REGULACIÓN NUTRICIONAL DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA LIPOGÉNESIS EN OVEJAS ALIMENTADAS CON ACEITE DE GIRASOL. 1. TEJIDO SECRETOR MAMARIO

Toral, P. G.[1], Castro-Carrera, T.[1,2], Bernard, L.[1], Hervás, G.[2], Leroux, C.[1], Chilliard, Y.[1], Fernández, M.[2], Belenguer, A.[2] y Frutos, P.[2*]
[1]INRA, UMR1213 Herbivores, F-63122 Saint-Genès-Champanelle, Francia
[2]Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas s/n. 24346 Grulleros, León, España *Correo electrónico: p.frutos@csic.es

INTRODUCCIÓN

La alimentación de los rumiantes puede modificar el perfil de ácidos grasos (AG) de la leche mediante un efecto más o menos directo de los componentes de la dieta o bien mediante cambios en la expresión de los genes que intervienen en la síntesis de lípidos en la glándula mamaria (i. e., mediante mecanismos transcripcionales). Sin embargo, existe muy poca información en los rumiantes acerca de este tipo de regulación y la mayor parte se limita al vacuno con síndrome de baja grasa en la leche (MFD) o al caprino (Shingfield et al., 2010). En ovejas lecheras no existe información sobre la abundancia del ARNm de los genes implicados en la lipogénesis en respuesta a la suplementación de la dieta con aceites vegetales, a pesar de la demostrada eficacia de esta estrategia nutricional para modificar la composición de la grasa láctea (Toral et al., 2010; Shingfield et al., 2010).

Por lo tanto, este estudio se llevó a cabo en ovejas alimentadas con aceite de girasol (i. e., con una dieta de la que se sabe que induce cambios en el perfil de AG de la leche) para examinar la respuesta del tejido secretor mamario en términos de abundancia del ARNm de los principales genes relacionados con la síntesis de lípidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 10 ovejas de raza assaf en la mitad de la lactación (semana 11 al inicio del experimento), que fueron distribuidas en función de su peso vivo, producción de leche, días posparto y número de lactación en 2 tratamientos: control (C) y girasol (Gi).

El experimento tuvo una duración de 7 semanas, durante las cuales los animales recibieron ad líbitum una dieta mixta completa basada en heno de alfalfa y un concentrado (relación F:C 60:40; PB= 154 y FND= 392 g/kg MS) suplementada con 0 (C) o 25 (Gi) g de aceite de girasol/kg MS. El día 48 del experimento se registró la producción de leche individualmente en cada uno de los dos ordeños y se recogió una muestra de cada animal, proporcional a la producción de la mañana y de la tarde, para determinar su contenido de grasa, proteína y extracto seco mediante espectrofotometría de infrarrojos y su perfil lipídico mediante cromatografía de gases (Shingfield et al., 2003).

Finalizado el experimento (día 49), las ovejas se sacrificaron mediante eutanasia y se tomaron muestras del tejido secretor mamario para estudiar la expresión de los principales genes que intervienen en la síntesis de lípidos. Para ello, se analizaron mediante PCR a tiempo real los fragmentos de ADN complementario sintetizados a partir del ARN extraído de los tejidos (Bernard et al., 2005), utilizando cebadores específicos para los siguientes genes: acetil-CoA carboxilasa alfa (*ACACA*) y AG sintasa (*FASN*), implicados en la síntesis de AG de novo; lipoproteinlipasa (*LPL*), translocasa de AG (*CD36*) y proteína transportadora de AG 3 (*FABP3*), implicados en la captación y transporte intracelular de AG; y estearoil-CoA desaturasas 1 y 5 (*SCD1* y *SCD5*), implicados en la desaturación Δ9 de los AG; y factor 1 de unión a elementos reguladores del esterol (*SREBF1*) y receptor gamma activado por el proliferador de peroxisomas (*PPARG*), factores de transcripción implicados en la regulación de la expresión de los genes de la lipogénesis. Para tener en cuenta las variaciones en la integridad y cuantificación del ARN, así como en la síntesis del ADN complementario, la abundancia de los transcritos se normalizó utilizando la media geométrica de la abundancia de 3 genes de menaje (*PPIA*, *UXT2* y *EIF3K*; Bonnet et al., en prensa) y, a continuación, los datos fueron transformados (log_2). Todos los resultados se sometieron a análisis de varianza, utilizando el procedimiento MIXED del SAS 9.2 (SAS Inst. Inc., Cary, EE.UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como cabía esperar, la adición de Gi a la dieta no afectó (P>0,10) ni a la producción de leche (1,32±0,180 kg/d) ni a su contenido de proteína, grasa o sólidos totales (4,9±0,14,

5,6±0,22 y 16,4±0,31%, respectivamente), pero modificó de forma significativa (P<0,05) su perfil de AG, reduciendo el contenido de AG saturados de cadena media y aumentando principalmente el de c9-18:1, c9,t11-18:2 y t11-18:1 (Tabla 1).
La reducción del contenido lácteo de AG de novo (i. e., <C16 y parte del C16) en respuesta al Gi no se vio acompañada de cambios en la cantidad de ARNm en el tejido mamario de los genes candidatos implicados en este proceso (i. e., *ACACA* y *FASN*; Tabla 2). Aunque algunos estudios en vacuno han mostrado una regulación nutricional en la transcripción de estos genes en casos de MFD inducida con almidón y aceites vegetales (Peterson et al., 2003) y marinos (Harvatine y Bauman, 2006), dicho síndrome no se observa en ovejas alimentadas con aceites vegetales (Toral et al., 2010; Shingfield et al., 2010). Además, la dieta Gi aumentó la proporción de AG de cadena larga en la leche sin que hubiera tampoco diferencias en la abundancia del ARNm de los genes que intervienen en la captación y el transporte de estos AG en la célula epitelial mamaria (i. e., *LPL*, *CD36* y *FABP3*), mientras que sí se han observado reducciones en el transcrito de *LPL* en vacas que, como se mencionó previamente, sufrían una MFD causada por el tipo de dietas (Peterson et al., 2003; Harvatine y Bauman, 2006). Sin embargo, los resultados en ovejas lecheras coinciden con los obtenidos previamente en cabras y vacas alimentadas con dietas ricas en forraje y aceites vegetales (Bernard et al., 2005; Murrieta et al., 2006) y sugieren que, en general, y en ausencia de MFD, las variaciones en el porcentaje de AG de novo y de cadena larga causadas por la dieta no están mediadas por mecanismos transcripcionales. La ausencia de cambios en los factores de transcripción estudiados (*SREBF1* y *PPARG*; Tabla 2) reforzaría esta hipótesis.

Tabla 1. *Perfil parcial de ácidos grasos (% AG totales) de la leche de ovejas alimentadas con una ración completa que contenía 0 (C) o 25 (Gi) g/kg MS de aceite de girasol.*

	Dieta			
	C	Gi	eed	P
4:0+6:0+8:0+10:0	16,08	11,65	0,967	**
12:0+14:0+16:0	42,35	34,12	1,973	**
18:0	7,64	11,90	0,778	**
c9-18:1[a]	15,35	21,58	1,134	**
t10-18:1	0,26	0,53	0,040	***
t11-18:1	1,32	2,36	0,422	*
c9,c12-18:2	2,81	2,79	0,340	ns
otros 18:2 no conjugados	0,74	1,15	0,075	**
c9,t11-18:2[b]	0,69	1,18	0,150	*
∑ AG <C16	36,19	26,92	1,524	***
∑ AG C16	27,52	23,12	1,100	**
∑ AG >C16	36,29	49,97	2,429	**
Índices de desaturación				
c9-14:1/(14:0+c9-14:1)	0,02	0,02	0,002	ns
c9-18:1/(18:0+c9-18:1)	0,67	0,65	0,019	ns
c9,t11-18:2/(t11-18:1+ c9,t11-18:2)	0,34	0,34	0,023	ns

eed, error estándar de la diferencia.
P, nivel de significación. ns=P>0,10; *=P<0,05; **=P<0,01; ***=P<0,001.
[a]Contiene t13+14+15-18:1 y c10-18:1 como componentes minoritarios.
[b]Contiene t7,c9-18:2 y t8,c10-18:2 como componentes minoritarios.

El aumento de la proporción láctea tanto de los sustratos como de los productos de la enzima Δ9-desaturasa (e. g., 18:0, c9-18:1, t11-18:1 y c9,t11-18:2) no modificó los índices de desaturación en la leche (Tabla 1) y, de forma similar, la abundancia del ARNm de los genes que codifican la Δ9-desaturasa (i. e., *SCD1* y *SCD5*) permaneció invariable en el tejido mamario. Esto sugiere que los cambios en la disponibilidad de sustratos para la Δ9-desaturasa no tienen un efecto significativo sobre la transcripción de dichos genes y, aunque se han observado disminuciones en la abundancia del ARNm de *SCD1* en cabras alimentadas con semillas de lino tratadas con formaldehido (Bernard et al., 2005), la regulación postranscripcional parece tener un gran peso en este gen (Bernard et al., 2009).

Tabla 2. *Abundancia del ARNm de los genes candidatos (datos transformados, log_2) en el tejido secretor mamario de ovejas alimentadas con una ración completa que contenía 0 (C) o 25 (Gi) g/kg MS de aceite de girasol.*

	ACACA	*FASN*	*LPL*	*CD36*	*FABP3*	*SCD1*	*SCD5*	*SREBF1*	*PPARG*
C	1,33	1,85	1,90	1,88	1,60	1,52	1,76	1,78	0,97
Gi	1,32	1,79	1,82	1,92	1,59	1,55	1,78	1,78	0,97
eed	0,079	0,095	0,058	0,051	0,125	0,079	0,076	0,090	0,049
P	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

eed, error estándar de la diferencia; P, nivel de significación. ns=P>0,10

En conclusión, la suplementación de la dieta de ovejas lecheras con una dosis moderada (2,5% MS) de aceite de girasol durante 7 semanas modifica el perfil de AG de la leche, pero los resultados de abundancia del ARNm de los genes implicados en la lipogénesis sugieren una baja relevancia de la regulación transcripcional en estas modificaciones. Sin embargo, no se puede descartar que los cambios a este nivel ocurrieran durante etapas más tempranas del tratamiento experimental.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Bernard, L., Bonnet, M., Leroux, C., Shingfield, K. J. & Chilliard, Y. 2009. J. Dairy Sci. 92: 6083-6094. • Bernard, L., Rouel, J., Leroux, C., Ferlay, A., Faulconnier, Y., Legrand, P. & Chilliard, Y. 2005. J Dairy Sci. 88: 1478-1489. • Bonnet, M., Bernard, L., Bes, S. & Leroux, C. Animal (en prensa) • Harvatine, K. J. & Bauman, D. E. 2006. J. Nutr. 136: 2468-2474. • Peterson, D. G., Matitashvili, E. A. & Bauman, D. E. 2003. J. Nutr. 133: 3098-3102. • Murrieta, C. M., Hess, B. W., Scholljegerdes, E. J., Engle, T. E., Hossner, K. L., Moss, G. E. & Rule, D. C. 2006. J. Anim. Sci. 84: 2399-2405. • Shingfield, K. J., Ahvenjärvi, S., Toivonen, V., Äröla, A., Nurmela, K. V. V., Huhtanen, P. & Griinari, J. M., 2003. Anim Sci. 77: 165-179. • Shingfield, K. J., Bernard, L., Leroux, C. & Chilliard Y. 2010. Animal. 4: 1140-1166. • Toral, P. G., Frutos, P., Hervás, G., Gómez-Cortés, P., Juaréz, M. & de la Fuente, M. A. 2010. J Dairy Sci. 93: 1604-1615.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el MINECO (Proy. AGL2011-23700) y la UMR1213 (INRA, Francia). T. Castro-Carrera disfruta de una beca JAE-CSIC cofinanciada por el Fondo Social Europeo.

NUTRITIONAL REGULATION OF THE EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN LIPOGENESIS IN EWES FED SUNFLOWER OIL. 1. MAMMARY SECRETORY TISSUE

ABSTRACT: A study was conducted in ewes consuming sunflower oil to investigate the response of the mammary secretory tissue, in terms of mRNA abundance of genes involved in lipogenesis, to a diet known to induce changes in milk fatty acid (FA) composition. Ten sheep (5 animals/treatment) received a total mixed ration based on alfalfa hay and a concentrate (F:C 60:40), supplemented with 0 (Control) or 25 (Gi) g of sunflower oil/kg dry matter, for 7 weeks. At the end of the experiment, milk production and composition was recorded and analysed (day 48) and the ewes were euthanized (day 49) for sampling of mammary secretory tissue to examine the nutritional regulation of mammary lipogenesis, using a candidate gene approach. The inclusion of Gi in the diet modified milk FA composition and secretion, decreasing the percentages of FA derived from *de novo* synthesis and increasing that of long-chain FA. However, results of mammary mRNA abundance of genes involved in lipid metabolism (*ACACA*, *FASN*, *LPL*, *CD36*, *FABP3*, *SCD1*, S*CD5*, *SREBF1* and *PPARG*) suggest that transcriptional regulation is not directly involved in these changes, at least when this is measured after a long period on the feeding treatments.

Keywords*: Milk fatty acid, lipid metabolism, mRNA abundance, lactating sheep*