REGULACIÓN NUTRICIONAL DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES IMPLICADOS EN LA LIPOGÉNESIS EN OVEJAS ALIMENTADAS CON ACEITE DE GIRASOL. 2. TEJIDOS ADIPOSOS SUBCUTÁNEO Y PERIRRENAL

Toral, P. G.[1], Castro-Carrera, T.[1,2], Leroux, C.[1], Hervás, G.[2], Bernard, L.[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

Durante la lactación, el tejido adiposo (TA) puede tener un papel fundamental en la regulación de la síntesis de grasa en la glándula mamaria y su posterior aparición en la leche (Chilliard, 1999; Shingfield et al, 2010). Sin embargo, se sabe poco acerca de los mecanismos moleculares implicados en la respuesta del TA a los cambios en la dieta del rumiante en lactación. En vacuno, la infusión duodenal de aceite de colza, que reduce la síntesis mamaria de ácidos grasos (AG) de novo en ausencia de variaciones en la secreción de grasa láctea, aumenta la actividad de la enzima lipoproteinlipasa en el TA perirrenal (Chilliard et al., 1991). A nivel de la abundancia del ARNm de los genes que codifican esta y otras enzimas de la lipogénesis, en vacas con síndrome de baja grasa en la leche también se han observado variaciones (Harvatine et al., 2009), pero no en cabras cuando la dieta utilizada no reduce la secreción de grasa (Bernard et al., 2005, 2009). Si bien es difícil discernir si estas diferencias están ligadas a la dieta, a su interacción con la especie o a otros factores, no existe aún ninguna información al respecto en el ovino. Además, la mayor parte de los trabajos sobre genes se basan en el estudio del TA subcutáneo, aunque otros depósitos internos podrían ser más activos.

El objetivo de este trabajo fue, por lo tanto, comparar la posible implicación de los TA subcutáneo y perirrenal en la respuesta del metabolismo lipídico a la dieta en ovejas en lactación alimentadas con aceite de girasol, a partir del estudio de su perfil de AG y de la abundancia del ARNm de los principales genes implicados en la lipogénesis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tal y como se describe en el artículo anterior, se utilizaron 10 ovejas de raza Assaf en la semana 11 de lactación al inicio del experimento, distribuidas en 2 lotes homogéneos, correspondientes a los 2 tratamientos experimentales: control (C) y girasol (Gi).

Durante las 7 semanas que duró el experimento, los animales recibieron ad líbitum la dieta mixta completa (relación F:C 60:40) descrita en el estudio previo y suplementada con 0 (C) o 25 (Gi) g de aceite de girasol/kg MS.

El día 49, las ovejas se sacrificaron mediante eutanasia y se tomaron muestras de los TA subcutáneo (abdomen) y perirrenal para determinar su perfil lipídico mediante cromatografía de gases (Shingfield et al., 2003) y estudiar la abundancia de los principales genes relacionados con la lipogénesis. 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 los cebadores específicos para los genes mencionados en el artículo anterior (*ACACA*, *FASN*, *LPL*, *CD36*, *SCD1*, *SCD5*, *SREBF1* y *PPARG*), así como para los siguientes: *FABP4 (*proteína transportadora de AG 4, implicado en la captación y transporte intracelular de AG); *ELOVL6 (*elongasa de AG 6, implicado en la elongación del 16:0); y *GPAM* (glicerol-3-fosfato aciltransferasa, implicado en la esterificación de los AG al glicerol). Como se explica en el artículo previo, la abundancia de los transcritos se normalizó utilizando los genes de menaje *PPIA*, *UXT2* y *EIF3K* y, a continuación, los datos fueron transformados (log_2).

Los resultados se sometieron a un análisis de varianza, incluyendo en el modelo estadístico los efectos fijos de la dieta, del tejido y de su interacción, así como el efecto aleatorio del animal. Para ello se utilizó el procedimiento MIXED del SAS 9.2 (SAS Inst. Inc., Cary, EE.UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las escasas variaciones en la abundancia del ARNm de los genes candidatos en respuesta al tratamiento Gi (Tabla 1) confirmarían que las dietas con suplementos lipídicos que no

reducen la secreción de grasa láctea tienen poca repercusión en la transcripción de los genes que intervienen en la síntesis de lípidos en el TA de los rumiantes (Bernard et al, 2005, 2009). La inclusión de aceite de girasol no modificó la abundancia del ARNm de *PPARG*, propuesto como uno de los principales reguladores del metabolismo lipídico en el TA (Shingfield et al, 2010), pero redujo los niveles de *SREBF1* y *GPAM*. Sin embargo, esta reducción no tuvo repercusiones evidentes en el perfil de AG del TA ya que los pocos cambios que se observan en su composición lipídica (e. g., la reducción de 18:3n-3 y 17:0; Tabla 2) probablemente estuvieran ligados a una menor disponibilidad de los mismos para su captación desde el plasma. La ausencia de efectos significativos sobre la concentración de otros AG concordaría con la ausencia de alteraciones en los genes estudiados y podría quizás explicarse, al menos en parte, por su síntesis endógena gracias a los procesos de síntesis de novo, elongación o desaturación Δ9 de los AG, tal y como apoya la expresión de *FASN*, *ACACA*, *ELOVL6* y *SCD1* y *SCD5* en ambos tejidos (Shingfield et al, 2010).

Tabla 1. *Abundancia del ARNm de los genes candidatos (datos transformados, log_2) en los tejidos adiposos (TA) subcutáneo y perirrenal de ovejas alimentadas con una ración completa que contenía 0 (C) o 25 (Gi) g/kg MS de aceite de girasol.*

	TA subcutáneo		TA perirrenal			P		
	C	Gi	C	Gi	eed	D	T	D×T
ACACA	1,79	1,64	1,60	1,58	0,171	ns	ns	ns
FASN	1,34	1,21	1,19	1,14	0,226	ns	ns	ns
LPL	1,43	1,42	1,27	1,22	0,122	ns	**	ns
CD36	1,85	1,78	1,88	1,90	0,062	ns	t	ns
FABP4	1,90	1,81	1,87	1,91	0,057	ns	ns	ns
SCD1	1,54	1,72	1,59	1,49	0,159	ns	ns	ns
SCD5	1,02	0,99	1,19	1,17	0,143	ns	t	ns
ELOVL6	1,79	1,66	1,77	1,74	0,163	ns	ns	ns
GPAM	1,41	1,13	1,39	1,28	0,070	*	ns	ns
SREBF1	1,60	1,44	1,39	1,10	0,098	*	***	ns
PPARG	1,93	1,81	1,87	1,86	0,049	ns	ns	ns

eed, error estándar de la diferencia; P, nivel de significación del efecto de la dieta (D), tejido (T) o la interacción (D×T). ns=P>0,10; t=P<0,10; *=P<0,05; **=P<0,01; ***=P<0,001.

Tabla 2. *Perfil parcial de ácidos grasos (% AG totales) de los tejidos adiposos (TA) subcutáneo y perirrenal de ovejas alimentadas con una ración completa que contenía 0 (C) o 25 (Gi) g/kg MS de aceite de girasol.*

	TA subcutáneo		TA perirrenal			P		
	C	Gi	C	Gi	eed	D	T	D×T
14:0	2,20	2,50	2,38	2,45	0,229	ns	ns	ns
16:0	20,09	21,09	21,45	21,27	1,050	ns	ns	ns
17:0	2,50	2,03	2,09	1,80	0,214	t	**	ns
18:0	16,82	19,02	34,36	35,72	2,551	ns	***	ns
c9-18:1	35,68	34,24	22,15	22,46	2,046	ns	***	ns
t10-18:1	0,51	0,55	0,50	0,43	0,187	ns	ns	ns
t11-18:1	1,78	1,95	2,54	2,27	0,267	ns	**	ns
c9,c12-18:2	1,88	1,90	2,02	1,85	0,154	ns	ns	ns
c9,t11-18:2	0,64	0,57	0,35	0,31	0,076	ns	***	ns
c9,c12,c15-18:3	0,83	0,70	0,83	0,59	0,080	*	t	ns
∑ AG saturados	44,93	47,98	63,44	64,39	2,718	ns	***	ns
∑ AG monoinsaturados	49,56	46,99	31,95	31,70	2,492	ns	***	ns
∑ AG poliinsaturados n-6	2,09	2,13	2,21	1,99	0,164	ns	ns	t
∑ AG poliinsaturados n-3	1,65	1,43	1,39	1,03	0,143	t	***	ns

eed, error estándar de la diferencia; P, nivel de significación del efecto de la dieta (D), tejido (T) o la interacción (D×T). ns=P>0,10; t=P<0,10; *=P<0,05; **=P<0,01; ***=P<0,001.

En cuanto a las diferencias entre ambos TA, los mayores niveles de 18:0 y t11-18:1 en el TA perirrenal y de c9-18:1, c9,t11-18:2 y AG poliinsaturados n-3 en el subcutáneo son

resultados habituales, debido a la necesidad de mantener las propiedades físicas de los depósitos grasos periféricos (Bas et al, 1987). Sin embargo, el mayor grado de insaturación del TA subcutáneo del abdomen, derivado principalmente de la mayor proporción de productos de la Δ9-desaturasa, no se asoció a diferencias entre tejidos en la abundancia del ARNm de *SCD1*, tal y como se había señalado previamente en ovino (Barber et al., 2000). Por el contrario, en cabras sí se habían observado niveles más altos de *SCD1* en el TA subcutáneo frente al perirrenal (Bernard et al., 2005), aunque estos disminuían significativamente cuando la dieta se suplementaba con una fuente rica en ácido linoleico.
Las diferentes abundancias de ARNm de *LPL* y *CD36* en los TA subcutáneo y perirrenal sugerirían divergencias en la captación de AG en estos depósitos, pero no se dispone de suficiente información sobre el perfil lipídico para poder confirmarlo. Por otra parte, Bernard et al. (2005) observaron lo contrario en los niveles de *LPL* en caprino.
Por último, cabe destacar que muchos de los estudios que muestran cambios significativos en las abundancias de ARNm de los genes implicados en la lipogénesis (e. g., Harvatine et al., 2009) se refieren a vacas con un severo síndrome de baja grasa en la leche. Sin embargo, la escasa respuesta observada en este trabajo coincide con lo señalado por Bernard et al. (2005, 2009) en cabras que recibían un suplemento lipídico similar al de estas ovejas y en las que no se produjo dicho síndrome.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Bas, P., Chilliard, Y., Morand-Fehr, P., Rouzeau, A. & Mandran, N. 1987. Ann. Zootech. 36: 361-374. • Barber, M. C., Ward, R. J., Richards, S. E., Salter, A. M., Vernon, R. G. & Travers, M. T. 2000. Anim. Sci. 78: 62-68. • Bernard, L., Bonnet, M., Leroux, C., Shingfield, K. J. & Chilliard, Y. 2009. J. Dairy Sci. 92: 6083-6094. • Bernard, L., Leroux, C., Bonnet, M., Rouel, J., Martin, P. & Chilliard, Y. 2005. J. Dairy Res. 72: 250-255. • Chilliard, Y. 1999. Pg. 502-552 en Biology of lactation. INRA, París, Francia. • Chilliard, Y., Gagliostro, G., Flechet, J., Lefaivre, J. & Sebastian, I. 1991. J. Dairy Sci. 74: 1844-1854. • Harvatine, K. J., Perfield, J. W. & Bauman, D. E. 2009. J. Nutr. 139: 849-854. • 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., Bernard, L., Leroux, C. & Chilliard, Y. 2010. Animal. 4: 1140-1166.

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. 2. SUBCUTANEOUS AND PERIRENAL ADIPOSE TISSUES

ABSTRACT: This study was conducted to compare the potential implication of the subcutaneous and perirenal adipose tissues (AT) in the response of lipid metabolism of lactating ewes to sunflower oil, a dietary supplement 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, the ewes were euthanized and samples of subcutaneous and perirenal AT were collected to examine their FA profile and the mRNA abundance of candidate genes involved in lipogenesis. With regard to FA composition, neither the little effects of Gi nor the great differences between fat depots appeared to be linked to differences in mRNA abundance. The results suggest a low response of the studied genes in the subcutaneous and perirenal AT in the *ad libitum* fed sheep, in mid-lactation, used in this trial. They also suggest a minimal contribution of gene expression to the nutritional regulation of lipogenesis in these depots, at least with the examined diets.

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