 2012; Palmiter, 2007).

Hence, there is a strong necessity for research in the area for the future development of diagnostic, preventive and therapeutic strategies to diminish the incidence and consequences of IUGR. However, there is a paucity of studies, except a recent experiment in rabbits (Hernández-Andrade et al., 2015), evaluating the profiles of different excitatory and inhibitory neurotransmitters at the limbic system, which play a major role in autonomic functions.

Swine is a recognized model for IUGR caused by deficiencies in placental growth (Gonzalez-Bulnes et al., 2016); its high prolificacy limits the available uterine space for the development of the placenta and, hence, compromises placental functions and causes IUGR in a high percentage of the littermates (around 15–20%; Ashworth et al., 2001; Foxcroft et al., 2006; Wu et al., 2006). The experimental advantage is therefore the coexistence of IUGR and normal fetuses in the same litter, which allows accurate comparative studies among them, like in other polytocous species; but, specifically IUGR piglets represent a suitable model for IUGR humans due to developmental similarities in central autonomic functions (Gootman, 1986). Moreover, pigs have a more similar brain development to humans than rodent and rabbits (Bassols et al., 2014; Lind et al., 2007). Hence, the aim of this study was to evaluate possible differences between Normal and Low Birth-Weight (NBW and LBW, respectively) newborn piglets in the levels of different neurotransmitters (catecholamines and indoleamines) at hippocampus and amygdala; two structures of the limbic system, related to learning, memory, reward-motivated behavior and stress.

2. Material and methods

2.1. Animals and experimental procedure

The trial was performed under a Project License from the INIA Scientific Ethic Committee and involved 24 piglets of Iberian x Duroc genotype selected by sex and birth-weight from the components of the litters of 21 multiparous (fourth pregnancy) Iberian sows. Distribution of Normal and Low Birth-Weight newborns was performed on the basis of birth-weight under a standard deviation (SD; Anthony et al., 2003; Blomberg et al., 2010) to the mean birth-weight of the piglets from all litters (1319 ± 313 g). Hence, 10 piglets were NBW (5 females and 5 males) whilst 14 were LBW (8 females and 6 males). Piglets were sacrificed immediately after birth by stunning and exsanguination according to the Spanish Policy for Animal Protection RD53/2013, which meets the European

Union Directive 2010/63/UE about the protection of animals used in experimentation. Afterwards, piglets were decapitated and, after weighing the head, the brain was immediately removed from the skull and also weighed. Hippocampus ($n=24$, 10 NBW and 14 LBW) and amygdala ($n=22$, 10 NBW and 12 LBW) were dissected, snap frozen in liquid nitrogen and finally stored at -80°C until neurotransmitter quantification.

2.2. Analysis of neurotransmitters

Samples were weighted and homogenized by sonication (Branson Digital Sonifier 250, Branson Ultrasonics Corp., Danbury, CT) in a lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl and 0.1% Triton X-100) with 0.3 mg tissue/1 mL lysis buffer relation. Internal standards of catecholamines and indoleamines (Dihydroxybenzylamine (DHBA) and Nometil-5-hydroxytryptamine (N ω) respectively) were added on lysis buffer to allow the comparison between runs. After that, HPLC buffer (0.25 M perchloric acid containing 0.1 M sodium metabisulfite ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) and 0.25 M ethylenediaminetetraacetate (EDTA)) were added in a 1.5 dilution. Afterwards, samples were centrifuged at 12000g for 10 min at 4°C and 40 μL of supernatant was injected in HPLC for determination of catecholamines (dopamine [DA] and its metabolites noradrenaline [NA], 3,4-dihydroxyphenylacetic acid [DOPAC] and homovanillic acid [HVA]) and indoleamines (serotonin [5-HT] and its metabolite 5-hydroxyindoleacetic acid [5-HIAA]).

Concentrations of the different neurotransmitters were determined using high performance liquid chromatography (Elite LaChrom, Merck-Hitachi, Prague, The Czech Republic) equipped with a Cromolith Rp-18e column (Merck, Darmstadt, Germany) with electrochemical detection (ESA Coulochem II 5200). The mobile phase consisted of 0.5 M citrate buffer pH 2.8, 0.05 mM EDTA, 1.2 mM sodium octyl sulphate (SOS) and 1% acetonitrile. The applied voltage was set at 0.4 mV and the flow rate was 1 mL/min.

2.3. Statistical analysis

Effects of sex (female vs. male) and occurrence of IUGR (LBW vs. NBW) and their interactions on developmental traits (total body-weight, total weights of head and brain and relative weights of head-to-body and of brain-to-head and brain-to-body) and neurotransmitters concentrations were assessed by a *t*-Student test after a Kolmogorov-Smirnov test showed normality of the data. Results were expressed as mean \pm SEM and the threshold for statistical significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Morphometric features of piglets

Mean body-weight was higher in NBW than in LBW piglets (Table 1), but there were no significant differences in body-weight between female and male piglets, neither in the NBW group nor in

Table 1
Absolute and Relative Weights in neonate piglets.

	Treatment				SEM	P-value
	NBW-F	NBW-M	LBW-F	LBW-M		
Body-weight (g)	1318	1316	643	546	83.2	<0.0001
Head-weight (g)	261.0	256.0	155.0	142.0	12.8	<0.0001
Head- to Body- weight ratio	0.20	0.20	0.25	0.26	0.007	<0.0001
Brain-weight (g)	31.4	31.0	27.6	27.8	0.55	0.001
Brain- to Body-weight ratio	0.03	0.03	0.05	0.05	0.003	<0.0001
Brain- to Head-weight ratio	0.12	0.13	0.18	0.20	0.008	<0.0001

F = Female, M = Male, NBW = Normal birth weight, LBW = Low birth weight.

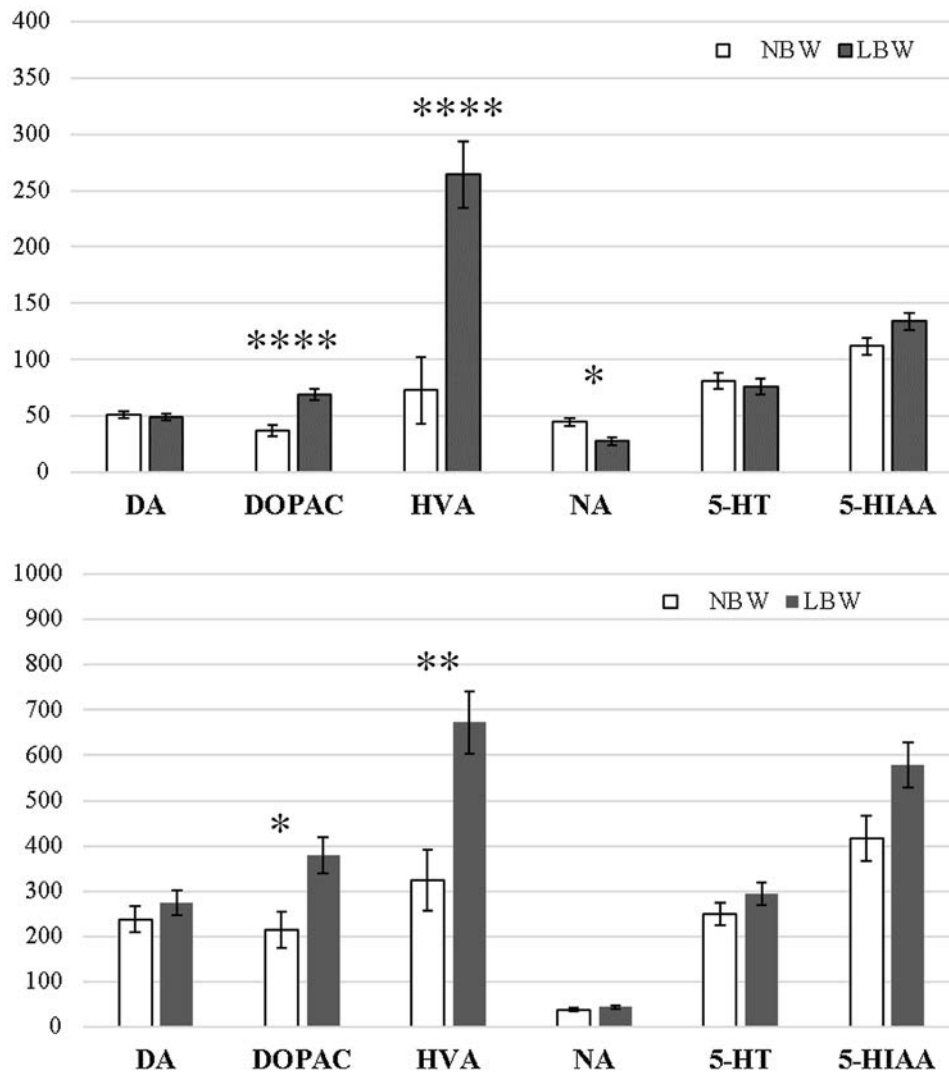


Fig. 1. Concentrations of the neurotransmitters in Normal and Low Birth-Weight neonates. Bars are the means \pm SEM of dopamine (DA), 3,4- dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), noradrenalin (NA), homovanillic acid (HVA), serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA) in ng/g of tissue sample from hippocampus (upper panel) and amygdala (lower panel) in Normal and Low Birth-Weight piglets (NBW and LBW, respectively). Asterisks indicate significant differences between groups (* = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.005$, **** = $P < 0.0005$).

the LBW group. The assessment of head and brain absolute weights showed similar differences to body-weight between experimental groups and without sex-related differences. However, the head-to-body, brain-to-head and brain-to-body weight-ratios showed significantly higher values in LBW than in NBW piglets, without any sex effect.

3.2. Effects of sex on brain level of neurotransmitters

The assessment of neurotransmitters in the hippocampus of NBW showed a significant effect of sex, with higher concentration of DA in females than in males (61.5 ± 4.5 vs 40.1 ± 4.0 ng/g; $P < 0.01$). There were neither major significant effects of sex on indoleamine neurotransmitters at the hippocampus nor in the levels of catecholamines or indoleamines at the amygdala.

3.3. Effects of IUGR on brain level of neurotransmitters and modulation by sex

Assessment of catecholamines at hippocampus showed that the levels of DA were similar between LBW and NBW neonates (Fig. 1). However, LBW piglets had lower NA concentrations ($P < 0.05$) and

higher concentrations of DOPAC and HVA ($P < 0.0005$ for both) than NBW piglets. Differences at amygdala were less evident, but DOPAC and HVA concentrations were again higher in LBW than in NBW piglets ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). There were no major significant sex effects (Fig. 2), but LBW males had higher HVA concentrations at the amygdala than NBW males ($P < 0.05$).

On the other hand, the effects of IUGR on the metabolism of indoleamines were determined by sex (Fig. 2). There were no significant differences between LBW and NBW females, but LBW males had higher 5-HIAA concentrations at the hippocampus than NBW males ($P < 0.05$).

4. Discussion

The present study indicates that IUGR in swine is related to asymmetrical growth and prioritization of brain development. However, evident alterations in concentration and metabolism of catecholamines and indoleamines at the limbic system (mainly at the hippocampus and to a lesser extent at the amygdala) may compromise adequate neural function.

There was a significant effect of sex on the NBW piglets, the piglets not affected by IUGR. The NBW females showed a higher DA

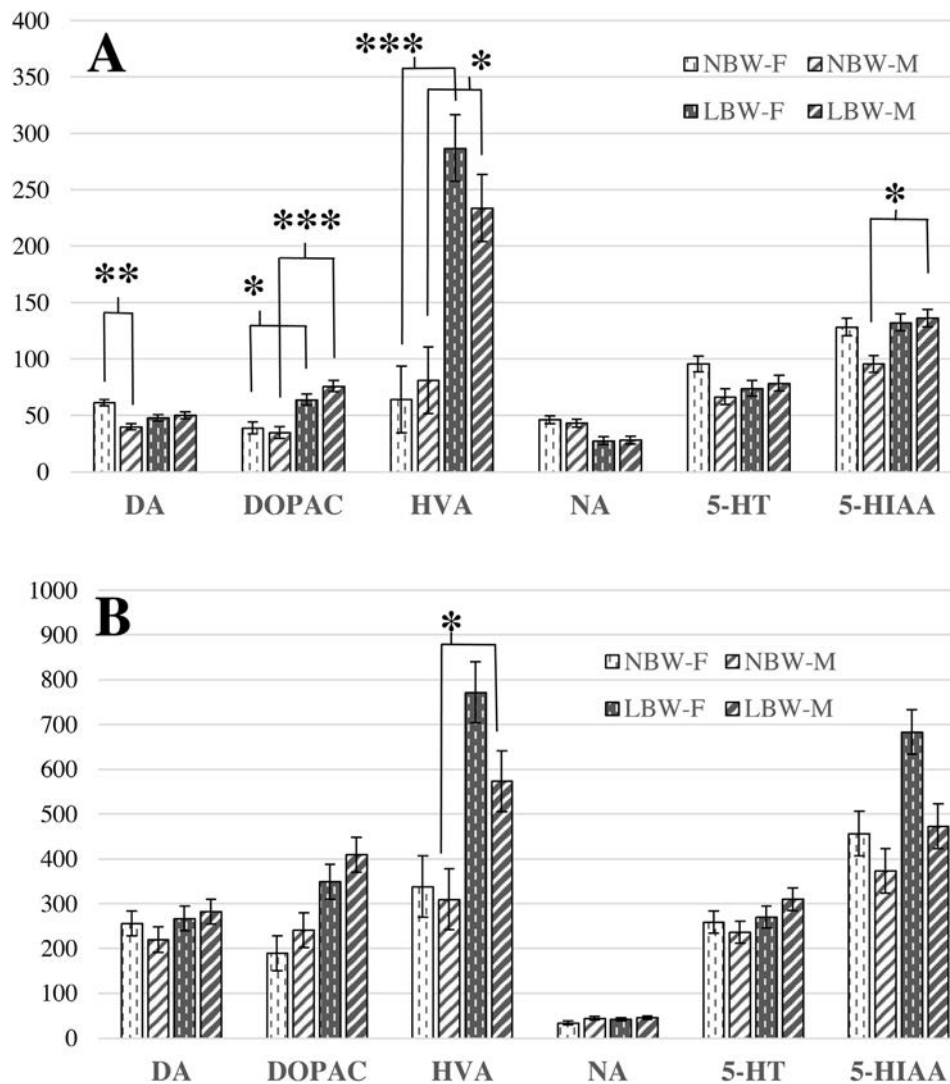


Fig. 2. Concentrations of the neurotransmitters in Normal and Low Birth-Weight female and male neonates. Bars are the means \pm SEM of dopamine (DA), 3,4- dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), noradrenalin (NA), homovanillic acid (HVA), serotonin (5-HT) and 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA) in ng/g of tissue sample from hippocampus (upper panel) and amygdala (lower panels) for Normal Birth-Weight females and males (NBW-F and NBW-M, respectively) and Lower Birth-Weight females and males (LBW-F and LBW-M, respectively). Asterisks indicate significant differences between groups (* = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.005$, **** = $P < 0.0005$).

concentration at the hippocampus than their male littermates. The release of DA, acting on many brain regions including hippocampus and amygdala, mainly influences reward-related behavior (Packard and White, 1991; Phillips et al., 2010). Hence, the higher levels of DA found in the female NBW piglets of the current study may give more data supporting a better survival and developmental traits of the female sex, as previously found in other studies (Aiken and Ozanne 2013; Moritz et al., 2010).

The study of the effects of IUGR, through assessment of the relative weights of head and brain (head-to-body, brain-to-head and brain-to-body weight-ratios), showed clearly that the brain development was preserved in LBW piglet at the expense of body development, like bones and muscles (McMillen et al., 2001; Yu and Upadhyay, 2004), leading to asymmetrical growth and prioritization of brain development. This organ is the most protected, due to the so-called 'brain-sparing effect', in which blood flow to the brain increases for assuring the development of the organ. The adequate development of the brain assures the maintenance of critical physiological functions of the neonate such as breathing, suckling and other so-called autonomic functions (Perry, 2002),

which improve vitality and survival probabilities. There were no sex-related effects on brain development in the crossbred Iberian pigs of the current study, which coincides with a previous recent study (Cogollos et al., 2016); however, in such study, the females had a higher brain development than males in the case of purebred Iberian individuals, which suggests a main role of the genotype.

Nevertheless, 'brain-sparing' does not completely guarantee normal brain development and function (Miller et al., 2016). Specifically, in humans, LBW has been found to be associated with increased incidence of mild to moderate behavioral disorders related to mobility, cognition, memory and neuropsychological dysfunctions (Bauer et al., 2003; Geva et al., 2012).

Studies in animal models have shown morphological alterations in the hippocampus of IUGR individuals affecting neurodevelopmental outcomes (Miller et al., 2016). Furthermore, IUGR has been found to be related to changes in the synthesis and metabolism of neurotransmitters (specifically again, DA). Bauer et al. (2001) showed that IUGR individuals have an increased activity of the aromatic amino acid decarboxylase (AADC), the enzyme involved in DA synthesis, which may be related to the increased AADC activity

in children with neuronal and behavioral alterations (Ernst et al., 1999). Together, these results support that IUGR may affect the limbic system, and other brain structures dependent on dopamine input, through changes in the dopaminergic system and that can have consequences in the future psychological and intellectual capacities of the individuals (Bauer et al., 2003).

In agreement with this statement, the assessment of catecholamines in the present study showed similar levels of DA at the hippocampus of LBW and NBW neonates, but significant changes in the concentrations of its metabolites. The LBW newborns evidenced lower levels of NA but higher levels of DOPAC and HVA than NBW piglets. At the amygdala, the differences were less evident, but DOPAC and HVA concentrations in LBW neonates were again higher than in NBW piglets. These effects were similar in female and male newborns, except for higher HVA concentrations at the amygdala of LBW males.

Catecholamine neurotransmitters, specifically DA, are related to adaptation to physical activity and to essential cognitive functions such as learning, memory and reward-motivated behavior (Schultz, 1999, 2007). The most significant biological effects of NA are associated with attention and responding actions to perceived danger (Bylund et al., 2014), underlying the “fight-or-flight” response. Hence, lower levels of NA in our LBW piglets might suggest a lower attention and adaptability to their environment, which may compromise survival. On the other hand, increased concentration of DOPAC and HVA of LBW neonates may indicate an increased oxidative metabolism of DA (Sulzer and Zecca, 1999) which is related to an increased oxidative stress. These processes have been identified as a main cause of dysfunction of dopaminergic neurons (Miyazaki and Asanuma, 2008) originating behavioral and neuropathological alterations (Kita et al., 2014).

With regards to indoleamines, there were no major effects of IUGR excepting that LBW males had higher concentrations of 5-HIAA at the hippocampus than NBW males. Indoleamine neurotransmitters are mainly involved in perception of food availability and management of social interactions and behavior for food acquisition (Berumen et al., 2012). Previous studies in rodents have reported significant increases of 5-HT and its metabolite 5-HIAA in individuals affected by IUGR (Chanez et al., 1981; Jensen et al., 1996; Manjarréz et al., 1996, 1988); however, a recent study in rabbits evidenced a lack of significant differences between control and IUGR individuals (Hernández-Andrade et al., 2015). We can hypothesize that divergences among studies may be related to species-specific effects, to differences in the brain structures where neurotransmitters are analyzed, to different age of the studied individuals or even to different methods to get the occurrence of IUGR.

In conclusion, the present study shows sex-related differences in DA concentration at the hippocampus of NBW neonates and addresses significant effects of IUGR on the levels and metabolism of both catecholamines and indoleamines, which set the basis for future studies addressing changes in physical activity and essential cognitive functions such as learning, memory, reward-motivated behavior and stress.

Competing interests

The authors have declared that no competing interests exist.

Authors contributions

MVG, CGC, CO, BI and AGB obtained the samples; DV, LA and AB performed the neurotransmitter measurements; MVG, AB and AGB analyzed the data; all the authors contribute to the experimental design and manuscript preparation.

Acknowledgements

The experimental work was supported by funds from the Ministry of Economy and Competitiveness (project AGL2013-48121-C3-R and AGL2011-30598-C03-02), co-funded by FEDER. MVG and CGC are supported by the Spanish Government (MVG: FPU National Program Grant Number FPU014/01285. CGC: FPI National Program Grant Number BES-2014-070464). MVG, CGC, CO and AGB are members of the EU COST-Action BM1308 “Sharing Advances on Large Animal Models (SALAAM)”.

References

- Aiken, C.E., Ozanne, S.E., 2013. Sex differences in developmental programming models. *Reproduction* 145, R1–R13.
- Anthony, R.V., Scheaffer, A.N., Wright, C.D., Regnault, T.R.H., 2003. Ruminant models of prenatal growth restriction. *Reprod. Suppl.* 61, 183–194.
- Ashworth, C.J., Finch, A.M., Page, K.R., Nwagwu, M.O., McArdle, H.J., 2001. Causes and consequences of fetal growth retardation in pigs. *Reprod. (Cambridge England) Suppl.* 58, 233–246.
- Baschat, D.A.A., 2004. Fetal responses to placental insufficiency: an update. *BJOG* 111, 1031–1041.
- Bassols, A., Costa, C., Eckersall, P.D., Osada, J., Sabrià, J., Tibau, J., 2014. The pig as an animal model for human pathologies: a proteomics perspective. *Proteom. Clin. Appl.* 8, 715–731.
- Bauer, R., Walter, B., Vorwieger, G., Bergmann, R., Fuchtnner, F., Brust, P., 2001. Intrauterine growth restriction induces up-Regulation of cerebral aromatic amino acid decarboxylase activity in newborn piglets: [18F]Fluorodopa positron emission tomographic study. *Pediatr. Res.* 49, 474–480.
- Bauer, R., Walter, B., Brust, P., Fuchtnner, F., Zwiener, U., 2003. Impact of asymmetric intrauterine growth restriction on organ function in newborn piglets. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 110 (Supplement 1), S40–S49.
- Bell, A.W., Ehrhardt, R.A., 2002. Regulation of placental nutrient transport and implications for fetal growth. *Nutr. Res. Rev.* 15, 211–230.
- Berumen, L.C., Rodríguez, A., Miledi, R., García-Alcocer, G., 2012. Serotonin receptors in hippocampus. *Sci. World J.* 2012, 15.
- Blomberg, L.A., Schreier, L.L., Guthrie, H.D., Sample, G.L., Vallet, J., Caperna, T., Ramsay, T., 2010. The effect of intrauterine growth retardation on the expression of developmental factors in porcine placenta subsequent to the initiation of placentation. *Placenta* 31, 549–552.
- Bylund, D.B., Bylund, K.C., 2014. Norepinephrine *Encyclopedia of the Neurological Sciences*, Second Ed. Academic Press, Oxford, pp. 614–616.
- Chanez, C., Priam, M., Flexor, M.-A., Hamon, M., Bourgoin, S., Kordon, C., Minkowski, A., 1981. Long lasting effects of intrauterine growth retardation on 5-HT metabolism in the brain of developing rats. *Brain Res.* 207, 397–408.
- Cogollo, L., García-Contreras, C., Vázquez-Gómez, M., Astiz, S., Sánchez-Sánchez, R., Gómez-Fidalgo, E., Ovilo, C., Isabel, B., González-Bulnes, A., 2016. Effects of fetal genotype and sex on developmental response to maternal malnutrition. *Reprod. Fertil. Dev.* (in press).
- Ernst, M., Zametkin, A.J., Matochik, J.A., Pascualvaca, D., Jons, P.H., Cohen, R.M., 1999. High midbrain [18F]DOPA accumulation in children with attention deficit hyperactivity disorder. *Am. J. Psychiatry* 156, 1209–1215.
- Foxcroft, G.R., Dixon, W.T., Novak, S., Putman, C.T., Town, S.C., Vinsky, M.D.A., 2006. The biological basis for prenatal programming of postnatal performance in pigs12. *J. Anim. Sci.* 84, E105–E112.
- Geva, R., Leitner, Y., Harel, S., 2012. Children born with intrauterine growth restriction: neurodevelopmental outcome. In: Preedy, R.V. (Ed.), *Handbook of Growth and Growth Monitoring in Health and Disease*. Springer, New York, NY, pp. 193–208.
- Ghidini, A., 1996. Idiopathic fetal growth restriction: a pathophysiologic approach. *Obstet. Gynecol. Surv.* 51, 376–382.
- González-Bulnes, A., Astiz, S., Ovilo, C., Lopez-Bote, C., Torres-Rovira, L., Barbero, A., Ayuso, M., García-Contreras, C., Vázquez-Gómez, M., 2016. Developmental Origins of Health and Disease in swine: implications for animal production and biomedical research. *Theriogenology* 86, 110–119.
- Gootman, P.M., 1986. *Developmental Neurobiology of the Autonomic Nervous System*. Springer Science & Business Media.
- Hernández-Andrade, E., Cortés-Camberos, A.J., Díaz, N.F., Flores-Herrera, H., García-López, G., González-Jiménez, M., Santamaría, A., Molina-Hernández, A., 2015. Altered levels of brain neurotransmitter from new born rabbits with intrauterine restriction. *Neurosci. Lett.* 584, 60–65.
- Jensen, G.M., Moore, L.G., 1997. The effect of high altitude and other risk factors on birthweight: independent or interactive effects? *Am. J. Public Health* 87, 1003–1007.
- Jensen, A., Klonne, H., Detmer, A., Carter, A., 1996. Catecholamine and serotonin concentrations in fetal guinea-pig brain: relation to regional cerebral blood flow and oxygen delivery in the growth-restricted fetus *Reproduction. Fertil. Dev.* 8, 355–364.
- Keyes, L.E., Armaza, J.F., Niermeyer, S., Vargas, E., Young, D.A., Moore, L.G., 2003. Intrauterine growth restriction, preeclampsia, and intrauterine mortality at high altitude in Bolivia. *Pediatr. Res.* 54, 20–25.

- Kita, T., Asanuma, M., Miyazaki, I., Takeshima, M., 2014. Protective effects of phytochemical antioxidants against neurotoxin-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J. Pharmacol. Sci.* 124, 313–319.
- Krebs, C., Macara, L.M., Leiser, R., Bowman, A.W., Greer, I.A., Kingdom, J.C.P., 1996. Intrauterine growth restriction with absent end-diastolic flow velocity in the umbilical artery is associated with maldevelopment of the placental terminal villous tree. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 175, 1534–1542.
- Lind, N.M., Moustgaard, A., Jelsing, J., Vajta, G., Cumming, P., Hansen, A.K., 2007. The use of pigs in neuroscience: modeling brain disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 31, 728–751.
- Manjarréz, G., Chagoya, G., Hernández, J., 1988. Perinatal brain serotonin metabolism in rats malnourished in utero. *Neonatology* 54, 232–240.
- Manjarrez, G.G., Magdaleno, V.M., Chagoya, G., Hernández-r, J., 1996. Nutritional recovery does not reverse the activation of brain serotonin synthesis in the ontogenetically malnourished rat. *Int. J. Dev. Neurosci.* 14, 641–648.
- McMillen, I.C., Adams, M.B., Ross, J.T., Coulter, C.L., Simonetta, G., Owens, J.A., Robinson, J.S., Edwards, L.J., 2001. Fetal growth restriction: adaptations and consequences. *Reproduction* 122, 195–204.
- Miller, S.L., Huppi, P.S., Mallard, C., 2016. The consequences of fetal growth restriction on brain structure and neurodevelopmental outcome. *J. Physiol.* 594, 807–823.
- Miyazaki, I., Asanuma, M., 2008. Dopaminergic neuron-specific oxidative stress caused by dopamine itself. *Acta Med. Okayama* 62, 141–150 (Japan).
- Moore, L.G., Niermeyer, S., Zamudio, S., 1998. Human adaptation to high altitude: regional and life-cycle perspectives. *Am. J. Phys. Anthropol.* 107, 25–64.
- Moritz, K.M., Cuffe, J.S.M., Wilson, L.B., Dickinson, H., Wlodek, M.E., Simmons, D.G., Denton, K.M., 2010. Review Sex specific programming: a critical role for the renal renin-angiotensin system. *Placenta* 31 (Supplement), S40–S46.
- Mortola, J.P., Frappell, P.B., Aguero, L., Armstrong, K., 2000. Birth weight and altitude: a study in Peruvian communities. *J. Pediatr.* 136, 324–329.
- Packard, M.G., White, N.M., 1991. Dissociation of hippocampus and caudate nucleus memory systems by posttraining intracerebral injection of dopamine agonists. *Behav. Neurosci.* 105, 295.
- Palmiter, R.D., 2007. Is dopamine a physiologically relevant mediator of feeding behavior? *Trends Neurosci.* 30, 375–381.
- Perry, B.D., 2002. Childhood experience and the expression of genetic potential: what childhood neglect tells us about nature and nurture. *Brain Mind* 3, 79–100.
- Phillips, G.D., Salussolia, E., Hitchcott, P.K., 2010. Role of the mesoamygdaloid dopamine projection in emotional learning. *Psychopharmacology (Berl)* 210, 303–316.
- Schultz, W., 1999. The reward signal of midbrain dopamine neurons. *Physiology* 14, 249–255.
- Schultz, W., 2007. Multiple dopamine functions at different time courses. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 259–288.
- Sulzer, D., Zecca, L., 1999. Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: a review. *Neurotox. Res.* 1, 181–195.
- Wu, G., Bazer, F.W., Cudd, T.A., Meininger, C.J., Spencer, T.E., 2004. Maternal nutrition and fetal development. *J. Nutr.* 134, 2169–2172.
- Wu, G., Bazer, F., Wallace, J., Spencer, T., 2006. Board-invited review: intrauterine growth retardation: implications for the animal sciences. *J. Anim. Sci.* 84, 2316–2337.
- Yu, V.Y.H., Upadhyay, A., 2004. Neonatal management of the growth-restricted infant. *Semin. Fetal Neonatal. Med.* 9, 403–409.