



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**  
**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**PARTICIPACIÓN DEL ACIDO PROPIÓNICO EN EL METABOLISMO Y  
PRODUCTIVIDAD DE CORDEROS EN ENGORDA**

**Por:**

**Rubén Oswaldo Cifuentes López**

**Tesis Presentada como Requisito para la Obtención del Grado de Doctor en  
Ciencias Agropecuarias**

**Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.**

**Septiembre 2018**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**  
**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**



**PARTICIPACIÓN DEL ACIDO PROPIÓNICO EN EL METABOLISMO Y**  
**PRODUCTIVIDAD DE CORDEROS EN ENGORDA**

**Por:**  
**Rubén Oswaldo Cifuentes López**

**Tesis Presentada como Requisito para la Obtención del Grado de**  
**Doctor en Ciencias Agropecuarias**

**Director**  
**Dr. Héctor Aarón Lee Rangel**

**Co-Director**  
**Dr. Juan Manuel Pinos Rodríguez**

**Asesores**  
**Dr. German David Mendoza Martínez**  
**Dr. Alejandro E. Relling**

**Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P.**

**Septiembre 2018**

## PÁGINA DE APROBACIÓN DE TESIS

El trabajo titulado “**Participación del ácido propiónico en el metabolismo y productividad de corderos en engorda**” fue realizada por **Rubén Oswaldo Cifuentes López**, como requisito parcial para obtener el grado de Doctor Ciencias Agropecuarias, fue revisado y aprobado por el suscrito comité de tesis.

**Dr. Héctor Aarón Lee Rangel**

**Director**



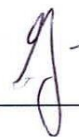
**Dr. Juan Manuel Pinos Rodríguez**

**Co-Director**



**Dr. German David Mendoza Martínez**

**Asesor**



**Dr. Alejandro E. Relling**

**Asesor**



**Dra. Camelia Alejandra Herrera Corredor**

**Sinodal**



**Ejido Palma de la Cruz, Municipio de Soledad de Graciano Sánchez, S.L.P. a 6 de Septiembre de 2018**

## **DEDICATORIA**

### **A MI ESPOSA E HIJA**

Hazel Barrón Figueroa y Regina Cifuentes Barrón.

Son todo para mí y sin ellas no tendría la fuerza para seguir adelante, las amo.

### **A MIS PADRES**

Rubén Cifuentes de Luna y María Elvira López Loredó.

Gracias por darme la vida y encaminarme para superarme.

### **A LA MEMORIA DE MIS ABUELOS**

Raymundo López Flores y Tomasa Loredó Gutiérrez, de quienes aprendí el amor por el campo y los animales.

### **A MI ABUELA**

María de Luna Reyes, un ejemplo de fuerza para sacar a sus hijos adelante

### **A MIS HERMANOS**

Ulises Emanuel Cifuentes López.

Elvia Lucía Cifuentes López.

Francisco Rafael Cifuentes López.

Juan Ángel Cifuentes López, por su apoyo incondicional, espero servirles de ejemplo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, (UASLP), la máxima casa de estudios.

A la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UASLP, por permitirme aprender todos estos años dentro de sus espacios.

Al Dr. Héctor Aarón Lee Rangel, por tenerme paciencia como un aprendiz de investigador, gracias por todo Doc.

Al Dr. Juan Manuel Pinos Rodríguez, por sus enseñanzas.

Al Dr. Germán David Mendoza Martínez, por formar parte de mi comité tutorial.

Al Dr. Alejandro E. Relling, por ser parte de mi comité tutorial.

A la Dra. Camelia Alejandra Herrera Corredor, por su participación como sinodal.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgando con la beca número 374697.

Al Fondo de Apoyo a la Investigación (FAI), por el financiamiento parcial de este proyecto C18- FAI-05-34.34.

A mis compañeros de Maestría y Doctorado, Jorge Adalberto Cayetano de Jesús, Carlos Antonio Gómez Flores, José Alejandro Roque Jiménez y Mario Francisco Oviedo Ojeda.

## ÍNDICE

PÁGINA DE APROBACIÓN .....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ÍNDICE.....	iv
RESUMEN.....	vii
SUMMARY.....	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
Hipótesis.....	2
Objetivos .....	3
CAPITULO 1. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
1.1 Antecedentes.....	4
1.2 Fermentación ruminal.....	4
1.3 El ácido propiónico.....	5
1.4 Síntesis del propionato a nivel ruminal.....	6
1.5 Absorción de propionato a nivel ruminal.....	7
1.6 Gluconeogénesis hepática.....	7
1.7 Propionato de calcio.....	8
1.8 Regulación del consumo de alimento.....	9
1.9 El nervio vago.....	11
1.10 Hipotálamo.....	11
1.11 Neurotransmisores.....	12
1.11.1 Neuropéptido ( NPY).....	12
1.11.2 Péptido relacionado al agouti (AgRP).....	13
1.11.3 Pro opio melanocortina (POMC).....	13
1.12 Hormonas.....	14
1.12.1 Insulina.....	14
1.12.2 GLP-I.....	15
1.13 Metabolitos.....	17

1.13.1. Glucosa y propionato.....	17
1.14 LITERATURA CITADA .....	19
CAPITULO II. EFECTO DEL PROPIONATO DE CALCIO EN EL PESO VIVO, CONSUMO Y CANAL DE CORDEROS ALIMENTADOS CON HENO DE ALFALFA ( <i>Medicago sativa</i> ).....	24
2.1 Resumen.....	24
2.2 Introducción.....	25
2.3 Materiales y Métodos .....	26
2.4 Resultados y Discusión.....	28
2.5 Conclusiones.....	32
2.6 Agradecimientos .....	32
2.7 Literatura citada .....	32
CAPITULO III. EFFECTS OF DIETARY CALCIUM PROPIONATE ON HYPOTHALAMIC NEUROPEPTIDE MESSENGER RNA EXPRESSION AND PERFORMANCE IN FINISHING LAMBS.....	36
3.1 Abstract .....	36
3.2 Introduction.....	37
3.3 Material and Methods.....	39
3.3.1 Animal and diets.....	39
3.3.2 Feed analysis.....	40
3.3.3 Growth assay.....	40
3.3.4 Rumen fermentation.....	40
3.3.5 Analytic methods for insulin and glucose.....	41
3.3.6 Gene expression analysis .....	41
3.3.7 Statistical analyses.....	42
3.4 Results and Discussion.....	42
3.4.1 Animal performance.....	42
3.4.2 Rumen fermentation.....	43
3.4.3 Plasma glucose and insulin concentration.....	44
3.4.4 NPY, AgRP and POMC expression.....	44
3.5 Conclusions.....	46

3.6 Acknowledgments.....	46
3.7 References.....	46
CAPITULO 4. CONCLUSIÓN GENERAL.....	57



## RESUMEN

El objetivo de este experimento fue evaluar el efecto de la alimentación con diferentes concentraciones de propionato de calcio en la productividad, fermentación ruminal, glucosa e insulina plasmáticas y la expresión de ARNm hipotalámico para el neuropéptido Y (NPY), el péptido relacionado con el agutí (AgRP) y la proopiomelanocortin (POMC). Treinta y dos corderos machos enteros raza Rambouillet (PI 27,4 kg  $\pm$  4,7 kg) fueron asignados aleatoriamente a uno de los siguientes tratamientos: 1) Control (CONT), una dieta basal que contiene 93% de heno de alfalfa y 7% de melaza (base seca); 2) Propionato de calcio bajo (PCB), inclusión de 30 g/kg de materia seca (MS) en la dieta de control; 3) Propionato de calcio medio (MCP), inclusión de 35 g/kg de MS en la dieta de control; y 4) Propionato de calcio alto (CPA), inclusión de 40 g/kg MS en la dieta. Al final del experimento los corderos fueron sacrificados y el hipotálamo fue removido para evaluar la concentración de RNAm mediante rtPCR usando  $\beta$ -actin como housekeeping. La ingesta de alimento, la ganancia diaria y la conversión alimenticia no se vieron afectadas ( $P > 0.05$ ) por la inclusión del propionato de calcio en la dieta. Las dietas con propionato de calcio aumentaron la conformación de la canal y el área de longissimus dorsi, disminuyeron el estado de engrasamiento de la canal, la grasa dorsal y perirrenal y el pH de la carne en comparación con el control ( $p \leq 0.05$ ). La concentración ruminal de ácidos grasos volátiles totales (AGV) aumentó linealmente ( $P < 0.05$ ) a medida que el propionato de calcio aumentó en la dieta. La concentración hipotalámica de ARNm de NPY presenta un efecto cuadrático ( $P < 0.05$ ). El propionato de calcio no afectó a AgRP y POMC mRNA ( $P > 0.05$ ). En conclusión, el propionato de calcio dietético no mejoró el rendimiento del cordero y no se relacionó con la regulación de la ingesta a través de la expresión génica hipotalámica del neuropéptido Y.

*Palabras clave:* Corderos, consumo de alimento, metabolismo, productividad, NPY, AgRP, POMC

## SUMMARY

The objective of this experiment was to evaluate the effects of feeding different concentration of dietary calcium propionate on lamb performance, ruminal fermentation, blood glucose and insulin and hypothalamic mRNA expression for neuropeptide Y (NPY), agouti-related peptide (AgRP) and proopiomelanocortin (POMC). Thirty-two Rambouillet sheep (initial body weight 27.4 kg  $\pm$  4.7 kg) were randomly assigned to one of the following treatments: 1) Control (CONT), a basal diet containing 93% alfalfa hay and 7% molasses (dry matter basis); 2) Low calcium propionate (LCP), inclusion of 30 g/kg dry matter (DM) in control diet; 3) Medium calcium propionate (MCP), inclusion of 35 g/kg DM in control diet; and 4) High calcium propionate (HCP), inclusion of 40 g/kg DM in control diet. At the end of the experiment, lambs were slaughtered and the hypothalamus was removed to evaluate mRNA concentration by quantitative rtPCR analyses using  $\beta$  actin as a housekeeping gene. Feed intake, daily gain and feed conversion were not affected ( $P>0.05$ ) by calcium propionate dietary inclusion. Diets with calcium propionate increased the carcass conformation, and *longissimus dorsi* area, decreased carcass fattening, dorsal and perirenal fat and, pH meat compared to the control ( $p \leq 0.05$ ). Total volatile fatty acids (VFA) ruminal concentration increased linearly ( $P<0.05$ ) as calcium propionate increased in diet. Hypothalamic mRNA concentration of NPY present a quadratic effect ( $P<0.05$ ). The calcium propionate did not affect AgRP and POMC mRNA ( $P>0.05$ ). In conclusion, dietary calcium propionate did not improve lamb performance and was not related with intake regulation through the hypothalamic gene expression of neuropeptide Y.

*Key words:* lambs, dry matter intake, growth performance, metabolism , NPY, AgRP, POMC.

## INTRODUCCIÓN

Para lograr un incremento significativo en la producción animal se ha tenido que recurrir a la alimentación de los mismos con granos de cereales y leguminosas de alto valor biológico, por lo anterior los rumiantes se han convertido en un competidor por fuente de alimento no solo con los animales no rumiantes si no también con los humanos (Wilkinson y Lee, 2017). Por lo anterior la utilización de alternativas que ayuden a aminorar la utilización de estos productos destinados al consumo humano pero que además aporten nutrientes de calidad a los rumiantes es imprescindible (Meléndez *et al.*, 2018).

Dichas alternativas se han centrado en la utilización de fuentes de nitrógeno no proteico (NNP) (Huber *et al.*, 2018) que actúe como fuente de proteína, y el uso de precursores gluconeogénicos como el glicerol, propilen glicol, propionato de calcio y propionato de sodio (Porcu *et al.*, 2018).

El consumo de alimento es un proceso crítico para el crecimiento y reproducción de los mamíferos. Éste presenta numerosas alteraciones debido a las complejas interacciones tales como disponibilidad y calidad del alimento, concentraciones de hormonas y metabolitos circulantes, así como respuestas físicas del tracto gastrointestinal, todas estas integradas por el sistema nervioso central (SNC). Además, existen diferencias fundamentales entre las diversas especies (rumiantes y no rumiantes), donde los nutrientes están disponibles de manera intermitente (Sartin *et al.*, 2011).

Las hormonas también son importantes en la producción de rumiantes al ser responsables de regular el consumo de materia seca (CMS) y participar en la redistribución de la energía. Cabe destacar que a pesar de que las hormonas se descubrieron a comienzos de 1900, no fue hasta los 60`s donde se comenzó a estudiar su importancia en el metabolismo. En esa misma época se estableció en rumiantes que la regulación del consumo dependía de la digestibilidad de los alimentos, mientras que cuando la digestibilidad superaba el 67% dependía de factores químicos. Los factores

químicos son metabolitos como la glucosa y los ácidos grasos, acético y propiónico. Sin embargo, la generación de nuevos conocimientos ha demostrado que el consumo también se encuentra regulado por hormonas y factores periféricos (Van Soest, 1994).

Los neuropéptido Y (NPY), péptido relacionado al agouti (AgRP) y pro-opio melanocortina (POMC) ha sido descritos como un estimuladores centrales del comportamiento alimenticio, debido a la interacción con otras hormonas y neuroreguladores que juegan diferentes papeles en la regulación del peso vivo (Tatemoto, 2008). Se teoriza que la regulación directa del consumo de alimento es mediada por metabolitos y hormonas que llegan al hipotálamo y producen cambios en la expresión génica o en la secreción de neuropéptidos encargados de regular el apetito (Matthews *et al.*, 2017).

Los metabolitos que se han encontrado que tienen efecto en el hipotálamo son la glucosa en no rumiantes (Oresanya *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2009) y el ácido propiónico en rumiantes (Allen *et al.*, 2009). Estos metabolitos producto de la hidrólisis de carbohidratos y fermentación ruminal y son oxidados en el hígado y producen la disminución de la secreción o inhibición los neurotransmisores (Sartin *et al.*, 2011).

La eficiencia de producción en los animales está directamente relacionada con la calidad y el consumo de materia seca (CMS). De ambos depende la partición de los metabolitos obtenidos en la dieta. La comprensión de los mecanismos de regulación nos permitirá aumentar y predecir el CMS, y por lo tanto modificar la eficiencia de producción. La importancia de conocer cómo se regula la partición de dichos metabolitos radica en comprender cómo el organismo los aprovecha y de este modo permitir una producción más eficiente.

## **Hipótesis**

A niveles crecientes de ácido propiónico en la dieta el consumo voluntario de alimento disminuirá debido a una menor expresión de los genes NPY y AgRP y una mayor expresión del gen POMC.

## **Objetivos**

General. Determinar la concentración de ácido propiónico que se pueda agregar a dietas basadas en forraje para regular el consumo de alimento evitando efectos negativos en la productividad.

Específico 1: Evaluar el efecto del ácido propiónico en la productividad.

Específico 2: Evaluar el efecto del ácido propiónico en las variables metabólicas.

## CAPITULO I. REVISIÓN DE LITERATURA E INTRODUCCIÓN

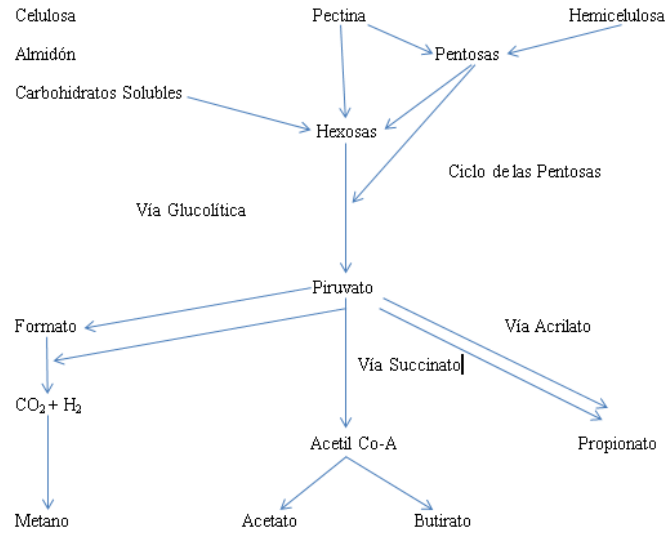
### 1.1 Antecedentes

Cuando hablamos del ácido propiónico y su participación en el metabolismo de los corderos debemos entender aspectos importantes, desde cómo se sintetiza y absorbe hasta los mecanismos fisiológicos a los que se encuentra ligados, como lo es la gluconeogénesis hepática para la obtención de la energía (Aschenbach *et al.*, 2010). Además, de participar en la regulación del consumo de alimento (Allen, 2003).

### 1.2 Fermentación ruminal

Los ácidos grasos volátiles (AGV) son principalmente; acetato, propionato y butirato, pero también se producen cantidades menores de valerato, caproato, isobutirato, isovalerato, 2 –metilbutirato y ácido láctico, como metabolitos finales de la fermentación microbiana. En el proceso de la fermentación la energía es conservada en forma de adenosin trifosfato y subsecuentemente es utilizada para el mantenimiento y crecimiento de dichas poblaciones. Para los microorganismos los AGV son considerados productos de desecho sin embargo para el rumiante representan la mayor fuente de energía, hasta un 80% es absorbida en rumen (Baanink, 2006).

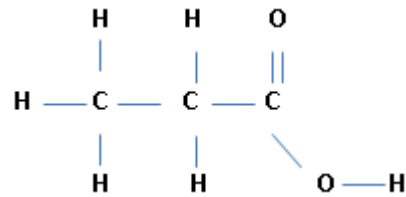
Los carbohidratos de la dieta, tales como la celulosa, hemicelulosa, pectina, almidón y azúcares solubles son los principales substratos fermentables. Son degradados a hexosas y pentosas antes de ser fermentados en AGV via Piruvato. Las pentosas son transformadas en hexosas y triosas fosfato por transcetolasas y transaldolasas en el ciclo de las pentosas, así; la mayoría del metabolismo de los carbohidratos se realiza vía hexosas, que son metabolizadas en piruvato por la vía glucolítica (Embden-Meyerhof). La acetil Co-A es un intermediario en la formación de acetato y butirato que proviene del Piruvato, la formación de propionato ocurre principalmente vía succinato, sin embargo una ruta alternativa se da vía acrilato (Dijkstra y France, 2005).



**Figura 1. Síntesis de AGV a nivel Ruminal, adaptado de (Dijkstra y France, 2005).**

### 1.3 El Ácido Propiónico

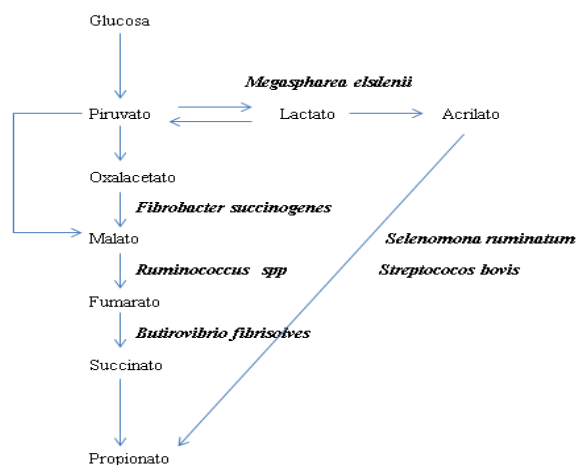
El ácido propiónico (AP) o como comúnmente se le denomina por la su forma de ión disociado, propionato; es un ácido graso volátil de 3 carbonos y su fórmula es:  $C_3H_6O_2$ . Que representada estructuralmente encuentra en la forma siguiente:



**Figura 2. Estructura Molecular de Ácido Propiónico (Church, 1993).**

## 1.4 Síntesis del propionato a nivel ruminal

La síntesis a nivel ruminal es muy importante ya que la mayoría de la Glucosa (Energía) que requiere un rumiante se obtiene a través del ácido propiónico, hasta el 62% (Aschenbach *et al.*, 2010). Dicha síntesis se da por medio del metabolismo ruminal del piruvato que se obtiene de la fermentación de la glucosa (Glucólisis anaerobia) y se lleva a cabo por microorganismos (MO) del rumen (Orskov, 2012), de esta manera el ácido propiónico se puede obtener mediante 3 vías; 1) Producción de lactato por MO productores del lactato (aunque los MO fermentadores pueden sintetizar piruvato nuevamente), el lactato producido es transformado a Acrilato y con este más la incorporación de dos hidrógenos (H) los MO Fermentadores de carbohidratos y azúcares simples producen ácido propiónico. 2) A través del oxalacetato el cual es sintetizado a partir de piruvato por los MO fermentadores de carbohidratos y azúcares solubles, de ahí pasa a malato, fumarato, succinato, se libera ATP y CO<sub>2</sub> y se sintetiza el ácido propiónico y 3) Mediante la utilización de CO<sub>2</sub> + 2H los MO saltan la síntesis de oxalacetato y se sintetiza malato, fumarato, succinato, se libera ATP y CO<sub>2</sub> y se sintetiza el ácido propiónico (Nagaraja *et al.*, 1997).



**Figura 3. Alternativas para la síntesis de propionato en rumen, adaptado de Nagaraja *et al.*, (1997).**



### **1.5 Absorción de propionato a nivel ruminal**

La absorción de AGV tiene relación directa con su producción y relación inversa con el pH, evitando su acumulación en el rumen. La absorción ruminal de AGV por vía paracelular es insignificante, y depende de la vía transcelular, ingresando a la célula por dos mecanismos diferentes; Uno de ellos es 1) la difusión simple, que es mecanismo electroneutro y que no utiliza transportador, pero requiere que los AGV se encuentren en su forma no disociada y liposoluble. En su forma disociada el AGV posee carga eléctrica negativa, esto produce la atracción del extremo positivo de las moléculas de agua, que se comportan como un bipolo, creándose una capa de hidratación alrededor del AGV que le quita liposolubilidad y aumenta su diámetro, impidiendo así que pueda atravesar la membrana celular.

A pesar de ser evidente que los AGV se absorben en parte en su forma no disociada, al pH normal del rumen este proceso es difícil de explicar debido al concepto de pK(nivel al que se absorbe). El pK indica el valor de pH en el cual un compuesto está 50 % disociado y 50 % no disociado. El pK de los AGV más producidos en el rumen es de aproximadamente 4,6. Al pH normal del rumen, nunca inferior a 5,5 la inmensa mayoría de los AGV están en su forma disociada y por lo tanto no podrían ser absorbidos por difusión. Para posibilitar su absorción, el pH debe descender sobre la superficie de las células del epitelio ruminal. Para ello las células epiteliales secretan hidrogeniones ( $H^+$ ), los cuales obtiene a partir de combinar  $CO_2$  y agua para formar bicarbonato y el  $H^+$  que será contratransportado por  $Na^+$ . El otro mecanismo de absorción de los AGV es más directo y no requiere del bombeo de  $H^+$ , sino de un contratransportador que ingresa el AGV- intercambiándolo con bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) en la superficie apical. De esta forma este mecanismo complementa el aporte de  $HCO_3^-$  que realiza la saliva (Mattioli y Relling, 2003).

### **1.6 Gluconeogénesis hepática**

La gluconeogénesis es un proceso crucial para soportar la homeostasis de los niveles de glucosa plasmática cuando el suministro de glucosa es insuficiente (Hatting *et al.*, 2018). Los carbohidratos son fermentados hasta AGV en el rumen, los rumiantes cubren

su requerimiento de glucosa mayormente por la síntesis de Novo después de amamantarse. La diferencia con un no rumiante es que el propionato que proviene de la fermentación ruminal es el principal sustrato para la gluconeogénesis.

El metabolismo del propionato dentro de la gluconeogénesis se da vía propionil –Co-A carboxilasa, metilmalonil-CoA mutasa y la forma citosólica de la fosfoenol Piruvato carboquinasa (PEPCK), la cual tiene una prioridad metabólica y continua incluso si el aporte de sustrato es exógeno. La gluconeogénesis es regulada a nivel transcripcional y postranscripcionalmente y se regula mediante las hormonas insulina, glucagón y del crecimiento. La regulación transcripcional es relevante cuando la gluconeogénesis se da a partir de propionato, alanina u otros aminoácidos, lactato y glicerol. Los promotores de la Piruvato carboxilasa y la PEPCK son directamente regulados por los productos metabólicos. El paso final y decisivo para la liberación de la glucosa (fructosa 1,6 bifosfatasa y glucosa 6- fosfatasa) parece ser mayormente dependiente de una regulación postranscripcional que va de acuerdo al estado actual de la glucosa. La entrada de precursores gluconeogénicos junto con el glucógeno hepático casi siempre son suficientes para cubrir las necesidades de glucosa del organismo excepto en animales de alta producción o en animales sometidos a ayuno o estrés nutricional (Aschenbach *et al.*, 2010).

### **1.7 Propionato de calcio**

El propionato de calcio (CaPr), es un polvo blanco cristalino, cuya fórmula química es  $\text{Ca}(\text{C}_2\text{H}_5\text{COO})_2$ , contiene no menos de 96% de y no más de 100.5% de pureza, sin embargo aporta aproximadamente un 76% de ácido propiónico. Tiene una solubilidad aproximada de 1g en 3ml de  $\text{H}_2\text{O}$  y un pH de entre 7.5 y 10.5 lo que le confiere un aroma ligeramente ácido (Mathews, 1994).

Se obtienen mediante la reacción de óxido de calcio (CaO) y ácido propiónico ( $\text{C}_3\text{H}_5\text{OOH}$ ) como a continuación se describe;  $\text{CaO} + 2(\text{C}_3\text{H}_5\text{OOH}) \rightarrow (\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2)_2\text{Ca} + \text{H}_2\text{O}$ . La composición molar del propionato de calcio de acuerdo con su fórmula condensada ( $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4\text{Ca}$ ) es; C= 72 g/mol, H= 10 g/mol, O=64 g mol, Ca = 40 g/mol, dando un total

de 186 g/mol, de acuerdo con lo anterior la fracción molar de calcio correspondería al 21.5% y la fracción molar de ácido propiónico a un 78.5%. A lo largo de los años el propionato se ha utilizado como un conservador en la industria de la panificación (Boyaval y Corre, 1995).

## **1.8 Regulación del consumo de alimento**

El consumo en animales domésticos considera la interacción entre apetito y saciedad, sin tomar en cuenta lo que respecta a gustos o preferencias por determinados alimentos o a factores externos al animal, como puede ser; temperatura ambiente, aun así hay que seguir recordando que se debe contemplar que todos estos factores se interrelacionan. Es importante saber que en la producción animal, la cantidad de leche, carne o lana producidas dependen de la cantidad de materia seca que el animal ingiera. Por ello el entendimiento de los mecanismos que regulan el consumo son muy importantes. Estos procesos ocurren simultáneamente en el organismo del animal (Relling *et al.*, 2003).

A manera de clasificación podemos hablar de “sitio de regulación”, que puede ser central o periférico. El primero es por señales que llegan al hipotálamo donde se encuentra el centro del apetito y saciedad. Estas señales provienen de estímulos en el organismo y llegan al hipotálamo por vía nerviosa a través del nervio vago o por la vía sanguínea. La regulación periférica es una forma más bien mecánica, y ocurre cuando el animal no puede consumir más debido a una limitación física del tracto gastrointestinal. En rumiantes se comprobó que la digestibilidad del alimento cumple un papel importante en esta regulación. Cuando la digestibilidad total del alimento es inferior al 68% se produce el efecto de “llenado”. Pero cuando la digestibilidad es superior al valor mencionado la regulación es “quimostática”. Esta regulación quimostática es la regulación central (Van Soest, 1994).

La regulación periférica se integra con la central por medio de los receptores de estiramiento del tracto gastrointestinal, que envían por el nervio vago señales al sistema nervioso central. Los mecanismos que regulan el consumo en el hipotálamo son múltiples con una gran interacción y complejidad. Por ello también pueden clasificarse en directos

e indirectos. Directos son aquellos que actúan directamente en el hipotálamo, e indirecto son aquellos que lo hacen a través del nervio vago (Roche *et al.*, 2008).

La estimulación vagal que se conoce hasta ahora está basada en experimentos en no rumiantes, pero conociendo las diferencias fisiológicas, estos principios pueden llegar a extrapolarse a rumiantes. El primero es la oxidación de metabolitos a nivel hepático. Se sabe que un exceso de glucosa plasmática en no rumiantes estimula su oxidación a nivel hepático, lo cual estimula al nervio vago disminuyendo el apetito. En rumiantes no hay oxidación hepática de glucosa, debido a su baja absorción intestinal, cumpliendo el hígado la función contraria de producir glucosa. De este modo se teoriza que un exceso de propionato y/o ácidos grasos libres y la oxidación de dichos metabolitos pueden estimular al nervio vago y causar la disminución del consumo voluntario de alimento (Allen *et al.*, 2009).

La regulación directa de consumo es por medio de metabolitos y hormonas que llegan al hipotálamo y producen cambios en la expresión génica o en la secreción de neuropéptidos encargados de regular el apetito. Los metabolitos que tienen efecto en el hipotálamo son glucosa, propionato, ácidos grasos libres y algunos aminoácidos como leucina. Estos metabolitos son oxidados en el hipotálamo y producen la disminución de la secreción de neuropéptido Y (NPY), el cual es un neuropéptido que estimula el apetito (orexigénico) (Beck, 2006).

Por otro lado las hormonas metabólicas conocidas de regular apetito son: insulina, leptina y los péptidos gastrointestinales, ghrelina, colecistoquinina, péptido insulínico dependiente de glucosa, GLP-I, y péptido tirosina tirosina (PYY). De todas estas hormonas solo ghrelina produce apetito, y sus concentraciones plasmáticas alcanzan el máximo antes de que el animal consuma. El resto de las hormonas mencionadas disminuyen el apetito. El mecanismo de acción es similar al de los metabolitos, o sea disminuyendo la secreción de NPY (Sartin *et al.*, 2011).

## 1.9 El nervio vago

Las fibras aferentes del nervio vago son la mayor conexión neuro anatómica entre el tracto alimentario y la parte posterior del cerebro. Las señales que transmite se relacionan con señales anorexigenicas, provenientes del tracto gastro intestinal, el hígado y de metabolitos, monoaminas y péptidos secretados que son transmitidos a través del mismo y las fibras simpáticas hacia el sistema nervioso central y la parte posterior del cerebro, donde se integran con un efecto de entrada hipofágico y un efecto hiperfagico de salida en el hipotálamo (Date *et al.*, 2002; Schwartz *et al.*, 2000).

Las fibras aferentes responden a tres tipos de estímulos relacionados con el consumo de alimento; la distensión mecánica del lumen o contracciones intestinales, propiedades químicas de los contenidos luminales, péptidos intestinales y neurotransmisores (Schwartz *et al.*, 1991).

## 1.10 Hipotálamo

El sistema nervioso central ocupa un papel homeostático, percibe los nutrientes consumidos y se da cuenta de la cantidad de reservas corporales, integrando esta información, y regulando el consumo de la energía o su liberación. El control de la energía a corto plazo esta principalmente integrado por señales periféricas y centrales relacionadas con el apetito y la saciedad, mientras que el control a largo plazo es mediado por señales neuronales que minimizan el impacto de los reguladores a corto plazo. Los elementos clave para esta regulación son metabolitos y hormonas secretados en proporción al estado energético de los animales y sus reservas metabólicas, y el sistema nervioso central se focaliza en cómo se encuentra cada una. Es por esto que las investigaciones se concentran en la identificación de señales neurohormonales de tipo orexigénicas (estimulan el CVA) y señales anorexigénicas (inhiben el CVA), las cuales responden a señales circulantes y varían según el estado metabólico (Stanley *et al.*, 2005).

Experimentos clásicos de lesiones neuronales en ratas demuestran el importante rol del hipotálamo en la regulación del consumo voluntario de alimento (Hetherington *et al.*,

1940). Lesiones bilaterales del hipotálamo medio resultan en la exhibición de excesivas señales orexigénicas (hiperfágia). Estudios de la época (Anand *et al.*, 1951) señalan que el control del consumo voluntario de alimento se lleva a cabo en diferentes centros del hipotálamo, la estimulación eléctrica del centro medio del hipotálamo inhiben el consumo voluntario de alimento en las ratas, mientras que la estimulación eléctrica del núcleo lateral estimula el consumo voluntario de alimento.

Estudios en rumiantes sugieren también que el hipotálamo tiene un rol importante en la integración de varias señales, que resultan en la activación de la alimentación o la inhibición de la misma. Experimentos en animales domésticos han encontrado que lesiones en el núcleo ventromedial (VMN) de cerdos causan un incremento en la alimentación, lesiones en el área hipotalámica (LHA) lateral de ovejas redujeron el consumo de alimento (Forbes *et al.*, 1974). Una mayor concentración de actividad regulatoria de estas señales se concentra en el núcleo arqueado que está localizado en la base del hipotálamo, tanto la señal inhibitoria como la señal estimuladora son originadas del núcleo arqueado del hipotálamo (Sartin *et al.*, 2011). En contraste con lo anterior Stellar, (1954) propone que la región ventromedial del hipotálamo genera las señales anorexigénicas y la región lateral genera las señales orexigénicas.

## **1.11 Neurotransmisores**

### 1.11.1 Neuropéptido Y (NPY)

El NPY es un polipéptido lineal con 36 aminoácidos (Tatemoto, 1982), como el NPY contiene muchos residuos de tirosina (Y) en su estructura, se le llama a este péptido Neuropéptido Y.

El NPY ha demostrado ser un potente neurotransmisor que estimula el apetito el cual en el caso de corderos es sintetizado en el núcleo arqueado del hipotálamo (Polkowska *et al.*, 2006). La expresión del gen NPY fue demostrada en animales sujetos a ayunos cortos o largos y estados de subnutrición, lo cual en ambos casos incremento la expresión del gen NPY en el Núcleo arqueado del hipotálamo (Adam *et al.*, 2002; Archer *et al.*, 2002).

Interesantemente, la expresión del neuropéptido Y, evaluada en diferentes épocas a través del año en forma de NPY ARNm muestra estar correlacionada con el consumo voluntario a medida que se expresa más NPY, el consumo voluntario disminuye (Anukulitch *et al.*, 2009).

#### 1.11.2 Péptido Relacionado al Agouti (AgRP)

Agouti (AgRP) es un potente péptido orexigénico considerado un importante modulador de balance de energía. Está constituida por 132 aa, se sintetiza principalmente en el núcleo arqueado del hipotálamo. Las neuronas que producen NPY también coexpresan AgRP, compite con la  $\alpha$ -MSH (hormona concentradora de melanina) por sus receptores MCR4 y MCR3 a los cuales antagoniza. Fuente especificada no válida. La secreción de AgRP se eleva durante el ayuno y cuando las concentraciones de leptina son bajas. La AgRP inhibe la acción supresora del apetito de la leptina, lo cual aumenta la ingesta alimenticia por periodos de hasta una semana. AgRP se comporta como un antagonista del receptor de melanocortina, y en algunos informes, un agonista inverso, que promueve el balance energético positivo. Ambas neuronas son dianas para la leptina y la insulina y pueden integrar una variedad de señales neuronales nutricionales y para regular el equilibrio de energía (Haghshenas, 2014; Carranz *et al.*, 2017).

#### 1.11.3 Pro Opio Melanocortina (POMC)

El gen codifica para un precursor muropeptídico que a través de un complejo procesamiento posttraduccional tejido específico da lugar a una variedad de hormona y neuropéptidos entre los cuales se encuentra la hormona adenocorticotrófica (ACTH), la hormona estimulante de los melanocitos ( $\alpha$ -MSH),  $\beta$ -lipotropina ( $\beta$ -LPH), las formas opioides y no opioides de la  $\beta$ -endorfina y los péptidos N-terminales N-POMC<sub>1-49</sub> y  $\gamma$ -MSH (Young *et al.*, 1998).

Como la mayoría de las proteínas secretadas, la prohormona POMC tienen un péptido señal hidrofóbico N-terminal de 26 aminoácidos y es transportada por la membrana del retículo endoplásmico. El precursor es sintetizado principalmente en las células corticotróficas y melanótropicas del lóbulo anterior e intermedio de la hipófisis, en las

células del núcleo arcuato del hipotálamo y el núcleo del tracto solitario del encéfalo (Tooze, 1987).

## **1.12 Hormonas**

### 1.12.1 Insulina

La insulina es un péptido hormonal de veintiuno aminoácidos que es producido por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans. Juega un papel clave en la homeostasis energética reduciendo la producción hepática de glucosa a través de la supresión del glucagón, e incrementa la utilización de la glucosa por los tejidos periféricos que son sensibles a esta acción. Generalmente las concentraciones de insulina son proporcionales a la cantidad de grasa corporal (Caldeira *et al.*, 2007).

Las concentraciones de insulina aumentan unos minutos después de la ingestión de alimentos (Allen *et al.*, 2005), en la fase cefálica las células  $\beta$  del páncreas secretan la insulina, en los rumiantes esta secreción es estimulada por las contracciones del abomaso, las branquias pilóricas y duodenales y el nervio vago (Herath *et al.*, 1999). En contraste, la secreción postprandial de insulina en los rumiantes es mediada por el sistema histamínico central, el cual enlaza los niveles de histamina en las neuronas elevando las concentraciones plasmáticas de insulina, reduciendo así el consumo voluntario de alimento (Kurose *et al.*, 2007). Sin embargo, la administración de insulina en corderos ha demostrado una reducción en el consumo voluntario de alimento, disminuyendo el peso corporal a los 6 días, y dejando concentraciones elevadas de insulina aun en sangre (Foster *et al.*, 1991), indicando que la glucosa no media los efectos de la insulina en el consumo voluntario de alimento.

Para desarrollar más complicaciones en el entendimiento de la participación de la insulina en la regulación del consumo voluntario de alimento, la fermentación microbiana de los carbohidratos ingeridos en la dieta y la dependencia de la gluconeogénesis hepática, sugieren que la insulina media la regulación de forma diferente en los rumiantes que en los no rumiantes (Roche *et al.*, 2008).



La insulina podría tener 2 modos de acción, reduciendo la expresión de señales orexigénicas incrementando la sensación de saciedad, o mediante un efecto directo en los centros orexigénicos o anorexigénicos en el sistema nervioso central. Las infusiones de insulina en el sistema nervioso central de ratas en ayuno inhibieron la expresión génica del NPY mRNA en el núcleo arqueado del hipotálamo (Schwartz *et al.*, 1992) de igual manera ratones sometidos a restricción alimentaria, incrementaron sus niveles plasmáticos de insulina, disminuyendo la expresión del NPY mRNA después de ser alimentados (Chiba *et al.*, 2014).

El mecanismo de la secreción de insulina en rumiantes no se conoce del todo; una hipótesis sugiere que se debe al metabolismo del propionato en hígado, el cual genera un estímulo a través del sistema nervioso autónomo (Bloom *et al.*, 1985) para la secreción de insulina por el páncreas (Reynolds, 2002). Por tanto y pese a que no hay resultados científicos que lo ratifiquen, la secreción de insulina podría no estar regulada solamente por metabolitos como glucosa y propionato, sino también por la estimulación hepática a través del sistema nervioso autónomo (Reynolds, 2002). Estas diferencias en los mecanismos de secreción de insulina podrían, en parte, influir en los mecanismos por los cuales esta hormona regula el consumo voluntario de alimento en los rumiantes.

### 1.12.2 GLP-I

El término glucagón hace referencia a los productos derivados del gen que codifica para glucagón en las células L, ubicadas en el intestino delgado caudal y parte del intestino grueso. El gen del glucagón se expresa también en las células A del páncreas y en algunas zonas del cerebro. Los productos de las células L asociados con la regulación del consumo de alimento son GLP-I, GLP-II, glicetina y oxintomodulina.

El GLP-I deriva del gen que codifica para enteroglucagón (Host, 1997). En cerdos es secretado en respuesta a la presencia de nutrientes en el lumen del intestino delgado, especialmente por la presencia duodenal de grasas, o bien la mezcla de grasas y glucosa (Knapper *et al.*, 1995; Hansen *et al.*, 2004). En humanos, en cambio, la glucosa en el

principal estímulo para su secreción (Knapper *et al.*, 1996), lo cual sugiere una variación entre especies. Los efectos de GLP-I han sido clasificados como: a) efectos incretinas, es decir que estimulan al páncreas para secretar insulina, y preparan a los tejidos periféricos, como el adiposo y el muscular, para la utilización de los nutrientes; b) efecto de “freno-ileal”, término utilizado para indicar que una señal ileal disminuye la motilidad gastrointestinal; y c) efecto inhibidor del apetito desde el sistema nervioso central (SNC) (Shimizu *et al.*, 1987; Turton *et al.*, 1996; Host, 1997). La función incretina es muy importante en la regulación del metabolismo, no solo por la estimulación de la secreción de insulina, sino también por estimular la lipogénesis independiente de insulina (Martin *et al.*, 1993).

En rumiantes, los conocimientos sobre la hormona GLP-I son limitados. Se han informado mayores valores de GLP-I asociados con la lactancia, tanto en borregas (Faulkner and Martin, 1999) como en vacas (Relling *et al.*, 2007) y con el consumo o infusión abomasal de lípidos en bovinos (Benson *et al.*, 2001; Litherland *et al.*, 2005; Relling *et al.*, 2007). Aunque no solo la cantidad de grasa influyó en la concentración de GLP-I, también el grado de saturación tiene un papel importante, en asociación directa con el grado de dobles enlaces de los ácidos grasos (Relling *et al.*, 2007; Bradford *et al.*, 2008). La mayoría de los estudios evaluaron el efecto del aporte de grasas sobre los niveles plasmáticos de GLP-I, pero no se encontraron estudios que evalúen el efecto del propionato sobre su concentración.

En rumiantes, se encontraron incrementos en las concentraciones plasmáticas de GLP-I los cuales se asociaron a la disminución del consumo de alimento (Benson *et al.*, 2001; Relling *et al.*, 2007; Bradford *et al.*, 2008; Relling *et al.*, 2010). Esto hace suponer que el GLP-I juega un papel importante en la regulación del consumo.

## 1.13 Metabolitos

### 1.13.1 Glucosa y Propionato

En lo concerniente al manejo de los animales para incrementar el consumo voluntario de alimento, los factores que estimulan la producción de las señales que regulan el mismo son igual de importantes. Muchos de estos factores identificados son secretados en respuesta a nutrientes específicos (Feinle *et al.*, 2005). De este modo se ha reportado que hasta la glucosa tiene un efecto regulatorio influenciado la secreción de neuropéptido en los rumiantes, como los animales no rumiantes (Amstaldem *et al.*, 2002). Sin embargo, la fermentación microbiana es el principal proceso digestivo en los rumiantes, debido a esto las concentraciones circulantes de AGV (Trenkle, 1970; Dicostanzo *et al.*, 1999), aminoácidos (Kuhara *et al.*, 1991) y lípidos (Choi *et al.*, 1996) son más aceptados como participantes en la regulación del consumo de alimento que la glucosa (Faverdin, 1999; Sano *et al.*, 1993).

Adicional a lo anterior existen factores en los rumiantes, incluyendo la dependencia de la gluconeogénesis para la producción de glucosa y una mayor degradación de la insulina que en los animales no rumiantes (Duhlmeier *et al.*, 2005). La fermentación ruminal también produce y aporta nutrientes de manera constante, en consecuencia las concentraciones plasmáticas de insulina tienden a ser menores exhibiendo una menor variación que los animales no rumiantes (Wester *et al.*, 2000).

Se ha reportado que las infusiones ruminales de AGV's reducen el consumo voluntario de alimento (Egan, 1977), pero no se tiene muy claro que mecanismo siguen estas señales anorexigenicas (Faverdin, 1999). Infusiones de propionato a rangos fisiológicos relevantes han reportado un incremento en las concentraciones plasmáticas de insulina (Leuvenink, *et al.*, 1997), aportando un posible mecanismo por el cual el propionato induce la saciedad. Sin embargo Allen *et al.* (2005) mencionan que el efecto hipofágico que induce el propionato se ha observado sin incrementos en la concentraciones plasmáticas de insulina, indicando que la insulina no actúa como un mediador para el propionato en la regulación del consumo voluntario de alimento, indicando que el

propionato provee una señal del estatus energético de los rumiantes al sistema nervioso central (Faverdin, 1999).

Las moléculas de nutrientes tales como la glucosa tienen acciones directas e indirectas sobre el hipotálamo y la activación periférica de los nervios hacia el tracto solitario del núcleo (NTS), lo anterior ha sido observado en animales de laboratorio (Minokoshi et al., 2004). La relación entre el cerebro y las moléculas de nutrientes que regulan el apetito en animales domésticos no es tan clara. Allen *et al.* (2009) propone la teoría de la oxidación hepática la cual indica que el consumo de alimento es controlado por una señal del hígado al cerebro que es estimulada por la oxidación de varios metabolitos (glucosa), a su vez soportada por Friedman *et al.* (1998). El mecanismo propuesto para esta regulación en serie está basado en los datos obtenidos por Niiijima (1982) quien al hacer infusiones directas de glucosa en la vena porta hepática de puercos de guinea observo una disminución en la actividad del nervio vago, en un caso diferente Forbes *et al.* (1988) secciono el nervio vago de corderos para prevenir la disminución del consumo de alimento, que anteriormente había sido inducido por las infusiones vía porta de propionato.

La secuencia propuesta para inhibir el consumo de alimento en rumiantes en respuesta a las infusiones de propionato, es que la oxidación del propionato lleva a aumentar la producción de ATP y a su vez produce una hiperpolarización de las células hepáticas. Esto resulta en una disminución de la tasa de contracciones de las fibras afferentes del nervio vago que a su vez resulta en la integración al tracto solitario del núcleo (NTS), reduciendo el consumo de alimento (Allen *et al.* 2009).

Las infusiones intestinales, intravenosas e intraperitoneales de glucosa no reducen el consumo de energía en los rumiantes Allen, (2000). Por tanto, las concentraciones circulantes de ácidos grasos volátiles (DiCostanzo *et al.*, 1999) son más aceptadas como nutrimentos reguladores del consumo en rumiantes.

El efecto hipófagico de las infusiones de propionato está ampliamente documentado en rumiantes (Allen, 2000). El hígado está involucrado en la regulación del consumo de alimento influenciado por el Propionato. Los efectos hipofagicos mencionados no

tuvieron lugar al infundir propionato vía vena porta, cuando se realizó una esplenectomía lateral y una vagotomía hepática a borregos (Forbes, 1988).

Los efectos hipofágicos se presentan más con propionato que con acetato y butirato, cuando se infunden vía vena porta en corderos (Forbes *et al.*, 1980) y la infusión de propionato en la vena mesentérica de terneras redujo el consumo de alimento, en ovejas infusiones de acetato al mismo nivel no tuvieron respuesta (Knapp *et al.*, 1992). Esto es consistente con la teoría de la oxidación hepática porque el propionato puede ser oxidado y a su vez estimular la oxidación en el hígado (Knapp *et al.*, 1992).

Podría esperarse que el propionato disminuyera el consumo de materia seca comparado con el acetato, ya que el propionato tiene mayor capacidad de generar energía (glucogénico), el incremento lineal de niveles de propionato tienen como resultado una disminución en el consumo de energía metabolizable comparado con el acetato, este resultado fue obtenido por Oba *et al.* (2003) al infundir mezclas iso-osmóticas de ácidos grasos volátiles en rumen. Conforme la proporción de propionato aumenta, la reducción en el consumo de energía metabolizable proveniente de la dieta disminuye, ya que la suplementada en la infusión es excesiva. El consumo de alimento se redujo linealmente de 2.5 a 1.5 kg de materia seca, conforme el propionato aumento de 0 a 100% en la infusión, lo cual indica un incremento en el estímulo de saciedad.

#### **1.14 Literatura citada**

- Allen, M. S. 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 83: 1598-1694.
- Allen, M. S., B. J. Bradford. 2009. Comment on control of eating by hepatic oxidation of fatty acids. *J. Appet.* : 10: 1016
- Allen, M.S., Bradford B.J., Oba M. 2009. Board-invited review: The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. *J Anim Sci.* 87: 3317-3334.
- Allen, M.S., Voelker J. A., Harvatine K. J. 2005. The cow as a model to study food intake regulation. *Annu. Rev. Nutr.* 25: 523-547.

- Aschenbach, J. R., Kristensen, N. B., Donkin, S. S., Hammon, H. M., & Penner, G. B. (2010). Gluconeogenesis in dairy cows: the secret of making sweet milk from sour dough. *IUBMB life*, 62(12), 869-877.
- Bannink, A., & Tamminga, S. (2005). Rumen function. *Quantitative Aspects of Ruminant Digestion and Metabolism*, 2, 263-288.
- Beck, B. 2006. Neuropeptid Y in normal eating and in genetic and dietary-induced obesity. *Phil. Trans. R. Soc.* 361: 1159-1185.
- Benson, J.A. and Reynolds, C.K. 2001. Effects of abomasal infusion of long-chain fatty acids on splanchnic metabolism of pancreatic and gut hormones in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 84:1488-1500.
- Bloom, S. R., and A. V. Edwards. 1985. Pancreatic neuroendocrine responses to butyrate in conscious sheep. *J. Physiol.* 364:281-288.
- Boyaval, P., & Corre, C. (1995). Production of propionic acid. *Le Lait*, 75(4-5), 453-461.
- Bradford, B. J., Harvantine, K. J. and Allen, M. S. 2008. Dietary unsaturated fatty acids increase plasma glucagón-like peptide-1 and cholecystokinin and may decrease premeal ghrelin in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91: 1443-1450.
- Chiba, T., Tamashiro Y., Park D., Kusudo T., Fujie R., Komatsu T., Kim S. E. Park S., Hayashi H., Mori R., Yamashita H., Chung H.Y. Shimokawa I. 2014. A key role for neuropeptide Y in lifespan extension and cancer suppression via dietary restriction. *Sci. Rep. Nature.* 4: 4517.
- Choi, B.R. and Palmquist, D.L. 1996. High fat diets increase plasma cholecystokinin and pancreatic polypeptide, and decrease plasma insulin and feed intake in lactating cows. *J. Nutr.* 126:2913-2919.
- Hatting, M., Tavares, C. D., Sharabi, K., Rines, A. K., & Puigserver, P. (2018). Insulin regulation of gluconeogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1411(1), 21-35.
- Hansen, L., Hartman, B., Mineo, H. and Host., J.J. 2004. Glucagon-like peptide-1 secretion is influenced by perfusate glucose concentration and by a feedback mechanism involving somatostatin in isolated perfused porcine ileum. *Regul. Pept.* 118:11-18.
- Host, J.J. 1997. Enteroglucagon. *Annu. Rev. Physiol.* 59:257-271.
- Huber, J. T. (2018). The use of ammonia in protein enrichment of feed by-products and animal wastes. In *Upgrading Residues and By-products for Animals* (pp. 99-108). CRC Press.
- Knapper, J.M. Morgan, L.M. and Fletcher, J.M. 1996. Nutrient-induced secretion and metabolic effects of glucose-dependent insulinotropic polypeptide and glucagón-like peptide-1. *Proc. Nutr. Soc.* 55:291-305.
- Knapper, J.M., Health, A., Fletcher, J.M., Morgan, L.M., and Marks, V. 1995. GIP and GLP-1 (7-36) amide secretion in response to intraduodenal infusions of nutrients pigs. *Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 111:445-450.

- Litherland, N.B., Thire, S., Beaulieu, A.D., Reynolds, C.K., Benson, J.A. and Drackley, J.K. 2005. Dry matter intake is decreased more by abomasal infusión of unsaturated free fatty acids than by unsaturated triglycerides. *J. Dairy Sci.* 88:632-643.
- Martin, P.A., Faulkner, A. and Thomson, G.E. 1993. Effects of gut hormones on ovine adipose metabolism *in vitro* using microdialysis. *Biochem. Soc. Trans.* 21:443S.
- Mathews, A. P. (1994). *U.S. Patent No. 5,324,442*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Matthews, D., Diskin, M. G., Kenny, D. A., Creevey, C. J., Keogh, K., & Waters, S. M. (2017). Effect of short term diet restriction on gene expression in the bovine hypothalamus using next generation RNA sequencing technology. *BMC genomics*, 18(1), 857.
- Melendez, P., Severino, K., Marin, M. P., & Duchens, M. (2018). The effect of a product with three gluconeogenic precursors during the transition period on blood metabolites and milk yield in Chilean Holstein cattle. *Journal of Applied Animal Research*, 46(1), 613-617.
- Nagaraja, T. G., Newbold, C. J., Van Nevel, C. J., & Demeyer, D. I. (1997). Manipulation of ruminal fermentation. In *The rumen microbial ecosystem* (pp. 523-632). Springer, Dordrecht.
- Orskov, E. R. (Ed.). (2012). *Energy nutrition in ruminants*. Springer Science & Business Media.
- Porcu, C., Manca, C., Cabiddu, A., Dattena, M., Gallus, M., Pasciu, V., ... & Molle, G. (2018). Effects of short-term administration of a glucogenic mixture at mating on feed intake, metabolism, milk yield and reproductive performance of lactating dairy ewes. *Animal Feed Science and Technology*, 243, 10-21.
- Relling A.E. and Reynolds, C.K. 2007. Feeding rumen-inert fats differing in their degree of saturation decreases intake and increases plasma concentrations of gut peptides in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:1506-1515.
- Relling A.E. and Reynolds, C.K. 2007. Plasma concentrations of gut peptides in dairy cattle increase after calving. *J. Dairy Sci.* 90:325-330.
- Relling, A. E., & Mattioli, G. A. (2003). Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. *Argentina: Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP*.
- Relling, A. E., Mattioli G.A. 2003. Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. Edi EDULP. 72 p.
- Relling, A. E., S. C. Loerch, and C. K. Reynolds. 2010. Plasma ghrelin and oxyntomodulin concentrations in lactating dairy cows receiving abomasal soybean oil, corn starch, and casein infusions. *Dom Anim Endocrinol* 38: 284-288.
- Relling, A.E. and Reynolds, C.K. 2008. Abomasal infusión of casein, starch and soybean oil differentially affect plasma concentrations of gut peptides and feed intake in lactating dairy cows. *Domest. Anim. Endocrinol.* 35:35-45.

- Relling, A.E., Crompton, L.A., Loerch, S.C. and Reynolds, C.K. 2009. Plasma concentration of glucose-dependent insulinotropic polypeptide is negatively correlated with respiratory quotient in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92:470-471 S1 (abstract).
- Relling, A.E., Pate J.L., Reynolds C.K., Loerch S.C. 2010. Effect of feed restriction and supplemental dietary fat on gut peptid and hipotalamic neuropeptide messenger ribonucleic acid concentrations in growing wethers. *J Anim Sci.* 88: 737-748.
- Reynolds, C. K. 2002. Economics of visceral energy metabolism in ruminants: Toll keeping or internal revenue service? *J. Anim. Sci.* 80 (E. Suppl. 2):E74–E84.
- Reynolds, C.K., Benson, J.A. and Faulkner, A. 2002. Effects of abomasal casein or essential amino acids infusión on splachnoc hormone metabolism in lactating cows. *J. Dairy. Sci.* 85:135 S1 (abstract).
- Roche, J.R., Blache D., Jane K.K., Miller D. R., Sheahan A. J., Miller D.W. 2008. Neuroendocrine and physiological regulation of intake whit particular reference to domesticated ruminant animals. *Nutrition Research Reviews.* 21: 207-234.
- Sartin, J.L., Witlock B.K, Daniel J.A. 2011. Triennial growth symposium: neural regulation of feed intake: modification by hormones, fasting, and disease. *J Anim Sci.* 89: 1991-2003.
- Schwartz M. W., A. J. Sipols, J. L. Marks, G. Sanacora, J. D. White, A. Scheurink, S. E. Kahn, D. G. Baskin, S. C. Woods, D. P. Figlewicz, and D. Porte. 1992. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* 130:3608–3616.
- Shimizu, I., Hirota, M., Ohboshi, C. and Shima, K. 1987. Identification and localization of glucagon-like peptide-1 and its receptor in rat brain. *Endocrinology* 121:1076-1082.
- Tatemoto K, Carlquist M., Mutt V. 1982. Neuropeptid Y- A novel brain peptide whit structural similarities to peptide YY and pancreatic polypeptide. *Nature.*296: 659-660.
- Tatemoto, K. 2008. Neuropeptide Y: History and overview. Department of molecular physiology, Institute for molecular and cellular regulation, Gunma University, 371-8512 Maebashi, Japan.
- Tooze, J., Hollinshead, M., Frank, R., & Burke, B. (1987). An antibody specific for an endoproteolytic cleavage site provides evidence that pro-opiomelanocortin is packaged into secretory granules in AtT20 cells before its cleavage. *The Journal of cell biology*, 105(1), 155-162.
- Turton, M.D., O’Shea, D., Gunn, I., Beak, S.A., Edwards, C.M., Meeran, K., Choi, S.J., Taylor, G.M., Health, M.M., Lambert, P.D., Wilding, J.P., Smith, D.M., Ghatei, M.A., Herbert, J. and Bloom, S.R. 1996. A role for glucagón-like peptide-1 in central regulation of feeding. *Nature* 379:69-72.
- Van Soest, P.J. 1994. Nutritional Ecology of the ruminant. 2da ed. New York: Cornell University Press.



- Wilkinson, J. M., & Lee, M. R. F. (2018). Use of human-edible animal feeds by ruminant livestock. *animal*, 12(8), 1735-1743.
- Young, J. I. (1998). *Estudio de la regulación transcripcional y funcional del gen de proopiomelanocortina en el sistema nervioso central de ratones transgénico* (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires).

## **CAPITULO II. EFECTO DEL PROPIONATO DE CALCIO EN EL PESO VIVO, CONSUMO Y CANAL DE CORDEROS ALIMENTADOS CON HENO DE ALFALFA (*Medicago sativa*)**

EFECTO DEL PROPIONATO DE CALCIO EN EL PESO VIVO, CONSUMO Y CANAL DE CORDEROS ALIMENTADOS CON HENO DE ALFALFA (*Medicago sativa*)

EFFECT OF CALCIUM PROPIONATE ON BODY WEIGHT, INTAKE AND CARCASS OF LAMBS FED ALFALFA HAY (*Medicago sativa*)

Ruben Oswaldo Cifuentes-López<sup>1</sup>, Héctor Aarón Lee-Rangel<sup>1</sup>, Juan Carlos García-Lopez<sup>2</sup>, Jorge Genaro Vicente<sup>3</sup>, Argel Flores-Primo<sup>3</sup>, Juan Manuel Pinos-Rodríguez<sup>3\*</sup>

### **2.1 RESUMEN**

El propionato de calcio (PrCa) es un precursor gluconeogénico hepático en rumiantes, pero su uso como fuente de energía en el alimento es cuestionado por sus efectos hipofágicos. El objetivo de este estudio fue evaluar la adición de PrCa en dietas con heno de alfalfa (*Medicago sativa*) y melaza, en el peso vivo, consumo de alimento y características de canal de borregos. El diseño experimental fue completamente al azar, los tratamientos fueron cuatro dietas con 0 (testigo), 30, 35 y 40 g de PrCa por kg de materia seca que se asignaron al azar a 32 corderos (ocho repeticiones por tratamiento) Ramboulliet (peso vivo inicial promedio  $28.1 \pm 2.1$  kg). Los datos se analizaron con un modelo mixto (tratamiento fijo y cordero aleatorio) y las medias se compararon con medias de mínimos cuadrados. El PrCa adicionado a la dieta substituyó al heno de alfalfa. La evaluación duró 42 d. El peso vivo, el consumo de alimento y la conversión alimentaria no fueron diferentes ( $p > 0.05$ ) entre los tratamientos. El rendimiento de la canal fría y caliente fue mayor en los corderos alimentados con 35 g PrCa, respecto a los otros tres tratamientos ( $p \leq 0.05$ ). Las dietas con PrCa aumentaron el grado de conformación, y el área del *Longissimus dorsi*, y disminuyeron el grado de engrasamiento, la grasa dorsal y perirrenal, y el pH de la carne, en comparación con el testigo ( $p \leq 0.05$ ). El análisis

polinomial indicó que los atributos más deseables se obtuvieron en la canal con 40 g de PrCa. Con 35 g de PrCa no se afectó el consumo de materia seca ni el peso vivo de los corderos, pero si mejoró el rendimiento y los atributos de calidad en la canal.

**Palabras clave:** propionato de calcio, corderos, canal.

## 2.2 INTRODUCCIÓN

La evaluación de modificadores metabólicos para maximizar el consumo de energía y el metabolismo es necesaria en los sistemas pecuarios productivos (McGuffey, 2017). Aunque la alimentación con granos fermentables en la dieta aumenta su densidad energética, el exceso de ellos en el rumen en ocasiones reduce el consumo de materia seca, que puede disminuir la ingesta de nutrientes energéticos (Oba y Allen 2003). Dado que el costo de los granos aumenta en el mundo, los precursores de glucosa como glicerol (Avila *et al.*, 2011; Avila-Stagno *et al.*, 2013) o propionato de calcio (Lee-Rangel *et al.*, 2012; Mendoza-Martínez *et al.*, 2016) podrían sustituir parcialmente a los granos.

El propionato de calcio (PrCa) se usa en vacas lecheras para corregir problemas metabólicos ya que provee propionato como precursor para sintetizar glucosa en el hígado para utilizarla en los procesos metabólicos de las rumiantes al reducir las concentraciones plasmáticas de ácidos grasos no esterificados y cuerpos cetónicos (Liu *et al.*, 2010). En vacas y becerros neonatos, la infusión ruminal de propionato incrementa la expresión génica de ARNm de fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PCK1) en hígado (Zhang *et al.*, 2015), y se modifica el metabolismo hepático para priorizar la utilización de propionato como precursor gluconeogénico (Aguerre *et al.*, 2015). El PrCa se debe incorporar en dosis bajas porque tiene un efecto hipofágico en rumiantes (Oba y Allen, 2003), el cual está asociado a un nivel de umbral de respuesta a cierta dosis en ganado lechero (Anil and Forbes, 1988) y en ovinos (Farningham y Whyte, 1998).

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto del propionato de calcio adicionado al alimento, a base de heno de alfalfa (*Medicago sativa*), para corderos en finalización, en variables productivas y de canal. La hipótesis fue que con 40 g de PrCa

por kg de alimento, el consumo no se afecta y se mejoran las variables productivas y características de calidad de la canal ovina.

## 2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Cuatro dietas experimentales con 0, 30, 35 y 40 g de PrCa por kg de materia seca (MS) se asignaron al azar a 32 corderos machos Ramboulliet ( $28.1 \pm 2.1$  kg peso vivo, PV), alojados en jaulas individuales (0.80 x 1.2 m) con comedero, bebedero y cobertizo. Las dietas se elaboraron a base de heno de alfalfa y melaza de caña (Cuadro 1). La incorporación de PrCa substituyó a la melaza, y kg de producto de PrCa contenía 780 g de ácido propiónico y 220 g de calcio (Paniplus, S.A. de C.V. Querétaro, México), y las se elaboraron cada 7 d. El PrCa adicionado a la dieta substituyó al heno de alfalfa (Cuadro 1). Los alimentos y agua fresca se ofrecieron a las 08:00 y 18:00 h a libre acceso para asegurar un rechazo de 10 %. El periodo de adaptación a las dietas fue 15 d y el de evaluación experimental 45 d.

El PV de los corderos se registró cada 14 d desde el inicio hasta el final del experimento y con los datos se calculó la ganancia de peso total y la ganancia diaria de peso (GDP). El consumo diario de MS se dividió entre GDP para calcular la conversión alimentaria (CA).

Submuestras (500 g) de las dietas experimentales se recolectaron cada semana para elaborar una muestra compuesta representativa de los periodos experimentales. En las muestras se determinó el contenido de MS, proteína cruda (PC), extracto etéreo (EE) y cenizas de acuerdo con la metodología descrita en el AOAC (1997). La fibra detergente neutra (FDN) y ácida (FDA) se cuantificaron según la metodología de Van Soest *et al.* (1991).

Al finalizar los 42 d del periodo de alimentación, los alimentos y el agua se retiraron por 12 h. Los corderos se insensibilizaron por electrocución y sacrificaron por exanguinación por degüelle de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-033-ZOO-1995.

**Cuadro1. Ingredientes y análisis proximal de las dietas experimentales para corderos.**

	Propionato de calcio (g kg <sup>-1</sup> MS)			
	0	30	35	40
<b>Ingrediente (g kg<sup>-1</sup> MS)</b>				
Heno de alfalfa	930	900	895	890
Melaza de caña	70	70	70	70
Propionato de calcio <sup>a</sup>	0	30	35	40
<b>Análisis proximal (g kg<sup>-1</sup> MS)</b>				
Proteína cruda	185	177	174	173
Extracto etéreo	18	15	13	12
Fibra detergente neutro	542	538	515	506
Fibra detergente ácido	256	251	239	229
Cenizas	9	9	10	11

La metodología para evaluar los componentes de canal y componentes no cárnicos fue la descrita por Colomer *et al.* (1988) y de inmediato se registró el peso de la canal caliente, piel, cabeza, pie, corazón, hígado, pulmones, riñón, rumen, intestinos, pene y testículos. Después, la canal caliente se refrigeró a 4 °C por 24 h y el peso de la canal fría se registró. La longitud de la canal, la profundidad del tórax, la longitud y el perímetro de las patas, el área del músculo dorsal largo (*Longissimus dorsi*) y el espesor de la grasa del lomo también se registraron. El pH de la carne se midió a las 24 h postmortem utilizando un potenciómetro con un electrodo de punción (Hanna, Modelo HI 98140, USA). Las características de la canal y el grado de conformación se calificaron con la metodología de Colomer (1988) y la Norma Oficial Mexicana (NMX-FF-106-SCFI-2006) para clasificar canales de ovino. La estimación de energía neta (EN) para mantenimiento (ENm) y para ganancia (ENG) aportada por la dieta se calculó según la metodología descrita por Estrada-Angulo *et al.* (2016).

El diseño experimental fue completamente al azar con cuatro tratamientos (niveles de PrCa) y ocho repeticiones (corderos) cada uno, y los datos de analizaron con el

procedimiento MIXED de SAS (2002). Los datos de peso vivo, consumo de alimento, ganancia diaria de peso y CA medidos y promediados cada 14 d se analizaron con el procedimiento REPEATED de SAS (2002) y la estructura de covarianza AR(1) para evaluar el efecto del tratamiento, del periodo y la interacción de ambos. Los corderos se consideraron como componente aleatorio, y los tratamientos y los periodos componentes fijos en el modelo. La comparación de medias se realizó con el procedimiento LSMEANS y la opción ADJUST=Tukey (SAS, 2002). Además, un análisis polinomial de efectos lineales, cuadráticos y cúbicos ajustado por IML (SAS, 2002) se realizó para contrastar la división no equitativa de las dosis crecientes de PrCa y su efecto en las variables evaluadas.

## 2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El peso vivo inicial y final, la ganancia de peso total y diaria, y el consumo de alimento y la conversión fueron similares entre los tratamientos. Los niveles crecientes de PrCa en la dieta tuvieron un efecto cuadrático ( $p \leq 0.02$ ), donde los rendimientos de la canal fría y caliente de los corderos que consumieron la dieta con 35 g PrCa fueron los más altos, comparados con aquellos que recibieron dietas con 0, 30 y 40 g de PrCa (Cuadro 2). La EN para mantenimiento (ENm) y para ganancia (ENg) aportada por las dietas experimentales fue similar.

Las tres dietas con PrCa aumentaron ( $p \leq 0.05$ ) el grado de conformación, el largo de la canal, y el área de *Longissimus dorsi*. También, disminuyeron ( $p \leq 0.05$ ) el grado de engrasamiento, la grasa dorsal y perirrenal, así como el pH de la carne, en comparación con el testigo. El análisis polinomial indicó que los atributos más deseables de la canal se obtuvieron con el nivel de 35 g en comparación con 0, 30 y 40 g de PrCa (Cuadro 3). El perímetro del tórax y el peso de rumen, intestinos, vísceras y tegumentos fue similar entre los tratamientos.

**Cuadro 2. Peso vivo, consumo de alimento y rendimiento de la canal de corderos alimentados con dietas con propionato de calcio.**

Atributo	Propionato de calcio (g kg <sup>-1</sup> MS)				EEM	l	q
	0	30	35	40			
Peso inicial (kg)	27.1	29.4	27.6	28.5	1.35	-	-
Peso final (kg)	35.9	38.3	35.9	36.9	1.29	0.11	0.24
Ganancia total (kg)	8.8	8.9	8.3	8.4	0.75	0.53	0.64
Ganancia de peso (g d <sup>-1</sup> )	0.221	0.212	0.198	0.2	0.018	0.53	0.64
Consumo de alimento (kg d <sup>-1</sup> )	1.57	1.49	1.5	1.5	0.048	0.38	0.32
Conversión de alimento	7.1	7.0	7.5	7.5	0.87	0.79	0.58
Canal caliente (kg)	14.8	16.3	17.3	15.0	0.99	0.23	0.89
Canal fría (kg)	13.6	15.0	16.0	13.7	1.01	0.26	0.91
Canal caliente (%)	41.2 <sup>b</sup>	42.5 <sup>b</sup>	48.2 <sup>a</sup>	41.1 <sup>b</sup>	0.60	0.02	0.28
Canal fría (%)	37.9 <sup>b</sup>	39.1 <sup>b</sup>	44.5 <sup>a</sup>	37.1 <sup>b</sup>	0.62	0.02	0.27
ENg <sup>□</sup>	1.22	1.21	1.24	1.13	0.074	0.9	0.12
ENm <sup>□</sup>	0.99	0.99	0.99	1.0	0.003	0.9	0.59

EEM, error estándar de la media; <sup>a, b</sup> medias con literales diferentes en un renglón son diferentes ( $p \leq 0.05$ ); l, probabilidad del efecto lineal o q, efecto cuadrático de los niveles crecientes de PrCa en la dieta. <sup>□</sup>Energía neta para ganancia (ENg) y mantenimiento (ENm) aportada por la dieta.

**Cuadro 3. Características de canal y componentes no cárnicos de corderos alimentados con propionato de calcio.**

Atributo	Propionato de calcio (g kg <sup>-1</sup> MS)				EEM	l	q
	0	30	35	40			
<i>Longissimus dorsi</i> , cm <sup>2</sup>	16.8 <sup>b</sup>	19.0 <sup>a</sup>	20.7 <sup>a</sup>	18.9 <sup>a</sup>	1.11	0.34	0.95
Perímetro de tórax (cm)	69.3	71.6	70.6	68.3	2.16	0.67	0.54
Conformación <sup>□</sup>	1.3 <sup>b</sup>	2.3 <sup>a</sup>	2.3 <sup>a</sup>	2.3 <sup>a</sup>	0.44	0.14	0.38
Engrasamiento <sup>Δ</sup>	2.7 <sup>a</sup>	2.3 <sup>ab</sup>	1.7 <sup>bc</sup>	1.3 <sup>c</sup>	0.28	0.14	1.00
Grasa perirrenal <sup>Δ</sup>	1.6 <sup>a</sup>	1.6 <sup>a</sup>	1.4 <sup>ab</sup>	1.3 <sup>b</sup>	0.11	1.00	0.43
Grasa dorsal (mm)	2.6 <sup>a</sup>	2.4 <sup>ab</sup>	2.0 <sup>b</sup>	1.6 <sup>bc</sup>	0.36	0.75	0.85
pH 24 h postmortem	5.7 <sup>a</sup>	5.5 <sup>ab</sup>	5.5 <sup>ab</sup>	5.4 <sup>b</sup>	0.04	0.75	0.85
Rumen e intestinos (kg)	3.1	3.0	3.0	2.9	0.25	0.94	0.74
Vísceras y tegumentos <sup>•</sup> (kg)	9.6	10.0	10.7	9.9	0.39	0.69	0.56

EEM, error estándar de la media; l, probabilidad del efecto lineal o q, cuadrático de los niveles crecientes de PrCa en la dieta. <sup>a, b</sup> medias con literales diferentes en un renglón son diferentes ( $p \leq 0.05$ ). <sup>□</sup> escala 1 a 3, donde 1 es deficiente y 3 es excelente; <sup>Δ</sup> escala 1 a 3 donde 1 es alto y 3 bajo; <sup>•</sup> Páncreas, pulmones, tráquea, esófago, corazón, hígado, cabeza, patas, piel, pene y testículos

Los resultados anteriores no confirmaron los efectos hipofágicos del PrCA en rumiantes reportados por Oba y Allen (2003) y Bradford y Allen (2007), quienes encontraron que la adición de PrCa en la dieta, directamente en rumen o por la vena porta disminuye el consumo en alrededor de 10 % (Sheperd y Combs, 1998; McNamara y Valdez, 2005). Es posible que en nuestro estudio los niveles de forraje fueron tan altos que la distensión ruminal no permitió encontrar diferencias en el consumo (Allen *et al.*, 2009). Lee-Rangel *et al.* (2012) y Mendoza-Martínez *et al.* (2016) tampoco encontraron efecto sobre el consumo de alimento en corderos que recibieron 64.3 y 130.27 mmol de ácido propiónico. Los valores de EM por kg MS para PrCa 0, 30, 35 y 40 fueron 3.81, 3.63, 3.70 Mcal EM, respectivamente, lo cual sugiere que la regulación de consumo voluntario de alimento no fue regulado por el consumo de EM.



Otros precursores gluconeogénicos como propionato de sodio o glicerol mejoraron la ganancia de peso y la conversión, aunque con dietas con proporciones altas de concentrado (Whitney *et al.*, 2000; Parsons *et al.*, 2009). Las dietas con fuente de almidón propician mayor proporción de propionato ruminal y son consideradas más eficientes, por lo cual se considera que los precursores gluconeogénicos pueden también inducir mejores eficiencias de la dieta y del rumen (Richardson *et al.* 2003). Lee-Rangel *et al.* (2012) y Mendoza-Martínez *et al.* (2016) reportan un incremento en la producción total de ácidos grasos volátiles, así como las proporciones molares de ácido propionico; además, en fermentaciones *in vitro* el uso de PrCa causa una mayor eficiencia fermentativa y, por consecuencia, energética (Osorio-Terán *et al.* 2017). Estos efectos benéficos de los precursores gluconeogénicos pueden explicar los efectos positivos del PrCa en el rendimiento y características deseables de la canal encontrados en nuestro estudio. En efecto, Fluharty *et al.* (1999) encontraron que corderos alimentados con dietas energéticamente más densas tienen mejores rendimientos en canal que los alimentados sólo con alfalfa.

La disminución del pH de la carne a las 24 h postmortem por PrCa es deseable en ovinos (Garrido *et al.* 2005), pues esta especie, en comparación con otras, presenta una menor susceptibilidad al estrés originado antes y durante el proceso de matanza (Sañudos, 2008), y el uso de PrCa podría ser una opción para mejorar esta variable. La disminución del pH de la carne por el PrCa puede estar relacionado con el incremento de la energía metabólica de la dieta resulta que aumenta el contenido de glucógeno muscular (Immonen *et al.*, 2000) a través del incremento en la expresión génica hepática de ARNm de PCK1 (Zhang *et al.*, 2015), lo cual prioriza la utilización de propionato como precursor gluconeogénico (Aguerre *et al.*, 2015).

La capacidad del PrCa para reducir el grado de engrasamiento de las canales puede estar relacionado con la capacidad que ha mostrado este ácido graso corto en la reducción de la lipogénesis de novo en adipocitos de rata, y así mejora el metabolismo de nutrientes energéticos (Heimann *et al.*, 2014). De esta forma, el PrCa pudo inhibir el depósito de grasa de novo en la canal de los corderos.

## 2.5 CONCLUSIONES

El propionato de calcio adicionado a dietas a base de alfalfa no afecta el consumo de alimento y el peso vivo de los corderos alimentados a base de alfalfa, pero mejoró el rendimiento y los atributos deseables en la canal de corderos en finalización.

## 2.6 AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) la beca otorgada para sus estudios doctorales.

## 2.7 LITERATURA CITADA

- Aguerre, M., M. Carriquiry, A. L. Astessiano, C. Cajarville, and J. L. Repetto. 2015. Effect of sorghum grain supplementation on glucose metabolism in cattle and sheep fed temperate pasture. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 99: 465-473.
- Allen, M. S., B. J. Bradford, and M. Oba. 2009. Board-Invited Review: The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. *J. Anim. Sci.* 87: 3317-3334.
- Anil, M. H., and J. M. Forbes. 1988. The roles of hepatic nerves in the reduction of food intake as a consequence of intraportal sodium propionate administration in sheep. *Q. J. Exp. Physiol.* 73: 539-546.
- AOAC. 1997. Official Methods of Analysis, 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- Avila, J. S., A. V. Chaves, M. Hernandez-Calva, K. A. Beauchemin, S. M. McGinn, Y. Wang, O. M. Harstad, and T. A. McAllister. 2011. Effects of replacing barley grain in feedlot diets with increasing levels of glycerol on *in vitro* fermentation and methane production. *Anim. Feed Sci. Technol.* 166-167: 265-268.

- Avila-Stagno, J., A. V. Chaves, M. L. He, O. M. Harstad, K. A. Beauchemin, S. M. McGinn, and T. A. McAllister. 2013. Effects of increasing concentrations of glycerol in concentrate diets on nutrient digestibility, methane emissions, growth, fatty acid profiles, and carcass traits of lambs. *J. Anim. Sci.* 91: 829-837.
- Bradford, B. J., and M. S. Allen. 2007. Phlorizin administration does not attenuate hypophagia induced by intraruminal propionate infusion in lactating dairy cattle. *J. Nutr.* 137: 326-330.
- Colomer R., F., P. Morand-Fehr, A. H. Kirton, R. Delfa Belenguer, and I. Sierra Alfranca. 1988. Métodos normalizados para el estudio de los caracteres cuantitativos y cualitativos de las canales caprinas y ovinas. Instituto Nacional de Innovación Agrícola (INIA), Madrid. 41 p.
- Estrada-Angulo, A., M. A. López-Soto, C. R. Rivera-Méndez, B. I. Castro, F. G. Ríos, H. Dávila-Ramos, A. Barreras, J. D. Urías-Estrada, R. A. Zinn, and A. Plascencia. 2016. Effects of combining feed grade urea and a slow-release urea product on performance, dietary energetics and carcass characteristics of feedlot lambs fed finishing diets with different starch to acid detergent fiber ratios. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 29: 1725-1733.
- Farningham, D. A. H., and C. C. Whyte. 1998. The role of propionate and acetate in the control of food intake in sheep. *Br. J. Nutr.* 70: 37-46.
- Fluharty F. L., K. E. McClure, M. B. Solomon, D. D. Clevenger, and G. D. Lowe. 1999. Energy source and ionophore supplementation effects on lamb growth, carcass characteristics, visceral organ mass, diet digestibility, and nitrogen metabolism. *J. Anim. Sci.* 77: 816-823.
- Garrido M. D., S. Bañón, and D. Álvarez. Medida del pH. *In: Cañeque V. and C. Sañudo (eds).* 2005. Estandarización de las Metodologías para Evaluar la Calidad del Producto (Animal Vivo, Canal, Carne y Grasa) en los Rumiantes. España. Monografías INIA: 2005; Serie ganadera No. 3. pp: 206-215.
- Heimann, E., M. Nyman, and E. Degerman. 2014. Propionic acid and butyric acid inhibit lipolysis and de novo lipogenesis and increase insulin-stimulated glucose uptake in primary rat adipocytes. *J. Adipocyte.* 4: 81-88.

- Immonen, K., M. Ruusunen, K. Hissa, and E. Puolanne. 2000. Bovine muscle glycogen concentration in relation to finishing diet, slaughter and ultimate pH. *Meat Sci.* 55: 25-31.
- Lee-Rangel, H. A., G. D. Mendoza, and S. S. González. 2012. Effect of calcium propionate and sorghum level on lamb performance. *Anim. Feed Sci. Tech.* 177: 237-241.
- Liu, Q., C. Wang, W. Z. Yang, G. Guo, X. M. Yang, D. C. He, K. H. Dong, and Y. X. Huang. 2010. Effects of calcium propionate supplementation on lactation performance, energy balance and blood metabolites in early lactation dairy cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 94: 605-614.
- McGuffey, R. K. 2017. A 100-Year review: Metabolic modifiers in dairy cattle nutrition. *J. Dairy Sci.* 100: 10113-10142.
- McNamara, J.P., and F. Valdez. 2005. Adipose tissue metabolism and production responses to calcium propionate and chromium propionate. *J. Dairy Sci.* 88: 2498-2507.
- Mendoza-Martínez, G. D., J. M. Pinos-Rodríguez, H. A. Lee-Rangel, P. A. Hernández-García, R. Rojo-Rubio, and A. Relling. 2016. Effects of dietary calcium propionate on growth performance and carcass characteristics of finishing lambs. *Anim. Prod. Sci.* 56: 1194-1198.
- NMX-FF-106-SCFI-2006., 2006. Productos Pecuarios - Carne de Ovino en Canal – Clasificación. 21 P. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Estados Unidos Mexicanos. 21 p.
- NOM-033-ZOO-1995, Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. Estados Unidos Mexicanos. 17 p.
- Oba, M., and M. S. Allen. 2003. Extent of hypophagia caused by propionate infusion is related to plasma glucose concentration in lactating dairy cows. *J. Nutr.* 133: 1005-1112.
- Osorio-Teran, A. I., G. D. Mendoza-Martínez, L. A. Miranda-Romero, D. Martínez-Gomez, P. A. Hernández-García, and J. A. Martínez-García. 2017. Effect of

- calcium propionate and monensin on *in vitro* digestibility and gas production. Rev. Bras. Zootecn. 46: 348-353.
- Parsons, G. L., M. K. Shelor, and J. S. Drouillard. 2009. Performance and carcass traits of finishing heifers fed crude glycerin. J. Anim. Sci. 87: 653-657.
- Richardson, J.M., R. G. Wilkinson, and L. A. Sinclair. 2003. Synchrony of nutrient supply to the rumen and dietary energy source and their effects on the growth and metabolism of lambs. J. Anim. Sci. 81: 1332-1347.
- Sañudo Astiz, C. 2008. Carcass and meat lamb and kid quality and development of consumer acceptability. Rev. Bras. Zootecn. 37: 143-160.
- SAS, Statistical Analysis System. 2002. SAS/STAT 9 User's Guide. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc. 460 p.
- Sheperd, A. C., and D. K. Combs. 1998. Long-term effects of acetate and propionate on voluntary feed intake by midlactation cows. J. Dairy Sci. 81: 2240-2250.
- Van Soest, P. V., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci. 74: 3583-3597.
- Whitney, M. B., B. W. Hess, L. A. Burgwald-Balstad, J. L. Sayer, C. M. Tsopito, C. T. Talbott, and D. M. Hallford. 2000. Effects of supplemental soybean oil level on *in vitro* digestion and performance of prepubertal beef heifers. J. Anim. Sci. 78: 504-514.
- Zhang, Q., S. L. Koser, B. J. Bequette, and S. S. Donkin. 2015. Effect of propionate on mRNA expression of key genes for gluconeogenesis in liver of dairy cattle. J. Dairy Sci. 98: 8698-8709.

## **CAPITULO III. EFFECTS OF DIETARY CALCIUM PROPIONATE ON HYPOTHALAMIC NEUROPEPTIDE MESSENGER RNA EXPRESSION AND PERFORMANCE IN FINISHING LAMBS**

Effects of dietary calcium propionate on hypothalamic neuropeptide messenger RNA expression and performance in finishing lambs

Corresponding author: Dr. Héctor Lee-Rangel Listed co-author(s): Dr Luz Guerrero-González, Professor Juan Pinos, Professor German D. Mendoza, Dr. Alejandro Relling, Mr. Oswaldo Cifuentes, Dr Pablo Delgado-Sánchez.

Effects of dietary calcium propionate on hypothalamic neuropeptide messenger RNA expression and performance in finishing lambs

### **3.1 Abstract**

The objective of this experiment was to evaluate the effects of feeding different concentration of dietary calcium propionate on lamb performance, ruminal fermentation, blood glucose and insulin and hypothalamic mRNA expression for neuropeptide Y (NPY), agouti-related peptide (AgRP) and proopiomelanocortin (POMC). Thirty-two Rambouillet sheep (initial body weight  $27.4 \text{ kg} \pm 4.7 \text{ kg}$ ) were randomly assigned to one of the following treatments: 1) Control (CONT), a basal diet containing 93% alfalfa hay and 7% molasses (dry matter basis); 2) Low calcium propionate (LCP), inclusion of 30 g/kg dry matter (DM) in control diet; 3) Medium calcium propionate (MCP), inclusion of 35 g/kg DM in control diet; and 4) High calcium propionate (HCP), inclusion of 40 g/kg DM in control diet. At the end of the experiment, lambs were slaughtered and the hypothalamus was removed to evaluate mRNA concentration by quantitative rtPCR analyses using  $\beta$  actin as a housekeeping gene. Feed intake, daily gain and feed conversion were not affected ( $P>0.05$ ) by calcium propionate dietary inclusion. Total volatile fatty acids (VFA) ruminal concentration increased linearly ( $P<0.05$ ) as calcium propionate increased in diet. Hypothalamic mRNA concentration of NPY present a quadratic effect

( $P < 0.05$ ). The calcium propionate did not affect AgRP and POMC mRNA ( $P > 0.05$ ). In conclusion, dietary calcium propionate did not improve lamb performance and was not related with intake regulation through the hypothalamic gene expression of neuropeptide Y.

*Key words:* agouti-related peptide, proopiomelanocortin, neuropeptide Y, sheep, calcium propionate.

*Abbreviations*<sup>1</sup>

### **3.2 Introduction**

In intensive ruminant production systems, metabolic modifiers should be evaluated to maximize energy intake (Mendoza et al., 2008). The use of grains to increase energy intake, does not always improves energy consumption because high starch levels may reduce dry matter intake (Davis, 1967; Oba and Allen et al., 2003) and increase the acidosis risk. An alternative to increase energy intake without alter ruminal fermentation is the inclusion of glycolic compounds such as propylene glycol and calcium propionate. Calcium or sodium propionate have been used in ruminant rations to replace grains or as part of the diet (Lee-Rangel et al., 2012; Mendoza-Martinez et al., 2016), although it's excess decreases feed intake (Allen et al., 2005). Determining the ideal propionate concentrations in the rumen is of interest to ruminant nutritionists (Bradford et al., 2006).

Dry matter intake (DMI) is one important factor in ruminant production that determines the amount of nutrients available for production affecting the efficiency of feed utilization (Roche et al., 2007). It is recognized that DMI in ruminants is regulated by two main mechanisms; the physical, fill of the reticulo-rumen (Allen, 1996), and the physiological,

---

<sup>1</sup>ADG, average daily gain; DMI, Dry matter intake; ADF, acid detergent fibre; aNDF, neutral detergent fibre; BW, body weight; DM, dry matter; FC: feed conversion ratio; VFA, volatile fatty acid; NPY, neuropeptide Y; AgRP, agouti-related peptide; POMC, proopiomelanocortin.

by metabolites feedback (Conrad, 1964). The regulation of DMI is multifactorial in nature (Forbes, 2007).

Despite the fact that as much as 85% of propionate is used for glucose production in lactating cows (Steinhour et al., 1998), propionate oxidation may play a significant role in the regulation of DMI. This is important because propionate entry rates may exceed the capacity of gluconeogenic enzymes in animals fed highly fermentable diets and propionate not metabolized to glucose can be oxidized after its conversion to acetyl-CoA (Veenhuizen et al., 1988) resulting in increments in intracellular energy status that could lead to satiety signals and decreased meal size (Oba and Allen, 2003). Sheperd and Combs (1998), and Oba and Allen (2003) observed during ruminal propionate infusion an increase in plasma insulin and glucose concentration in dairy cattle. Research with non-ruminants and ruminants suggests that meals can be terminated by signals carried from the liver to the brain (via vagus nerve) and that these signals are affected by hepatic oxidation of substrate during the ATP generation (Allen, 2009). The Propionate is oxidized in the liver of ruminants, and has been considered a primary satiety signal (Allen and Bradford, 2006).

Neuropeptides known to increase appetite include neuropeptide Y (NPY) and agouti-related peptide (AgRP), while peptides derived from the proopiomelanocortin (POMC) gene decrease appetite (Valassi et al., 2008). The hypothalamic concentration of mRNA for NPY and AgRP was higher in fasting sheep than in those fed ad libitum (Adam et al., 2002). Relling et al. (2012) reported the direct effects of insulin and glucose, but not propionate on the hypothalamic concentration of these neuropeptides on ex vivo hypothalamic lamb tissue.

Therefore, this experiment was designed to evaluate the effects of increasing concentration of calcium propionate in rations for lambs on productive performance, and mRNA expression hypothalamic for the orexigenic neuropeptides NPY, AgRP, and the anorexic neuropeptide POMC.



### 3.3 Material and methods

The Animal Care and Use Committee of the Veterinary and Animal Science Faculties from the Universidad Autónoma de San Luis Potosí approved all procedures, and in compliance with regulations established by the Animal Protection Law and Sanitary Regulations enacted by the State of San Luis Potosí, México. All animal management procedures were conducted within the guidelines of Mexican approved techniques for animal use and care (NOM-051-ZOO-1995: humanitarian care of animals during mobilization of animals; NOM-062-ZOO-1995: technical specifications for the care and use of laboratory animals. Livestock farms, farms, centers of production, reproduction and breeding, zoos and exhibition halls, must meet the basic principles of animal welfare; NOM-024-ZOO-1995: animal health stipulations and characteristics during transportation of animals; and NOM-033-ZOO-1995: humanitarian care and animal protection during slaughter process). The experiment was conducted at Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Autónoma de San Luis Potosí Research Experimental Station, México.

#### 3.3.1 *Animals and diets*

Thirty-two Rambouillet wethers (initial weight  $27.93 \pm 4.6$  kg) were randomly assigned to one of four experimental diets: 1) a control diet (CONT) containing 93% alfalfa hay, 7% molasses and not containing calcium propionate; 2) Low calcium propionate (LCP), inclusion of 30 g/kg dry matter (DM) in control diet; 3) Medium calcium propionate (MCP), inclusion of 35 g/kg DM in control diet; and 4) High calcium propionate (HCP), inclusion of 40 g/kg DM in control diet (Table 1). These doses were selected due to results in a previous study in which increase dose of calcium propionate improve performance (Mendoza et al., 2016). Diet was offered as a total mixed ration and elaborated with alfalfa hay, and cane molasses to give consistency and reduce dustiness of food. The lambs were housed in individual cages equipped with feed and water bowls. Feed was provided at 08:00 and 15:00 h. Lambs were adapted to their diets for 10 days (without calcium propionate), and the study lasted 42 days (6 August – 16 October 2015). All lambs had free access to feed to ensure 100 g oforts per kg of the amount fed daily.

### 3.3.2. *Feed analysis*

Daily samples of feed and orts were combined every 14 days. Dry matter (ID 934.01) and total nitrogen (ID 984.13) in the diets were analyzed according to the AOAC (1999) (Table 1). Neutral detergent fibre (aNDF) and acid detergent fibre (ADF) analyses were carried out according to Van Soest et al. (1991). Sodium sulfite and heat-stable amylase were used in analysis of aNDF. Both aNDF and ADF are expressed inclusive of residual ash.

### 3.3.3 *Growth assay*

The study lasted 42 days after an adaptation period (10 d). During those 42 days, DMI was recorded daily and lambs were weighed at the beginning (d1) and on day 42 of the experiment to evaluate body weight and estimate average daily gain (ADG). Feed conversion (FC) was expressed as the ratio of feed intake to ADG. On day 42, blood samples (8 ml) were collected via venipuncture from the jugular vein with a lithium-heparin vacutainer and a 20G needle. After the blood sampling, lambs were euthanized by captive bolt and exsanguinated in fasting condition. The top of the skull was removed using a hand saw and the hypothalamus was removed using a scalpel as described by Glass et al. (1984). Briefly, the frontal land mark for the hypothalamus is the optic chiasm and the caudal of the optic chiasm is the third ventricle. The first incision was at 1.2-cm lateral cut behind the optic chiasm, and two frontal–caudal cuts of 1.5 cm were made parallel to the third ventricle. The fourth cut was close to the rectangular area and a final cut was made at a depth of 0.6 cm to provide a cube-shaped tissue sample with dimensions of 1.2 by 1.5 by 0.6 cm. The hypothalamic tissues were flash-frozen in liquid N<sub>2</sub> and stored at -80 °C until RNA was extracted.

### 3.3.4 *Rumen fermentation*

Rumen fluid (50 mL) was obtained when the animals were euthanized and pH was measured (pH meter Benchtop Cole Parmer 05669-20, Vernon Hills, IL, USA). Then, ruminal fluid was acidified with 1 mL of sulfuric acid (300 g/L) and stored in a freezer (-20°C) for further analyses of volatile fatty acids (VFA) (Lee-Rangel et al. 2012). The

concentration of VFA was measured by gas chromatography in samples prepared with metaphosphoric acid (Erwin et al., 1961).

### *3.3.5 Analytic methods for insulin and glucose*

Insulin analyses were completed using a commercial kit (Sigma Aldrich RAB0568. ELISA Kit). The range of the assay was 0.1 to 2.5 µg/L. The inter-assay and intra-assay coefficients of variance were 7.0% and 4.4%, respectively. Glucose was analyzed from plasma by the glucose oxidase procedure (Barham and Trinder, 1972).

### *3.3.6 Gene Expression Analysis*

Total RNA was extracted from frozen tissue using a two-step purification protocol with total RNA first being extracted from whole tissue using QuickRNA MiniPrep Kit® (Zymo Research Corp, Life Technologies, Inc.) including a DNase treatment according to the manufacturers' recommendations. Total RNA was quantified using a BioTek Synergy 4 plate reader utilizing the Take3 system (BioTek U.S., Winooski, VT) with all samples exhibiting an OD 260/280 between 1.8 and 2.0 and an OD 260/230 value between 1.8 and 2.2. Spectral scans ranging from 200 to 400 nm further verified sample purity as all RNA samples produced smooth curves exhibiting 1 peak at 260 nm. Total RNA integrity was assessed both visually by resolving 3 µl of RNA on a denaturing formaldehyde gel containing ethidium bromide and by determining an RNA Integrity Number (RIN) using an Bioanalyzer (Benchtop UV, Biodocit Imaging System, Transilluminator). All samples demonstrated sharp ribosomal bands with a 28S to 18S ratio greater than 1 and RIN values greater than 7.0 and were thus judged intact and non-degraded. One Step Real-time PCR was performed on the resultant total RNA using a Step-One Plus Real-time PCR (Applied Biosystems) machine and Power SYBR® Green RNA-to-Ct Master Mix (Applied Biosystems Foster City, CA, USA) according to manufacturer's directions in a reaction volume of 10 µL consisting of 5.48 µL of master mix and 3.52 µL of H<sub>2</sub>O containing 100 ng of RNA and 1 µM each of the forward and reverse primers under the following conditions: 1 pre-incubation step of 5m at 94°C followed by 45 cycles with each cycle consisting of a melt step of 30s at 95°C, and annealing step of 45s at 48°C, and an elongation step of 45s at 72°C. Each sample was run in 3 separate PCR runs with resulting

Cp values averaged across values obtained from 3 separate plates. All PCR reactions were performed using intron-spanning primers under optimized conditions with primer efficiencies ranging between 90 and 100% (Table 2) as verified with standard curves. All primers were designed to have an optimal annealing temperature of 67°C. Product purity was assessed by melting curve analysis utilizing Step-One Software 2.2.2 (Applied Biosystems). We used a control sample to verify that amplification was not provided for genomic DNA. Data were expressed as fold change relative to baseline and calculated according to Pfaffl (2010).

### *3.3.7 Statistical analyses*

The results were analyzed as a complete randomized design (Steel et al. 1997) with the Proc Mixed of SAS (9.4). The model included the fixed effect of the treatment and the random effect of the lamb. Initial body weight was used as a covariate only for the productive variables (Total BWG, ADG, DMI and DMI/ADG). Orthogonal polynomial contrasts were used to verify linear or quadratic effects for calcium propionate level on lamb performance, ruminal fermentation, blood glucose and insulin and hypothalamic mRNA expression for neuropeptide Y (NPY), agouti-related peptide (AgRP) and proopiomelanocortin (POMC). The P-value of 0.05 was selected as the significance level. Contrast coefficients for the polynomial contrast were based on unequal spacing of dosages between treatments (IML procedure of SAS). Simple correlations were calculated among plasma analysis and gene expression traits using the PROC CORR procedure of SAS.

## **3.4 Results and discussion**

### *3.4.1 Animal performance*

Dietary calcium propionate did not affect final body weight and average daily gain (Table 3). Efficiency of utilization of calcium propionate may be similar to propionic acid which has a gross energy of 3.96 Mcal/kg DM and a greater daily gain would be expected (Lee-Rangel et al., 2012; Mendoza-Martinez et al., 2016), although it was not confirmed in the current study. In spite of lambs fed diets with calcium propionate at 0, 30, 35 and 40 g/kg

DM had an daily intake of 172.8, 205.6 and 231.9 mmol of propionate, respectively, the feed intake was not affected (Table 3), therefore no hypophagic effects of calcium propionate were observed. Neither Lee-Rangel et al. (2012) and Mendoza-Martinez et al. (2016) found hypophagic effects of calcium propionate at daily intake of 64.3 and 130.27 mmol of propionate in finishing lambs. Hypophagic effects of propionate had been found more frequently when it was infused in rumen, portal or mesenteric veins (Anil and Forbes, 1988; Leuvenink et al., 1997; Bradford and Allen, 2007). Although when propionate was included in diets, the hypophagic effects have been scarce (McNamara and Valdez, 2005) or null (Beem, 2003; DeFrain et al., 2005; Zhang et al., 2015). The inconsistent effects of propionate on feed intake have been related with differences in doses, diet quality (forage: concentrate proportion) and metabolism balance of the animal (Liu et al., 2009; Stocks and Allen (2013). In the present study we found that the use of calcium propionate into the diet decrease until a 6% the feed intake during period 1 of this experiment (first 14 days) between CONT, LCP, MCP and HCP (1419.2, 1324.7, 1336, 1387 g/d;  $P = 0.01$  for interaction (time x treatment) agree with previous results (Oba and Allen, 2003; Stocks and Allen, 2012; Stocks and Allen, 2013) but in other periods intake was not affected transiently by treatment (no time x treatment). For example, hypophagic effects of propionate were more evident in dairy cows in early lactation than later, as a result that the negative energy balance induces a high mobilization of propionate as reported by Reynolds et al. (2003) who reported that in the first pass through the portal vein, the propionic acid is extracted up to 70%.

#### *3.4.2 Rumen fermentation*

Polynomial analysis indicated no effect ( $P < 0.05$ ) of doses of calcium propionate on ruminal pH, butyrate, propionate, and acetate:propionate ratio. Total VFA present a linear increase ( $P = 0.04$ ; table 3) as increase PrCa concentration and molar proportion of acetate increases linearly ( $P = 0.01$ ; table 3). The main differences were found in lambs fed with calcium propionate at 40 g/kg DM compared with control lambs. The lowest pH values, molar proportion of acetate and acetate:propionate ratio where found in lambs fed calcium propionate at 40 g/kg DM. The same lambs showed the highest total VFA and molar proportion of propionate. The reduction of pH values by calcium propionate could be

related with increment of total VFA and molar proportion of propionate, in agreement with previous studies with lambs (Lee-Rangel et al., 2012; Mendoza-Martinez et al., 2016) and steers (Fellner and Spears, 2005).

#### *3.4.3 Plasma glucose and insulin concentration*

The main effects of Ca prop on plasma glucose and insulin were found in lambs fed 40 g/kg DM. Lambs fed calcium propionate at 40 g/kg DM had a linear lower ( $P=0.04$ ) plasma glucose (Figure 1) and plasma insulin present a linear increase ( $P=0.03$ ; Figure 2) than lambs fed calcium propionate at 0, 30 and 35 g/kg DM.

The excess of propionate flowing from the rumen to the liver can increase its hepatic oxidation since insulin and glucagon regulate the maximum rate of gluconeogenesis.

Previous studies have shown that insulin potentiates or enables central effects of numerous metabolites and hormones on DMI (Forbes, 2002). Animals with high blood glucose and low insulin concentrations commonly have hyperphagia (Booth, 1972). These animals also have an increased expression of the orexigenic peptides (NPY and AgRP) and a reduced expression of anorexigenic POMC in the hypothalamic arcuate nucleus (Sindelar et al., 2002).

#### *3.4.5 NPY, AgRP and POMC expression*

The hypothalamic concentration of NPY present a quadratic effect ( $P=0.003$ ; Figure 3). In contrast, AgRP and POMC mRNA were not affected ( $P>0.05$ ; Figure 4 and 5) by the increases in dietary propionate concentration. For NPY to be considered an appetite regulator, it must also be capable of stimulating an increase in DMI in ad libitum fed sheep. Indeed, intracerebroventricular (ICV) injection of NPY in sheep resulted in a pronounced increase in DMI (Whitlock et al., 2005). This effect of NPY to increase feed intake was also significant in the presence of rumen distention or propionate infusion (Miner et al., 1990).

Lee et al. (2005) showed a decrease in NPY and AgRP mRNA concentration in mice hypothalami incubated with increasing concentrations of glucose, but reported no changes

in POMC concentrations in response to glucose. These effects of glucose on NPY and AgRP expression in mice (Lee et al., 2005) support the glucostatic theory of regulation of feed intake proposed by Mayer (1953), and the lack of an effect of glucose on these neuropeptides in our study supports the hypothesis that glucose has a minimal role as a regulator of appetite in ruminants (Manning et al., 1959). The signals that may influence the decrease in mRNA concentrations for NPY and AgRP for the ad libitum-fed lambs are the increased plasma concentrations of insulin and cholecystokinin (CCK), or pre-feeding ghrelin. It has been shown in rat models that central administration of insulin decreases NPY mRNA concentration (Schwartz et al., 1992). Relling et al. (2009) observed an increase of plasma insulin and decreased hypothalamic mRNA expression of NPY and AgRP in lambs fed ad libitum resulting in an increase consumption of metabolisable energy (ME), but they observed a decrease in mRNA for neuropeptides that stimulate DMI (NPY and AgRP) in lambs offered feed ad libitum compared with fed restricted intake. Results are consistent with present research where the addition of calcium propionate could increase the metabolic energy, although we use high forage diets. Mendoza et al. (2016) mentioned that the efficiency of utilizing calcium propionate may be similar to the propionic acid and a gross energy of 3.965 Mcal/kg can be estimated to metabolic energy of 3.766 Mcal/k, values for ME were CONT= 3.81 Mcal ME/k DM; LCP= 3.63 Mcal ME/k DM; MCP= 3.70 Mcal ME/kg DM; and HCP= 3.67 Mcal ME/kg DM, the regulation of feed intake in this case is not mediated by effect of ME consumption and the correlation between NPY mRNA abundance and ME consumption was -0.30. But in the present study, that association was not observed between plasma insulin concentration and NPY mRNA concentration ( $r=0.35$ ;  $P=0.25$ ). Concentration of mRNA for AgRP was also increased in sheep with a low body condition score compared to sheep with a high body condition score (Archer et al., 2004). Interestingly, feed restriction did not alter mRNA concentration for the receptor targets of AgRP (Iqbal et al., 2001). Agouti related peptide increases appetite by inhibition of a receptor that inhibits appetite (or an inverse agonist). Injection of AgRP into the lateral ventricle of ad libitum fed sheep resulted in an increase in cumulative feed intake. The effect was present between 4 and 12 h, but unlike other animal models, the effect on feed intake did not persist to 24 h (Wagner et al., 2004). Thus, like NPY, this neurotransmitter is clearly neural regulation

of feed intake, an appetite regulator in sheep, and perhaps may provide a unique opportunity to manipulate appetite in disease, stress and/or other metabolic problems related to a reduction in feed intake (Sartin et al., 2010).

Hypothalamic POMC mRNA concentration did not change because of the amount of DMI (restricted vs. ad libitum-fed wethers) (Relling et al. 2010). Relling et al. (2012) found that high glucose affects POMC expression in the presence of insulin, suggesting that under certain conditions glucose may have an effect on specific neuropeptides in ruminants, but that insulin is required to mediate that effect. They also found that on ex vivo hypothalamus culture showed that insulin, not glucose alone, had an effect on POMC expression and the combination of glucose and insulin increased POMC expression. This suggests that as observed in non-ruminants, insulin is required for effects of elevated glucose concentration on hypothalamic expression of mRNA for POMC in ruminants. Insulin alone did not affect POMC expression, further suggesting hypothalamic glucose is a mediator of insulin-induced satiety signals.

### **3.5 Conclusions**

The addition of calcium propionate in high forage diets did not modify the productive performance of lambs, but changed the VFA profile, modified glucose and insulin blood concentration and is not related with the intake regulation through the hypothalamic gene expression of neuropeptide Y.

### **3.6 Acknowledgments**

The first author acknowledges the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for his doctoral fellowship.

### **3.7 References**

Adam, C. L., Z. A. Archer, P. A. Findlay, L. Thomas, and M. Marie. 2002. Hypothalamic gene expression in sheep for cocaine- and amphetamine-regulated transcript, pro-opiomelanocortin, neuropeptide Y, agouti-related peptide and leptin receptor and responses to negative energy balance. *Neuroendocrinology* 75: 250–256.



- Allen, M. S. 1996. Physical constraints on voluntary intake of forages by ruminants. *J. Anim. Sci.* 74:3063-3075.
- Allen, M. S.; Bradford, B. J. and Harvatine, K. J. 2005. The cow as a model to study food intake regulation. *Annu. Rev. Nutr.* 25: 523-547.
- Allen, M. S. and Bradford, B. J. 2006. From the liver to the brain: increasing feed intake in transition cows. Pp. 115-124. Proc. 68th Meeting of the Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers, Department of Animal Science, Cornell University, Ithaca, NY 14850
- Allen, M. S., B. J. Bradford, and M. Oba. 2009. The hepatic oxidation theory of the control of feed intake and its application to ruminants. *J. Anim. Sci.* 87:3317–3334
- Anil, M. H., and J. M. Forbes. 1988. The roles of hepatic nerves in the reduction of food intake as a consequence of intraportal sodium propionate administration in sheep. *Exp. Physiol.* 73:539–546.
- AOAC. 1999. Official methods of analysis .16th edn. Association of Official Analytical Chemists: Arlington, VA.
- Barham, D., and P. Trinder. 1972. An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst*, 97: 142-145.
- Beem, A. E., 2003. Use of urine pH to predict incidence of ketosis in transition dairy cows. M.S. Thesis. Louisiana State University, Baton Rouge, LA (USA).
- Benson, J. A., C. K. Reynolds, P. C. Aikman, B. Lupoli, and D. E. Beever. 2002. Effects of abomasal vegetable oil infusion on splanchnic nutrient metabolism in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:1804–1814.
- Booth, D. A. 1972. Some characteristics of feeding during streptozotocin-induced diabetes in the rat. *J. Comp. Psychol.* 80:238–249.
- Bradford, B. J., and M. S. Allen. 2007. Phlorizin administration does not attenuate hypophagia induced by intraruminal propionate infusion in lactating dairy cattle. *J. Nutr.* 137:326–330.
- Bradford, B. J., K. J. Harvatine, and M. S. Allen. 2008. Dietary unsaturated fatty acids increase plasma glucagon-like peptide-1 and cholecystokinin and may decrease premeal ghrelin in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:1443–1450.
- Bradford, B. J., A. D. Gour, A. S. Nash, and M. S. Allen. 2006. Propionate challenge tests have limited value for investigating bovine metabolism. *J. Nutr.* 136:1915–1920.
- Colomer-Rocher, F. 1984. Metodología de Clasificación de Canales Ovinas (Methodology to classify carcass in lambs). Madrid, Spain: Oleaginosas Españolas.

- Conrad, H. R., A. D. Pratt, and J. W. Hibbs. 1964. Regulation of feed intake in dairy cows. I. Change in importance of physical and physiological factors with increasing digestibility. *J Dairy Sci.* 47: 54-62.
- Davis, C. L. 1967. Acetate production in the rumen of cows fed either control or low-fiber, high-grain diets. *J. Dairy Sci.* 50, 1621–1625.
- DeFrain, J. M., A. R. Hippen, K. F. Kalscheur, and P. W. Jardon. 2004. Feeding glycerol to transition dairy cows: effects on blood metabolites and lactation performance. *J. Dairy Sci.* 87:4195–4206.
- DeJong, A. 1982. Patterns of plasma concentrations of insulin and glucagon after intravascular and intraruminal administration of volatile fatty acids in the goat. *J. Endocrinol.* 92:357–370.
- Eisemann, J. H., and G. B. Huntington. 1994. Metabolite flux across portal-drained viscera, liver, and hindquarters of hyperinsulinemic, euglycemic beef steers. *J. Anim. Sci.* 72:2919–2929.
- Erwin E. S., G. J. Marco, and E. Emery. 1961. Volatile fatty acid analysis of blood and rumen fluid by gas chromatography. *J. Dairy Sci.* 44:1768–1776.
- Fellner V., and J. W. Spears. 2005. Effect of calcium propionate on ruminal soluble calcium and microbial fermentation. North Carolina State University. Animal Science Departmental Report. 2004-2005. Available on: [http://www.ncsu.edu/project/swine\\_extension/swinereports/2004-2005/beefcattle/nutrition/fellner.htm](http://www.ncsu.edu/project/swine_extension/swinereports/2004-2005/beefcattle/nutrition/fellner.htm) (Date: 07/09/2015).
- Ferraro, S. M., G. D. Mendoza, L. A. Miranda, and C. G. Gutiérrez. 2009. In vitro gas production and ruminal fermentation of glycerol, propylene glycol and molasses. *Anim. Feed Sci. Technol.* 154:112–118.
- Forbes, J. M. 2007. Voluntary Food Intake and Diet Selection in farm Animals. 2nd edition. CAB Int, Wallingford, UK. Allen MS, Bradford BJ, Harvatine KJ. The cow as a model to study food intake regulation. *Annu Rev Nutr.* 25:523–47.
- Glass, J. D., R. P. Amann, and T. M. Nett. 1984: Effects of season and sex on the distribution of cytosolic estrogen receptors within the brain and the anterior pituitary gland of sheep. *Biol. Reprod.* 30:894–902.
- Huntington, G. B., D. L. Harmon, and C. J. Richards. 2006. Sites, rates, and limits of starch digestion and glucose metabolism in growing cattle. *J. Anim. Sci.* 84(E. Suppl.):E14–E24
- Istasse, L., F. D. DeB Hovell, N. A. Macleod, and E. R. Orskov. 1987. The effects of continuous or intermittent infusion of propionic acid on plasma insulin and milk

- yield in dairy cows nourished by intragastric infusion of nutrients. *Livest. Prod. Sci.* 16:201–214.
- Jean, B. E. 2005. Effect of calcium supplementation on ruminal soluble calcium concentrations and ruminal fermentation. Thesis M.Sc. North Carolina State University. USA. 58 p.
- Lee, K., B. Li, X. Xi, Y. Suh, and R. J. Martin. 2005. Role of neuronal energy status in the regulation of adenosine 5 $\phi$ -monophosphate-activated protein kinase, orexigenic neuropeptides expression, and feeding behavior. *Endocrin.* 146:3–10.
- Lee-Rangel, H. A., G. D. Mendoza, and S. S. González. 2012. Effect of calcium propionate and sorghum level on lamb performance. *Anim. Feed Sci. Tech.* 177:237–241.
- Leuvenink, H.G.D., E. J. B. Bleumer, L. G. M. Bongers, J. VanBruchem, and D. VanDerHeide. 1997. Effect of short-term propionate infusion on feed intake and blood parameters in sheep. *Am J Physiol.* 272:997–1001.
- Liu, Q., C. Wang, G. Guo, W. Z. Yang, K. H. Dong, Y. X. Huang, X. M. Yang, and D. C. He. 2009. Effects of calcium propionate on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. *J. Agr. Sci.* 14:201–209.
- Liu, Q., C. Wang, W. Z. Yang, G. Guo, X. M. Yang, D. C. He, K. H. Dong, and Y. X. Huang. 2009. Effects of calcium propionate supplementation on lactation performance, energy balance and blood metabolites in early lactation dairy cows. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 1111:605–614.
- McCullough, H. 1967. The determination of ammonia in whole blood by direct colorimetric method. *Clin. Chim. Acta.* 17:297-298.
- McNamara, J. P., and F. Valdez. 2005. Adipose tissue metabolism and production responses to calcium propionate and chromium propionate. *J. Dairy Sci.* 88:2498–2507.
- Mendoza, M. G. D., R. A. Britton, and R. A. Stock. 1993. Influence of ruminal protozoa on site and extent of starch digestion and ruminal fermentation. *J. Anim. Sci.* 71:1572–1578.
- Mendoza, M. G. D., P. F. X. Plata, C. R. Espinoza, and B. A. Lara. 2008. Manejo nutricional para mejorar la utilización de la energía en bovinos. vol. 24. Universidad y Ciencia, UJAT. 24: 1–13 (Eng. Abstr.).
- Mendoza-Martínez, G. D., J. M. Pinos-Rodríguez, H. A. Lee-Rangel, P. A. Hernández-García, R. Rojo-Rubio, and A. Relling. 2016. Effects of dietary calcium propionate on growth performance and carcass characteristics of finishing lambs. *Anim. Prod. Sci.* 56: 1194-1198.

- Miranda, L.A., Lee-Rangel, H.A., Mendoza-Martínez, G.D., Crosby-Galván, M., Relling, A., Pinos-Rodríguez, J.M., Rojo, R.R. and González, M. 2017. Influence of calcium propionate on in vitro fermentation of sorghum-based diets. *Revista FCA UNCUYO* 49: 185-192.
- Oba, M., and M. S. Allen. 2003. Extent of hypophagia caused by propionate infusion is related to plasma glucose concentration in lactating dairy cows. *J. Nutr.* 133:1005–1012.
- Parsons, G. L., M. K. Shelor, and J. S. Drouillard. 2009. Performance and carcass traits of finishing heifers fed crude glycerin. *J. Anim. Sci.* 87:653–657.
- Pfaffl, M. W. 2010. The ongoing evolution of qPCR. *Methods* 50: 215–216.
- Relling A. E., K. Lee, S. C. Loerch and C. K. Reynolds. 2011. Effects of glucose, propionate and splanchnic hormones on neuropeptide mRNA concentrations in the ovine hypothalamus. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 96:648–654
- Relling, A. E., and C. K. Reynolds. 2007. Feeding rumen-inert fats differing in degree of saturation decreases intake and increases plasma concentrations of gut peptides in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:1506–1515.
- Reynolds, C. K., P. C. Aikman, B. Lupoli, D. J. Humphries, and D. E. Beaver. 2003. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. *J. Dairy Sci.* 86:1201–1217.
- Roche, J. R., A. J. Sheahan, L. M. Chagas, and D. P. Berry. 2007. Concentrate supplementation reduces postprandial plasma ghrelin in grazing dairy cows: a possible neuroendocrine basis for reduced pasture intake in supplemented cows. *J. Dairy Sci.* 90:1354-1363.
- Sano, H, and T. Fujita. 2006. Effect of supplemental calcium propionate on insulin action to blood glucose metabolism in adult sheep. *Reprod. Nutr. Dev.* 46:9–18.
- Sartin, J. L., J. A. Daniel, B. K. Whitlock, and R. R. Wilborn. 2010. Selected hormonal and neurotransmitter mechanisms regulating. *Anim.* 11:1781–1789
- Schwartz, M. W., A. J. Sipols, J. L. Marks, G. Sanacora, J. D. White, A. Scheurink, S. E. Kahn, D. G. Baskin, S. C. Woods, D. P. Figlewicz, and D. Porte. 1992. Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *J. Endocrinol.* 130:3608–3616.
- Sheperd, A. C., and D. K. Combs. 1998: Long-term effects of acetate and propionate on voluntary feed intake by midlactation cows. *J. Dairy Sci.* 81:2240–2250.
- Sindelar, D. K. P. Mystkowski, D. J. Marsh, R. D. Palmiter, and M. W. Schwartz. 2002. Attenuation of diabetic hyperphagia in neuropeptide Y-deficient mice. *Diabetes* 51:778–783.

- Smith, D. L., Stinefelt, B. M., Blemings, K. P., and M. E. Wilson. 2006. Diet-induced alterations in progesterone clearance appear to be mediated by insulin signaling in hepatocytes. *J. Anim. Sci.* 84: 1102-1109.
- Steel, G.D., Torrie, R. and Dickey, D.A. 1997. Principles and procedures of statistics: A biometrical approach. McGraw-Hill, New York, USA.
- Steinhour, W. D., and D. E. Bauman. 1988. Propionate metabolism: a new interpretation. In: Dobson A, Dobson MJ, editors. Aspects of digestive physiology in ruminants. Ithaca, NY: Comstock Pub. Associates. p. 238–56.
- Stocks, S. E., and M. S. Allen. 2012. Hypophagic effects of propionate increase with elevated hepatic acetyl coenzyme A concentration for cows in the early postpartum period. *J. Dairy Sci.* 95(6):3259-3268.
- Stocks, S. E., and M. S. Allen. 2013. Hypophagic effects of propionic acid are not attenuated during a 3-day infusion in the early postpartum period in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 96(7):4615-4623.
- Trabue, S., K. Scoggin, S. Tjandrakusuma, M. A. Rasmussen, and P. J. Reilly. 2007. Ruminal fermentation of propylene glycol and glycerol. *J. Agric. Food Chem.* 55:7043–7051.
- Valassi, E., M. Scacch, and F. Cavagnini. 2008. Neuroendocrine control of food intake. *Nutr. Metab. Cardiovas.* 18:158–168.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583–3597.
- Veenhuizen, J. J., R. W. Russell, and J. W. Young. 1988. Kinetics of metabolism of glucose, propionate and CO<sub>2</sub> in steers as affected by injecting phlorizin and feeding propionate. *J Nutr.* 118:1366–75.
- Wieghart, M., R. Slepatis, J. M. Elliot, and D. R. Smith. 1986. Glucose absorption and hepatic gluconeogenesis in dairy cows fed diets varying in forage content. *J. Nutr.* 116:839–850.
- Zhang, X. Z., Q. X. Meng, L. Lu, Z. L. Cui, and L. P. Ren. 2015. The effect of calcium propionate supplementation on performance, meat quality, and mRNA expression of finishing steers fed a high-concentrate diet. *J. Anim. Feed Sci.* 24:100-106

**Table 1**

Experimental diets and chemical composition

	Calcium Propionate g/kg (DM)			
	0	30	35	40
Ingredient, g/kg DM				
Alfalfa hay, ground	930	900	895	890
Molasses cane	70	70	70	70
Calcium propionate <sup>a</sup>	0	30	35	40
Chemical composition (g/kg DM)				
Dry matter	905	900	898	899
Crude protein	185	177	172	172
Ether extract	24.3	24.4	21.8	21.7
Neutral Detergent Fiber	539	542	515	506
Acid Detergent fiber	256	256.1	239.2	229.3
Ash	9.14	9.21	9.81	11.1

<sup>a</sup>Propionic acid 780 g/kg and Ca 220 g/kg.**Table 2** Primer sequences used for the reverse transcriptase quantitative PCR

Item	Forward sequence 5' to 3'	Reverse sequence 5' to 3'
NPY	5'-CCC TTC TAT GTG GTG ATG GGA-3'	5'-TGG GAG GAC TGG CAG ACT C-3'
AgRP	5'- GAC CCG TGC GCC ACG TGC TAT -3'	5'-GAG GAA CCT TCG CCC CTG CC -3'
POMC	5'-GCG CTA AGC CAA ACG CCC CTT G-3'	5'-GCC TTC GGG GTC AAC CTT CCG-3'

NPY, neuropeptide Y; AgRP, agouti-related peptide; POMC, proopiomelanocortin.

**Table 3**

Growth performance and rumen traits of lambs fed with different level of calcium propionate.

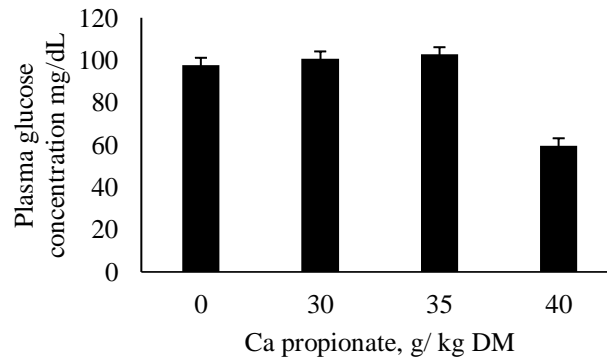
	Calcium Propionate g/kg DM				SEM	<i>P</i> -value	
	0	30	35	40		Linear	Quadratic
Growth performance							
Initial BW, kg	25.1	28.4	27.6	28.6	0.33	0.55	0.42
Final BW, kg	34.0	37.4	35.8	36.4	0.29	0.11	0.24
Total BW gain, kg	8.9	9.0	8.2	7.8	0.75	0.53	0.64
Average daily gain (ADG), kg/d	0.221	0.223	0.204	0.195	0.01	0.53	0.64
Dry matter intake (DMI), g/d	1.57	1.49	1.52	1.50	0.04	0.38	0.32
DMI/ADG, kg/g	7.6	7.1	7.5	7.9	0.87	0.79	0.58
ADG/DMI, g/kg	0.004	0.004	0.003	0.003	0.001	0.22	0.99
Rumen characteristics							
pH	7.1	6.7	7.1	6.3	0.25	0.86	0.22
Total VFA, mmol/L	35.4	65.9	61.0	73.6	6.60	0.04	0.14
Acetate, mol/100 mol	69.1	66.2	67.1	66.1	0.86	0.01	0.15
Propionate, mol/100 mol	18.3	21.4	19.4	21.5	0.44	0.20	0.14
Butyrate, mol/100 mol	12.6	12.4	13.5	12.4	0.11	0.11	0.21
Acetate:propionate ratio	3.8	3.1	3.5	3.1	0.19	0.54	0.29

BW, body weight; VFA, volatile fatty acids; SEM, standard error of the mean. Significance values for initial BW as a covariate:

DMI *P*-value=0.58; ADG *P*-value=0.67; Total BW *P*-value=0.67; DMI/ADG *P*-value=0.55; ADG/DMI *P*-value=0.55.

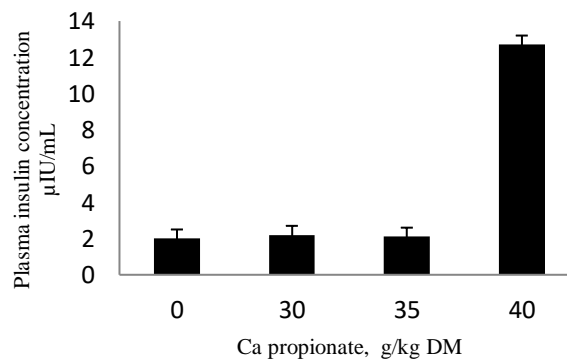
**Figure 1**

Effect of dietary inclusion of calcium propionate on blood glucose of growing lambs at day 43 of fattening. Linear effect ( $p=0.04$ ); quadratic effect ( $p=0.53$ ).



**Figure 2**

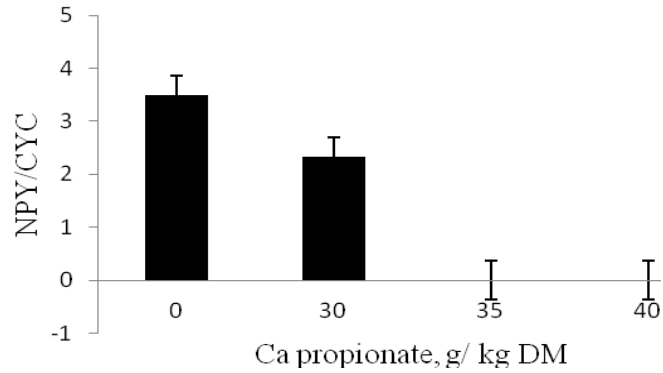
Effect of dietary inclusion of calcium propionate on blood insulin of growing lambs at day 43 of fattening. Linear effect ( $p=0.03$ ); quadratic effect ( $p=0.62$ ).





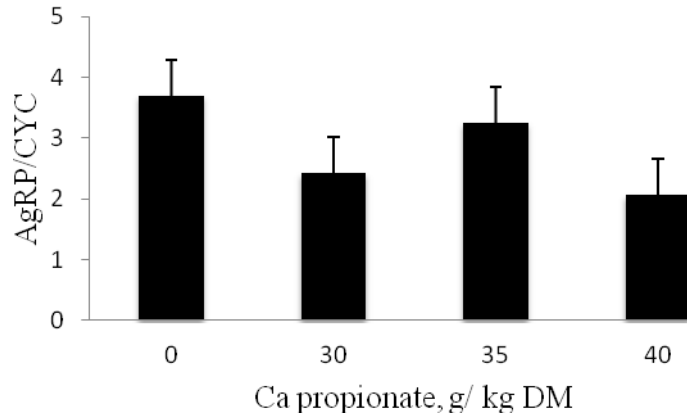
**Figure 3**

*In vivo* hypothalamic sheep neuropeptide Y mRNA concentration (normalized with cyclophilin B; CYC) in lambs feed with different levels of calcium propionate at day 43 of fattening. Linear effect ( $p=0.33$ ); quadratic effect ( $p=0.009$ ).



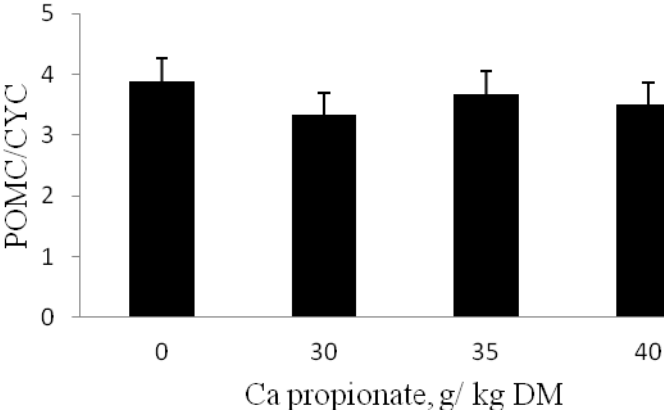
**Figure 4**

*In vivo* hypothalamic sheep AgRP mRNA concentration (normalized with cyclophilin B; CYC) in lambs feed with different levels of calcium propionate at day 43 of fattening. Linear effect ( $p=0.33$ ); quadratic effect ( $p=0.10$ ).



**Figure 5**

*In vivo* hypothalamic sheep POMC mRNA concentration (normalized with cyclophilin B; CYC) in lambs feed with different levels of calcium propionate at day 43 of fattening  
Linear effect (p=0.39); quadratic effect (p=0.88).



## CAPITULO 4. CONCLUSIÓN GENERAL

La utilización de propionato de calcio en dietas basadas en forraje, para la engorda de corderos es una alternativa para mejorar los rendimientos en canal, no se afecta el consumo de materia seca ni el desempeño productivo de los corderos con el aumento en la inclusión, sin embargo se requieren más estudios para evaluar el efecto de la adición de propionato de calcio directo en la dieta sobre la salud de los animales. En lo que respecta al metabolismo, el nivel de ácido propiónico no tiene efecto con la expresión génica de NPY, AgRP y POMC, aun así se describe un efecto sobre los parámetros de fermentación ruminal y las concentraciones plasmáticas de glucosa e insulina, lo cual hace pertinente el desarrollo de ensayos de fermentación ruminal *in vitro* e *in vivo*, así como también la evaluación *in vivo* de las concentraciones plasmáticas de glucosa e insulina en respuesta a los niveles crecientes de propionato de calcio dietario.