EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN CON LINO SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE ENZIMAS LIPOGÉNICAS EN EL TEJIDO GRASO SUBCUTANEO E INTRAMUSCULAR DE CORDEROS

Urrutia, O., Soret, B., Mendizabal, J.A, Insausti, K., Purroy, A. y Arana, A.
ETSIA. Universidad Pública de Navarra, 31006 Pamplona. olaia.urrutia@unavarra.es

INTRODUCCIÓN

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) n3, sobre todo el ácido linoléico conjugado (CLA), y los ácidos grasos de cadena larga (LCPUFA), se consideran saludables (Wood et al., 2004), por lo que es de interés aumentar su contenido en la carne de los rumiantes.
Waters et al. (2009) y Hiller et al. (2011) observaron que la inclusión de semilla de lino, rico en ácido α-linolénico (ALA), en la dieta de terneros provocaba un aumento en el contenido de n3 PUFA, C18:1t11 (VA) y ALA, pero no produjo un aumento del 9c11tCLA (formado a partir del VA) ni de los LCPUFA como el EPA, DPA y DHA (sintetizados a partir del ALA). Esto probablemente se deba a la inhibición que ejercen los PUFA n3 sobre el gen *stearoyl-CoA desaturase* (*SCD*) y sobre las enzimas implicadas en la biosíntesis de los LCPUFA (*Fatty acid desaturase 1* (*FADS1*) y *2* (*FASD2*) y *Fatty acid elongase 5* (*ELOVL5*)). Además, estos autores observaron que la inclusión de PUFA n3 en la dieta de los animales provocaba una regulación diferente, tanto a nivel genómico como proteico, de las enzimas implicadas en la lipogénesis en los depósitos grasos subcutáneo (SC) e intramuscular (IM).
Por otro lado, Arana et al. (1998) constataron que los procesos de hipertrofia e hiperplasia contribuyen de forma diferente al desarrollo de los depósitos grasos SC e IM.
Por ello, el objetivo del presente trabajo ha sido estudiar el efecto de la inclusión de lino en la dieta de corderos sobre la expresión de genes lipogénicos en los tejidos SC e IM y analizar si la expresión de estos genes sigue un patrón diferente en cada depósito.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 33 corderos machos de raza Navarra distribuidos en tres grupos (n=11) y alimentados con distintos piensos isoproteicos: Lote control (*C;* concentrado comercial, %ALA=4,43); Lote *L-5* (pienso con un 5% de semilla de lino, %ALA=18,96); Lote *L-10* (pienso con un 10% de semilla de lino, %ALA=33,49). El crecimiento, la grasa acumulada y las características de la canal de los corderos de los tres lotes fueron similares (Arana et al., 2010). Tras el sacrificio de los corderos (26 kg), se tomaron muestras de grasa SC e IM (músculo *longissimus dorsi).* Se determinó el diámetro de los adipocitos (Arana et al., 1998) y el análisis de ácidos grasos (AGs) se realizó por el método descrito en Aldai et al. (2005).
La extracción de ARN total y la síntesis del ADNc se realizaron mediante kits comerciales. Los genes estudiados fueron: *Acetil-CoA carboxylase* (*ACACA*), *Lipoprotein lipase* (*LPL*), *SCD*, *FADS1*, *FASD2* y *ELOVL5;* como control endógeno se utilizó la *β-actina*. Las reacciones de amplificación, usando *pooles* de cada uno de los lotes, se realizaron en un volumen total de 25 µl (5 µl de ADNc, 5 µM de cada oligonucleótido y 5 µl SYBR Premix Ex Taq (Takara)). La cuantificación relativa de la expresión (método ΔΔCt) y el análisis estadístico se realizó con el programa REST© algorithm.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se muestra en la Tabla 1, no se observaron diferencias entre los lotes de corderos en el tamaño de los adipocitos de ambos depósitos, lo que concordaría con el hecho de que la cantidad de grasa sea similar. Los adipocitos del depósito SC fueron de mayor tamaño que los del depósito IM, indicando que en el depósito SC es más importante la hipertrofia celular (mayor acumulación de lípidos neutros) mientras que en el depósito IM interviene más la hiperplasia (células de menor tamaño) y por tanto la contribución de los PUFA a los fosfolípidos (PL) de las membranas de los adipocitos representaría un mayor porcentaje.
En ambos depósitos aumentó significativamente el % de ALA, de VA y de n3, disminuyendo el % de LA y de n6 en el lote *L10* ($P<0,001$). Los % de CLA, EPA, DPA Y DHA no cambiaron al incluir lino en la dieta de los corderos. En ambos depósitos se observó una disminución de la síntesis de LCPUFA n3 ($P<0,001$) mientras que la formación de n6 LCPUFA no varió en ambos depósitos respecto al lote control. El hecho de que la biosíntesis de los n6 LCPUFA no disminuyera, como ocurrió en el caso de los n3, podría ser indicativo del importante papel que los AGs n6 juegan en la composición de los PL de las membranas celulares. Por otro

lado, un menor valor del ratio n6/n3 y el mayor contenido en n6 LCPUFA en el depósito IM indicarían que la biosíntesis de estos AGs tendría una mayor relevancia debido a que este depósito presenta células más pequeñas y por tanto, mayor superficie de membrana celular, a igual cantidad de grasa, que el depósito SC.

En la Tabla 2 se muestra la expresión de los principales genes lipogénicos de los corderos de los tres lotes. Los resultados de la expresión del gen *LPL*, enzima responsable de la captación de AGs exógenos, muestran un mismo patrón en ambos depósitos. La mayor disponibilidad de AGs provenientes de los piensos suplementados con un 5% de lino, habría provocado el incremento de la expresión del gen respecto al lote *C*.

Por otro lado, la incorporación más alta de dichos AGs exógenos habría provocado la disminución en la biosíntesis de AGs en ambos depósitos, mediante la represión de la expresión génica de la *ACACA*, implicada en la síntesis de AGs *de novo.*

En cuanto al gen *SCD,* la mayor concentración de PUFA n3 provocó una represión de su expresión en los dos depósitos que, posiblemente, evitó un aumento en el contenido en 9c11tCLA a pesar del aumento de VA (*L-5* y *L-10*) (Tabla 1).

La expresión de los genes implicados en la biosíntesis de LCPUFA (*FADS1*, *FASD2* y *ELOVL5*) fue diferente en cada depósito graso cuando se incluyó lino en la dieta. En el tejido graso SC, no causó variación en la expresión de ninguno de los genes. En cambio, en el tejido IM, se observó una inhibición en la expresión de *FADS1* y *FADS2*. La respuesta observada en el tejido IM pero no en el SC, podría tener como fin mantener la composición de AGs de las membranas celulares ya que los adipocitos IM tienen menor capacidad de almacenamiento de AG n3; así no se alteraría ni su fluidez ni su función fisiológica.

En definitiva, podría concluirse que en esta experiencia la expresión de los genes implicados en la formación de AGs saturados y monoinsaturados (*ACACA* y *SCD*) sigue un mismo patrón tanto en el depósito graso SC como IM. Sin embargo, la expresión de los genes encargados de la biosíntesis de LCPUFA tendría una regulación diferente en cada depósito adiposo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

● A. Arana, J. A. Mendizábal, K. Insausti, F. Maeztu, P. Eguinoa, V. Sarries, M.J. Beriain, B. Soret y A. Purroy. 2010. 61st annual meeting of EAAP, Heraklion, Crete, Greece 23-26 August. ● A. Arana, B. Soret, J. A. Mendizabal, M. Corroza, P. Eguinoa y A. Purroy. 1998. Anim. Sci. 66: 409-413. ● Aldai, N., B.E. Najera, A. I., Troy, D.J y Osoro, K. 2005. Derivatization of fatty acids and its application for conjugated linoleic acid studies in ruminant meat lipids. J. Sci. Food Agr. 85: 1073-1083. ● Hiller, B., A. Herdmann y K. Nuernberg. 2011. Lipids: 1-11. ● Waters, S. M., J. P. Kelly, P. O'Boyle, A. P. Moloney y D. A. Kenny. 2009. J. Anim. Sci. 87: 244-252. ● Wood, J. D., R. I. Richardson, G.R. Nute, A. V. Fisher, M.M. Campo, E. Kasapidou, P.R. Sheard y M. Enser. 2004. Meat Sc. 66: 21-32.

Tabla 1. *Diámetro de los adipocitos* (*µm) y composición de los ácidos grasos (%) del depósito graso subcutáneo (SC) e intramuscular (IM) de los corderos en función de la dieta (C: pienso comercial; L-5: 5% de lino; L-10: 10% de lino).*

	C	***L-5***	***L-10***	***E.E.***	***P***
Diámetro de los adipocitos	80,1	85,7	79,3	3,5	0,46
Tejido SC					
Tejido IM	33,5	35,7	35,8	0,23	0,62
Composición de ácidos grasos					
Tejido SC					
C18:1t11 (VA)	8,88^{b}	10,92^{a}	11,85^{a}	0,567	0,003
C18:2n6c9c12 (LA)	4.36^{a}	3.00^{b}	2.61^{b}	0.193	<0.001
C18:3n3c9,c12,c15 (ALA)	0,64^{b}	1,10^{a}	1,18^{a}	0,087	<0,001
C20:5n3 (EPA)	0,02	0,01	0,02	0,000	0,688
C22:5n3c7,c10,c13,c16,c19 (DPA)	0,04	0,03	0,03	0,003	0,273
C22:6n3c4,c7,c10,c13,c16,c19 (DHA)	-	-	-		
n6	4,94^{a}	3,63^{b}	3,48^{b}	0,193	<0,001
n3	0,89^{b}	1,33^{a}	1,49^{a}	0,090	<0,001
CLA	0,29	0,26	0,31	0,020	0,204

Índice n3, (EPA+DPA+DHA)/ALA	0,08[a]	0,04[b]	0,04[b]	0,005	<0,001
Índice n6, (γ-LA+C20:3+AA+C22:4)/LA	0,07[b]	0,08[ab]	0,09[a]	0,005	0,038
Tejido IM					
C18:1t11 (VA)	4,69[b]	5,82[ab]	7,10[a]	0,423	<0,001
C18:2n6c9c12 (LA)	7,10[a]	6,28[ab]	5,68[b]	0,340	0,019
C18:3n3c9,c12,c15 (ALA)	0,47[b]	0,92[a]	1,11[a]	0,080	<0,001
C20:5n3 (EPA)	0,11	0,12	0,15	0,017	0,278
C22:5n3c7,c10,c13,c16,c19 (DPA)	0,14	0,13	0,11	0,020	0,417
C22:6n3c4,c7,c10,c13,c16,c19 (DHA)	0,05	0,02	0,02	0,000	0,186
n6	9,50[a]	8,49[ab]	7,88[b]	0,467	0,058
n3	0,83[b]	1,35[a]	1,58[a]	0,087	<0,001
CLA	0,30	0,28	0,28	0,023	0,776
Índice n3, (EPA+DPA+DHA)/ALA	0,59[a]	0,27[b]	0,26[b]	0,055	<0,001
Índice n6, (γ-LA+C20:3+AA+C22:4)/LA	0,31	0,32	0,31	0,014	0,761

Tabla 2*. Expresión de genes lipogénicos del depósito graso subcutáneo (SC) e intramuscular (IM) de los corderos en función de la dieta* (*L-5:* 5% de lino*; L-10:* 10% de lino).

Gen	***Tejido***	***Lote***	***Expresión***	***Error Estándar***	***P(H1)****	***Resultado L5/L10***
β Actina			1			
ACACA	SC	*L-5/ L-10*	0,647/0,29	0,123-2,849/0,049-1,265	0,243/0,001	/Down
	IM	*L-5/ L-10*	0,009/0,002	0,002-0,044/0,001-0,011	0/0	Down/Down
LPL	SC	*L-5/ L-10*	3,48/1,254	1,738-6,850/0,577-2,664	0/0,197	Up/
	IM	*L-5/ L-10*	4,347/1,282	1,665-16,19/0,384-3,513	0,005/0,706	Up/
SCD	SC	*L-5/ L-10*	1,269/0,355	0,608-2,482/0,141-0,823	0,169/0	/Down
	IM	*L-5/ L-10*	0,602/0,282	0,180-2,083/0,096-0,826	0,154/0	/Down
FASD1	SC	*L-5/ L-10*	0,432/0,606	0,166-1,474/0,209-1,589	0,169/0,373	/
	IM	*L-5/ L-10*	0,068/0,053	0,014-0,498/0,005-0,457	0/0,003	Down/Down
FASD2	SC	*L-5/ L-10*	0,541/0,411	0,177-1,391/0,124-1,479	0,299/0,129	/
	IM	*L-5/ L-10*	0,1/3,063	0,024-0,302/1,152-9,205	0,007/0,12	Down/
ELOVL5	SC	*L-5/ L-10*	1,499/0,305	0,353-2,969/0,053-1,853	0,397/0,255	
	IM	*L-5/ L-10*	*No detectado*			

**P (H1):* Probabilidad de la hipótesis alternativa de que la diferencia entre los lotes con lino y el control sea solamente por azar.

EFFECT OF LINSEED INCLUSION ON THE GENE EXPRESSION OF LIPOGENIC ENZYMES IN SUBCUTANEOUS AND INTRAMUSCULAR ADIPOSE TISSUE OF LAMBS

ABSTRACT: The aim of this work was to study the effect of the inclusion in the diet of linseed, rich in α-linolenic acid (ALA), on the gene expression of lipogenic enzymes in subcutaneous (SC) and intramuscular (IM) adipose tissue in 3 groups of lambs: *C* (concentrate), *L-5 (c*oncentrate+5% of linseed) and *L-10* (concentrate+10% of linseed). The expression of *Acetil-CoA carboxylase (ACACA), Lipoprotein lipase (LPL)*, *stearoyl-CoA desaturase (SCD)*, *Fatty acid desaturase 1 (FADS1)* and *2 (FADS2)* and *Fatty acid elongase 5 (ELOVL5)* were quantified by real time RT-PCR.

The inclusion of linseed caused a decrease in the *ACACA* and *SCD* gene expression (P<0.001) and *LPL* gene expression was higher in *L-5* group than in the *L-10* and *C* groups (P<0.001) in both depots. The results showed that the gene expression of some genes has a tissue-specific regulation when linseed is included in the diet: the expression of *FADS*1, *FADS2* and *ELOVL5* genes did not change in the SC tissue whereas in the IM tissue mRNA the quantity of some of these genes decreased probably due to the inhibitory effect of ALA.

Keywords*:* fatty acids, linseed, lamb, lipogenic gene expression