EFECTOS DE LA BETAÍNA Y EL CLA SOBRE EL METABOLISMO HEPÁTICO EN CULTIVOS PRIMARIOS DE HEPATOCITOS PORCINOS

Rojas Cano, M.L., Lachica, M. y Fernández-Fígares, I.
Instituto de Nutrición Animal, Estación Experimental del Zaidín, CSIC, Camino del Jueves s/n, Armillla, 18100 Granada. E-mail: ifigares@eez.csic.es

INTRODUCCIÓN

La betaína y el ácido linoleico conjugado (CLA) tienen el potencial de alterar el crecimiento y la composición corporal en cerdos (Fernández-Fígares et al., 2002, 2008). Sin embargo, los posibles mecanismos mediante los que la betaína y el CLA actúan sobre el crecimiento del animal y la composición de la canal son todavía desconocidos. Además, se sabe relativamente poco sobre cómo la betaína y el CLA afectan al metabolismo hepático.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los hepatocitos se aislaron de cinco cerdos Ibéricos puros (17-22 kg PV). Se alimentaron de forma restringida (85% *ad libitum*) hasta el día antes del aislamiento de las células. Tras el sacrificio, a partir del lóbulo lateral izquierdo del hígado se aislaron los hepatocitos (Fernández-Fígares et al., 2004). Los hepatocitos se sembraron ($4,5 \times 10^6$) en matraces T-25 permeables al aire (Fernández-Fígares et al., 2012). Tras un periodo de adhesión de 3 h, los matraces fueron lavados dos veces con suero salino tamponado con HEPES y a continuación se añadió el medio basal suplementado con 5% de suero fetal bovino. Al día siguiente, los matraces se lavaron dos veces con suero salino tamponado con HEPES y el medio se sustituyó por medio basal sin suero, suplementado con dexametasona (1 nM), dimetil sulfóxido (0,1 mg/l), L-carnitina (1 mM), Na_2SeO_3 (100 nM), insulina (1 y 100 ng/ml), glucagón (1 y 100 ng/ml) y c9,t11-C18:2 (c9,t11-CLA; 0 o 100 µM) o t10,c12-C18:2 (t10,c12-CLA; 0 o 100 µM) o c9,c12-C18:2 (LA, 0 o 100 µM) y betaína (0 o 1 mM), cultivándose durante 24 h. Se usaron tres matraces para cada condición de cultivo.

Para su adición al medio, los ácidos grasos se acomplejaron con albúmina siendo la relación molar ácido graso/albúmina menor de 3. Las células se cultivaron durante 24 h con distintos niveles de insulina y glucagón y los isómeros individuales del CLA o del ácido linoleico (LA) adicionando o no betaína. Transcurrido este tiempo se recogió el medio de cultivo en el que se determinó enzimáticamente colesterol, triglicéridos, urea y lactato utilizando un analizador de parámetros bioquímicos Cobas Integra 400. Las células se recogieron para determinar la proteína en los homogeneizados mediante el procedimiento de Lowry. Todos los datos fueron normalizados con el contenido en proteína del cultivo.

Los datos se analizaron con el modelo mixto del SAS usando el cerdo como factor al azar. El diseño fue de bloques al azar en el que los cerdos eran los bloques.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 1. En vertebrados, la mayor parte del colesterol es sintetizado en el hígado, siendo una pequeña parte incorporada en las membranas de los hepatocitos y el resto exportado. Ni el tipo de ácido graso ni la betaína tuvieron efecto ($P>0,10$) sobre la síntesis de colesterol en nuestros experimentos. Sin embargo, en cerdos Ibéricos alimentados con dietas suplementadas con CLA, el colesterol sérico total aumentó (Fernández-Fígares et al., 2012) aunque la betaína no tuvo efecto alguno. En la línea celular HepG2 , t10,c12-CLA y c9,t11-CLA aumentaron el colesterol libre en las células respecto al control sin ácidos grasos añadidos (Viswanadha et al., 2008).

No encontramos un efecto del tipo de ácido graso sobre la exportación de triglicéridos hepática ($P>0,10$). Conde-Aguilera et al. (2012) tampoco encontraron un efecto medible de una mezcla de isómeros del CLA sobre el contenido de triglicéridos en hepatocitos porcinos, contrariamente al aumento de los mismos producido por el t10,c12-CLA en hepatocitos bovinos (Mashek y Grummer, 2004). *In vivo*, sin embargo, los triglicéridos séricos aumentaron en cerdos Ibéricos alimentados con dietas suplementadas con CLA (Fernández-Fígares et al., 2012), sin efecto significativo en cerdos alimentados con betaína. La betaína produjo una disminución (27%, $P<0,001$) de la exportación de triglicéridos en hígado independientemente del ácido graso presente.

El lactato es un precursor de la glucosa vía gluconeogénesis, produciéndose a partir del lactato en la fermentación anaerobia de la glucosa. Aunque la betaína no afectó a la síntesis de lactato, ambos isómeros del CLA disminuyeron (15%, P<0,001) la misma. Esto es compatible con la disminución de la gluconeogénesis en hepatocitos porcinos cultivados con una mezcla de isómeros del CLA (Conde-Aguilera et al., 2012) pero contrasta con la falta de efecto del CLA en la gluconeogénesis en hepatocitos bovinos (Mashek y Grummer, 2004) y con el aumento de glucosa metabolizada hasta lactato en hepatocitos de rata (Pérez-Matute et al., 2007).

El hígado es el principal órgano encargado del catabolismo nitrogenado, sintetizando urea a partir del amonio producido. La adición de betaína produjo un efecto inhibidor de la producción basal de urea (11%, P<0,01) al igual que los ácidos grasos c9,t11-CLA y t10,c12-CLA (10 y 19%, respectivamente; P<0,01). Este efecto también se encontró en cerdos Ibéricos alimentados con dietas suplementadas con betaína y/o CLA, observándose una menor cantidad de urea sérica que en el grupo control (Fernández-Fígares et al., 2012). Parece producirse un efecto beneficioso tanto del CLA como de la betaína sobre el metabolismo de los aminoácidos presentes en el medio.

Nuestras observaciones muestran que la betaína y el CLA tienen un impacto a nivel hepático en el metabolismo proteico y energético del cerdo. Así, la betaína disminuyó la síntesis de triglicéridos hepáticos y la producción basal de urea, y el CLA el uso anaeróbico de la glucosa y la producción basal de urea. Una menor producción de urea puede ser debido a un uso más eficiente de la proteína, y una menor producción de lactato es compatible con una mayor sensibilidad a la insulina. Es necesario un mejor conocimiento de los mecanismos de acción de la betaína y el CLA para hacer un uso racional de los mismos en nutrición animal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Conde-Aguilera, J. A., Lachica, M., Nieto, R. & Fernández-Fígares, I. 2012. Metabolic regulation of fatty acid esterification and effects of CLA on glucose homeostasis in pig hepatocytes. Animal 6: 254-261.

Fernández-Fígares, I., Conde-Aguilera, J. A., Nieto, R., Lachica, M. & Aguilera, J. F. 2008. Synergistic effects of betaine and conjugated linoleic acid on growth and carcass composition of growing Iberian pigs. J. Anim. Sci. 86: 102-111.

Fernández-Fígares, I., Lachica, M., Martín, A., Nieto, R., González-Valero, L., Rodríguez-López, J.M. & Aguilera, J. F. 2012. Impact of dietary betaine and CLA on insulin sensitivity, protein and fat metabolism of obese pig. Animal 6: 1058-1067.

Fernández-Figares, I., Shannon, A.E., Wray-Cahen, D., & Caperna, T.J. 2004. The role of insulin, glucagon, dexamethasone and leptin in the regulation of ketogenesis and glycogen storage in primary cultures of porcine hepatocytes prepared from growing pigs. Domest. Anim. Endocrin. 27:125-140.

Fernández-Fígares, I., Wray-Cahen, D., Steele, N. C., Campbell, R. G., Hall, D. D., Virtanen, E. & Caperna, T. J. 2002. Effect of dietary betaine on energy utilization and partitioning in the young growing feed restricted pig. J. Anim. Sci. 80: 421-428.

Mashek, D. G. & Grummer, R. R. 2004. Effects of conjugated linoleic acid isomers on lipid metabolism and gluconeogenesis in monolayer cultures of bovine hepatocytes. J. Dairy Sci. 87: 67-72.

Pérez-Matute, P., Marti, A., Martínez, J. A., Fernández-Otero, M. P., Stanhope, K. L., Havel, P. J. & Moreno-Aliaga, M. J. 2007. Conjugated linoleic acid inhibits glucose metabolism, leptin and adiponectin secretion in primary cultured rat adipocytes. Mol. Cell. Endocrinol. 30: 50-58.

Viswanadha, S., Mcgilliard, M. L., Gandour, R. D. & Herbein, J. H. 2008. Alterations in CPT-1 mRNA and fatty acid profile in hepatic cell lines in response to treatment with *t*10,*c*12- or *c*9,*t*11-conjugated linoleic acid. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 110: 16-22.

Agradecimientos: Los autores agradecen el asesoramiento estadístico realizado por el Dr. L. Lara. Los análisis bioquímicos fueron realizados por el Laboratorio de Técnicas Instrumentales, Universidad de León. Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2009-08916, Ministerio de Economía y Competitividad.

Tabla 1. *Producción de colesterol, triglicéridos, lactato y urea en el medio de hepatocitos porcinos cultivados en presencia de ácidos grasos -ácido linoleico (LA) o ácido linoleico conjugado (CLA)-, distintos niveles de insulina y glucagón, y betaína.*

	Colesterol µmol/mg prot	Triglicéridos µg/mg prot	Lactato mmol/mg prot	Urea µg/mg prot
LA	58[a]	660[a]	2,42[a]	129[a]
LA+Betaína	55[a]	470[b]	2,27[a]	115[b]
CLA9,11	51[a]	650[a]	2,12[ad]	115[b]
CLA9,11+Betaína	50[a]	490[b]	2,13[ad]	113[b]
CLA10,12	57[a]	640[a]	1,99[bcd]	104[b]
CLA10,12+Betaína	49[a]	455[b]	2,07[bc]	112[b]
Error estándar	4,0	14	0,055	4,3

[abcd]Para las comparaciones realizadas, valores dentro de la misma columna con distinto superíndice son significativamente diferentes (P<0,05).

EFFECT OF BETAINE AND CLA ON METABOLISM OF PORCINE HEPATOCYTES

ABSTRACT: Betaine and CLA have the potential to improve growth parameters and reduce body fat in pigs. To determine possible mechanisms of action that might explain their nutrient partitioning effect, hepatocytes were isolated from piglets (n=5; 20 kg BW) by collagenase perfusion and seeded into T-25 flasks. Monolayers were established in medium containing fetal bovine serum for 1 d and switched to a serum-free medium for the remainder of the culture period. Hepatocytes were maintained in William's E amended with β-mercaptoethanol (0.1 mM), antibiotics (gentamicin, penicillin, streptomycin and amphotericin-B), DMSO (0.1 mg/L), dexamethasone (10^{-9} M), insulin (1 and 100 ng/mL), glucagon (0 and 100 ng/mL), betaine (0 and 1 mM) and albumin (bound fatty acids (c9,t11-C18:2, t10,c12-C18:2 or c9,c12-C18:2; 0 and 100 µM)) for 24 h. Media was collected for cholesterol, triglycerides, lactate and urea determination and cells harvested for protein analysis. CLA addition decreased lactate and urea production (15%, 0.001<P<0.01) with no effect on cholesterol and triglycerides production (P>0.10). Similarly, betaine decreased urea production (11%, P<0.01) and triglycerides concentration in the media (27%, P<0.001). These results indicate that betaine and CLA have a beneficial effect in the pig liver decreasing triglyceride export, lowering lactate production and improving amino acid utilization.

Keywords*:* betaine, CLA, hepatocytes, pig.