# EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON VITAMINA E EN LOS ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS Y EN LA EXPRESION DE GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO LIPÍDICO EN *L. THORACIS* DE CORDEROS LIGEROS

L. González-Calvo[1], G. Ripoll[1], F. Molino[1], L. Pérez-Velasco[1], P. Sarto[1], M. Serrano[3], M. Joy[1], J. H. Calvo[1, 2]

[1]Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA). Avda. Montañana, 930, 50059, Zaragoza. lgonzalezc@aragon.es. [2] ARAID. [3] INIA, Madrid

## INTRODUCCIÓN

La adición de vitamina E en los concentrados es un método efectivo para reducir la oxidación de los productos cárnicos y aumentar su vida útil (Ripoll et al., 2013). La vitamina E es un antioxidante lipo-soluble ampliamente usado en las dietas de los animales, siendo el α-tocoferol su forma más activa (Daley et al., 2010). Los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (AGPI n-3), entre ellos el ácido docosapentanoico [DPA,22:5(n-3)], eicosapentaenoico [EPA, 20:5(n-3)] y el docosahexanoico [*DHA, 22*:6(n-3)] además de ser considerados como saludables, están implicados en una gran variedad de funciones celulares, incluyendo regulación génica, fluidez de membrana y como percusores de varias clases de moléculas señalizadoras (Jump, 2002). Sin embargo, debido a su alto grado de insaturación en la cadena alifática, los AGPI n-3 son particularmente sensibles a la peroxidación. El α-tocoferol previene esta peroxidación, eliminando específicamente los radicales peroxilo, previniendo la degradación de lípidos (Traber et al., 2007). Otra vía más económica para incrementar el contenido de α-tocoferol en carne es el pastoreo, debido a la presencia de dicho compuesto en el forraje verde.

En numerosos estudios se ha observado que la vitamina E modula la actividad de muchas enzimas envueltas en la transducción de la señal con una consecuente alteración del comportamiento celular, como puede ser la expresión génica (Nakamura et al., 2009).

Por lo tanto, en el presente estudio, examinamos el efecto de la suplementación con α-tocoferol o pastoreo con alfalfa sobre el contenido de AGPI y la expresión génica de genes clave que intervienen en el metabolismo de AGPI, relacionados con la desaturación de ácidos grasos [*estearoil CoA desaturasa* (*SCD*), *Δ5 desaturasa* (*FADS1*) y *Δ6 desaturasa* (*FADS2*)] y la elongación de ácidos grasos de cadena muy larga [*elongasa de ácidos grasos de cadena larga tipo 5* (*ELOVL5*) y *elongasa de ácidos grasos de cadena larga tipo 6* (*ELOVL6*)] en músculo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio, 62 corderos machos de raza Rasa Aragonesa provenientes de parto simple fueron distribuidos de forma aleatoria en 5 tratamientos:

- 8 corderos con sus madres estuvieron pastando continuamente en una pradera de alfalfa (**A**), disponiendo los corderos de concentrado comercial.
- 12 corderos fueron alimentados desde el destete al sacrificio con pienso concentrado comercial (Control, **C**), sin adicionar α-tocoferol.
- El resto de los corderos fueron alimentados durante diferentes periodos previos al sacrificio con pienso enriquecido con acetato de α-tocoferol (500 mg de DL-acetato de α-tocoferol/kg de concentrado), agrupándose en 3 tratamientos: corderos alimentados con pienso enriquecido con acetato de α-tocoferol entre 4 y 10 días antes del sacrificio (**VE10d**) (n=11), entre 15 y 25 días (**VE20d**) (n=20) y entre 30 y 43 días (**VE30d**) (n=12). El periodo entre el destete y el uso de pienso enriquecido fueron alimentados con el pienso control.

Los animales se sacrificaron cuando alcanzaron el peso "Ternasco" (22-24 kg), y una porción de *L. thoracis* fue extraída y congelada inmediatamente en nitrógeno líquido. El análisis de α-tocoferol en el *L. thoracis* se realizó según el método utilizado por Lyan et al. (2001). Mediante cromatografía de gases, se determinó el perfil de ácidos grasos en grasa intramuscular de las muestras de *L. thoracis*. La extracción del ARN se realizó usando *TRI@REAGENT (Sigma Life Science).* El ADNc fue obtenido utilizando el kit *SuperScript®III Reverse Transcriptase (Invitrogen).* El análisis de expresión fue realizado mediante PCR cuantitativa a tiempo real (*SYBR green*). En el presente trabajo para normalizar los resultados de expresión de los genes de interés hemos testado la estabilidad de 3 genes de expresión constitutiva (*B2M*, *RPL19* y *YWHAZ)* junto con los genes de interés (*SCD*,

*FADS1*, *FADS2*, *ELOVL5* y *ELOVL6*) utilizando el procedimiento MIXED del SAS (Serrano et al., 2011). Finalmente los datos normalizados se transformaron en n-veces (en inglés fold-change) relativo al grupo control.

La influencia de la inclusión de vitamina E en la dieta sobre la expresión relativa de los genes de interés se estudió con el programa SAS 9.1 empleando el procedimiento MIXED según la metodología descrita por Steibel et al. 2009, en el que se incluyeron como efecto fijo el tratamiento y como covariable el peso al sacrificio. Los efectos aleatorios fueron el animal y el residuo. Se estableció un segundo modelo en el que los días de ingestión de pienso con vitamina E fue incluido como covariable en vez del tratamiento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El efecto del tiempo de suplementación con α-tocoferol en el músculo *L.thoracis* fue significativo (P<0.001). A partir de 7 días el contenido de α-tocoferol (0.60 µg/gr carne fresca) comenzó a aumentar respecto al grupo Control (0.17 µg/gr carne fresca) siendo significativo a 14 días de ingestión (1.11 µg/gr carne fresca; P<0.001). El grupo alfalfa mostró valores de α-tocoferol cercanos a los alcanzados por el grupo VE10d (0.57 µg/gr carne fresca). El contenido de EPA, DPA y DHA, que son productos de síntesis de las enzimas *FADS1*, *ELOVL5* y *FADS2*, aumentó significativamente en los corderos en pastoreo (P<0.001) con respecto a los tratamientos con concentrado. Estos resultados son consistentes con lo encontrado por otros autores, en los que los animales alimentados con pasto fresco tienen un alto contenido de AGPI tanto en la leche como en la carne (Woods & Fearon, 2009). Respecto a los animales alimentados con vitamina E durante diferentes días, se observó que el contenido de EPA fue mayor en el grupo VE30d, aunque solo se observó una tendencia (VE30d vs VE10d; P=0.06). El mismo efecto se observó para DPA y DHA, aunque no se encontraron diferencias significativas. Esta falta de significación puede ser debida a que los animales eran muy jóvenes y el periodo de estudio fue muy corto por lo que no se puede registrar efectos a largo plazo.

El gen *YWHAZ* fue el más estable de los genes control estudiados, eligiendo este para normalizar la expresión génica. El efecto de los días de ingesta de vitamina E sobre la expresión génica relativa fue muy significativo para los genes *ELOVL6* y *FADS1* (P<0.001), significativo en *ELOVL5* y *FADS2* (P<0.05), y no significativo para *SCD*. Al categorizar los grupos de vitamina E en tres subgrupos (VE10d, VE20d y VE30d) para poder calcular el cambio de expresión o "fold change" entre los diferentes grupos, se observaron diferencias significativas en la expresión génica relativa entre diferentes tratamientos de los genes *SCD*, *FADS2*, *ELOVL5* y *ELOVL6* (Figura 1). En *SCD*, el grupo VE30d mostró mayores niveles de expresión, 14 veces más que el grupo VE10d (P=0.02), encontrando solo una tendencia con el grupo Alfalfa (P=0.06), lo que parece indicar que la vitamina E modula la expresión de *SCD*. Como en estudios anteriores, se observó que los corderos alimentados con concentrado tenían mayor expresión de *SCD* que los del grupo alfalfa, así como menor contenido de ALC y ácidos grasos omega 3 (Dervishi et al. 2010). La expresión de *ELOVL6*, *ELOVL5* y *FADS2* siguió un mismo patrón, observándose un incremento de la expresión en el grupo VE10d en los tres casos. En el caso de *ELOVL6* y *FADS2* este aumento fue muy significativo (P<0.001), siendo los niveles de expresión del grupo de animales VE10d, 80 y 73 veces más que el grupo Control, respectivamente. Al incrementarse los días de exposición a la vitamina E, la expresión se atenúa, estando el tratamiento VE20d 12 veces más expresado que el grupo Control para *ELOVL6* (P=0.008) y 9 veces más para *FASD2* (P=0.01), no encontrándose diferencias significativas entre VE30d y el grupo Control. Este aumento significativo de la expresión en el grupo VE10d puede estar ligado al incremento que observamos en el contenido de α-tocoferol en el músculo a partir de 7 días de ingesta.

En cuanto al efecto de la expresión génica sobre el contenido de los AGPI sólo se observó que el contenido de EPA estaba influenciado por la expresión génica de *FADS1* (P=0.02). En el presente estudio, el incremento observado en el contenido de EPA, DPA y DHA es principalmente debido a la dieta y no a la síntesis *de novo*, no encontrándose diferencias significativas en estos ácidos grasos en función del tiempo de alimentación con vitamina E.

Estos resultados sugieren que la vitamina E es un posible regulador de la expresión génica de estos genes, modificando su expresión en los animales que han consumido un pienso enriquecido con acetato de α-tocoferol.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Daley et al., 2010.Nutrition J. 9. • Dervishi et al., 2010. BMC Vet. Res. 6:40 • Jump 2002.J Biol Chem. 277:8755–8 • Lyan et al., 2001. J. Chrom. B 751(2): 297–303. • Maret et al., 2007. Free Radic. Biol. Med. 43: 4–15 • Nakamura et al., 2009. Journal of Funct. Foods 1(3): 241-242. • Ripoll. et al., 2013. Meat Sci. 93: 906–913 • Serrano et al., 2011. BMC Genetics 12:36 • Steibel et al., 2009.Genomics 94 (2): 146-152. • Woods & Fearo, 2009. Livest. Sci. 126(1–3): 1–20.



**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por INIA RTA2009-91 RZP-2010-02 y cofinanciado con fondos FEDER. L. González-Calvo recibe una beca de Formación de investigadores de tipo Predoctoral de INIA.


## EFFECT OF FINISHING PERIOD LENGTH WITH VITAMIN E SUPPLEMENTATION ON LONG CHAIN FATTY ACID CONTENT AND EXPRESSION OF GENES RELATED TO LIPID METABOLISM IN L.THORACIS MUSCLE OF LIGHT LAMBS


**ABSTRACT.** Light lambs (n=62) were allocated in 5 groups: 8 lambs with their dams grazing alfalfa, 12 lambs indoors fed commercial concentrate from weaning to slaughter and the rest of lambs were fed concentrate supplemented with 500 mg of dl-α-tocopheryl acetate/kg concentrate for different days before slaughter (VE10d, VE20d and VE30d), and kept indoors. In *L.thoracis* muscle the period length of supplementation with α-tocopherol had significant influence increasing the content until the end of the study. EPA, DPA and DHA content increased significantly (P<0.001) in alfalfa lambs respect to concentrate lambs. *SCD* expression had higher levels in VE30d. *ELOVL5*, *ELOVL6* and *FADS2* showed similar expression pattern, increasing the expression in VE10d. The data indicated that supplemented diet with vitamin E is a factor affecting *SCD, ELOVL6, ELOVL5* and *FADS2* gene expression and alfalfa grazing affects PUFA content.



**Keywords**: *α-tocopherol, vitamin E, gen expression, sheep*

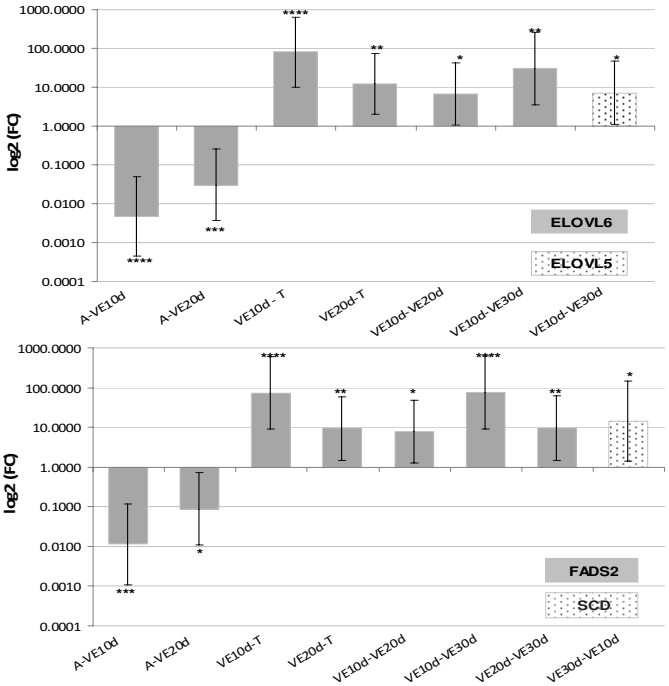




***Figura 1*. Log2 (FC,Fold change) para los contrastes entre grupos alternativos para ELOVL6, ELOVL5, FADS2 y SCD.** *Solo se indican contrastes significativos. (P<0.05*, P<0.01**, P<0.001*** y P<0.0001****). Las barras indican el intervalo de confianza al 95% (FCup-FClow).*