DEPRESIÓN DE LA GRASA LÁCTEA EN OVEJAS QUE CONSUMEN LÍPIDOS DE ORIGEN MARINO: 2. ¿PUEDE LA ABUNDANCIA DE ARNm DE GENES IMPLICADOS EN LA LIPOGÉNESIS MAMARIA EXPLICAR LA VARIACIÓN INDIVIDUAL?

Rodríguez-López, L., Frutos, P., Toral, P.G., Mendoza, A.G., Fernández, M. y Hervás, G.
Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas s/n. 24346 Grulleros, León, España. p.frutos@csic.es

INTRODUCCIÓN

La adición de una pequeña cantidad de lípidos de origen marino (p. ej., aceite de pescado o microalgas) a la dieta de ovejas en lactación permite mejorar las propiedades saludables de la grasa láctea pero produce el denominado síndrome de baja grasa en la leche (MFD), lo cual invalida su aplicación en condiciones prácticas de explotación (Capper et al., 2007; Bichi et al., 2013b; Toral et al., 2016). Sin embargo, la depresión de la grasa presenta una variación individual muy elevada, de modo que es muy severa en algunas ovejas y mucho más ligera en otras (Bichi et al., 2013a,b).

Aunque los trabajos en pequeños rumiantes son aún muy escasos, algunos han mostrado que este tipo de MFD está mediado por mecanismos transcripcionales, concretamente por la represión de ciertos genes implicados en el metabolismo lipídico en la glándula mamaria. Así, por ejemplo, se ha detectado una reducción significativa de la abundancia de ARNm de *ACSS2*, *ACACA*, *FASN*, *LPL*, *LPIN1*, *INSIG1* o *SREBF1* en ovejas con depresión de la grasa láctea (Carreño et al., 2016; Toral et al., 2016).

Por lo tanto, se planteó la siguiente hipótesis: diferencias en la regulación transcripcional de la lipogénesis mamaria podrían ser la causa de la distinta intensidad de MFD mostrada por el ovino cuando consume lípidos marinos. Este experimento se realizó pues para comprobar dicha hipótesis, con el objetivo final de profundizar en el conocimiento de este síndrome, lo cual se considera crucial para poder llegar a evitarlo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se utilizaron las mismas 15 ovejas del experimento que se describe en el primer trabajo de Rodríguez-López et al. (2017); es decir, 5 control, 5 RESPO- y otras 5 RESPO+.

Igualmente, una vez trascurrido el periodo de adaptación y antes de recibir las dos dietas (control o suplementada con 20 g de aceite de pescado/kg MS), durante 2 días consecutivos se tomaron muestras de leche de cada animal para extraer ARN de las células somáticas (como alternativa a la realización de biopsias de tejido mamario, tal y como se expone en Toral et al., 2016). Después de aprox. un mes con las dos dietas, se volvió a repetir el proceso otros 2 días (i. e., el 34 y 35).

En el procedimiento se siguió el protocolo recogido en Suárez-Vega et al. (2015) y Toral et al. (2016) de inyección de oxitocina, limpieza exhaustiva de la ubre y los pezones, y extracción del ARN. Los valores RIN (integridad del ARN) de las muestras fueron 7,8 ± 0,10.

Los fragmentos de ADN complementario sintetizados a partir del ARN se analizaron mediante qPCR (7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando cebadores específicos para los siguientes genes:

- *acetil-CoA sintetasa 2* (*ACSS2*): implicado en la activación de ácidos grasos (AG),
- *acetil-CoA carboxilasa* α (*ACACA*) y *AG sintasa (FASN*): implicados en la síntesis de AG de novo,
- *lipoproteinlipasa* (*LPL*) y *proteína 3 de unión de AG* (*FABP3*): implicados en la captación y transporte intracelular de AG,
- *delta-9 desaturasa* (*SCD*): implicado en la desaturación delta-9 de los AG,
- *lipina 1* (*LPIN1*) y *glicerol-3-fosfato aciltransferasa 4* (*GPAT4*): implicados en la esterificación de los AG al glicerol,
- *factor 1 de unión a elementos reguladores del esterol* (*SREBF1*), *gen 1 inducido por insulina* (*INSIG1*) y *activador del corte de SREBF1* (*SCAP*), factores de transcripción potencialmente implicados en la regulación de los genes anteriores.

La eficiencia de las qPCR varió entre 88 y 104% (r^2=0.991-0.998) y la especificidad de los cebadores se confirmó mediante la secuenciación del producto. La abundancia de los transcritos se normalizó utilizando la media geométrica de los genes de control interno *PPIA*,

UXT y *EIF3K*, los más estables según el programa Bestkeeper, y a continuación los datos fueron transformados (log_2).
Los resultados se analizaron mediante un ANCOVA, utilizando como covariable los datos obtenidos al inicio del experimento, con el procedimiento MIXED del SAS 9.4 (SAS Inst. Inc., EE. UU.). Para comparar las medias se usaron dos contrastes ortogonales: Control *vs.* MFD (es decir, el conjunto de RESPO- y RESPO+) y RESPO- *vs.* RESPO+.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la primera gráfica de la Figura 1 se muestra el contenido de grasa láctea de los tres grupos experimentales (control, RESPO- y RESPO+), lo que nos permite tener presente no solo el efecto de la dieta sino también la variación en la respuesta en los animales en los que se indujo la MFD, es decir la variación entre RESPO- y RESPO+.

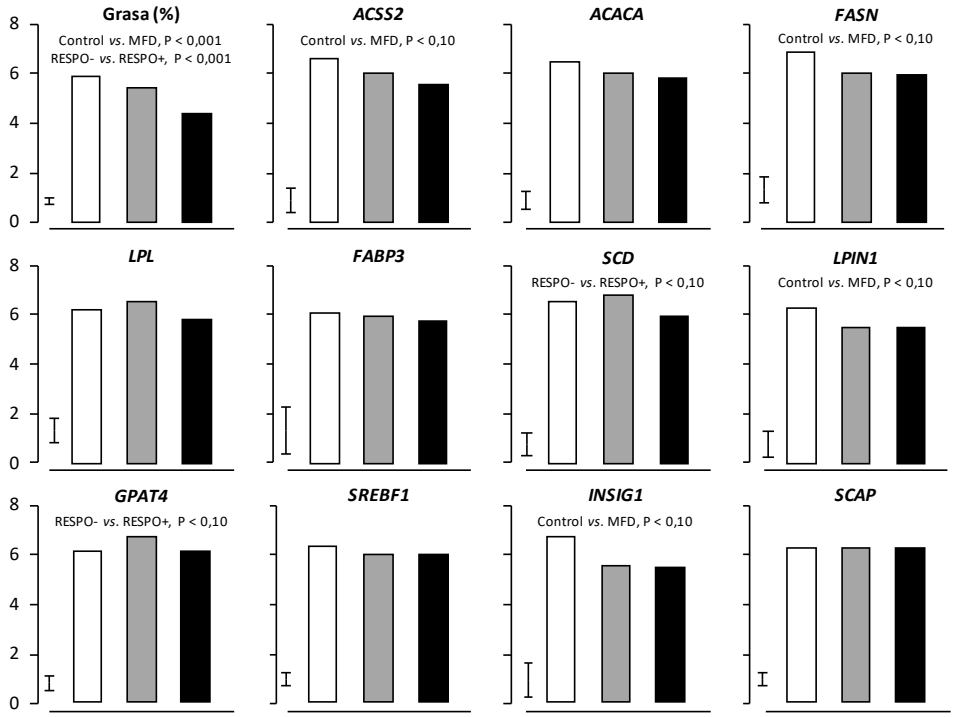


***Figura 1**. Porcentaje de grasa láctea y abundancia de ARNm de genes candidatos (datos transformados log_2) implicados en la lipogénesis mamaria en ovejas lecheras alimentadas con una dieta control (Control= □) o suplementada con aceite de pescado y que muestran un acusado (RESPO+ = ■) o ligero (RESPO- = ▒) síndrome de baja grasa en la leche.*
La barra de error corresponde al error estándar de la diferencia.

Aunque algunos ensayos en ovino no pudieron relacionar la abundancia de transcritos de los principales genes de la lipogénesis mamaria con el síndrome de MFD (Bichi et al., 2013a), los trabajos más recientes sí apuntan a una regulación transcripcional de este proceso (Carreño et al., 2016, Ticiani et al., 2016).
Resultados similares a los últimos se observan en este trabajo en las ovejas cuya dieta se suplementaba con aceite de pescado, es decir, una tendencia a la disminución del ARNm de genes que codifican enzimas lipogénicas en la glándula mamaria.
Este mecanismo transcripcional habría afectado (P<0,10) a genes de diferentes rutas metabólicas, incluyendo la activación de AG (*ACSS2*), la síntesis de novo (*FASN*) o la esterificación de los AG al glicerol (*LPIN1*). Sin embargo, otros genes como *ACACA*, *LPL* o

FABP3 no mostraron diferencias debidas a la dieta, a pesar de que los animales presentaron MFD en mayor o menor intensidad y diversos trabajos han encontrado variaciones también en ellos (Carreño et al., 2016; Ticiani et al., 2016).
Por otra parte, en relación con el objetivo específico de este estudio, solamente en *SCD* (implicado en la desaturación de los AG) y en *GPAT4* (implicado en la esterificación) se detectó una tendencia a la significación (P<0,10) entre las ovejas RESPO+ y RESPO-, con valores de abundancia de ARNm menores en aquellas con una respuesta más acusada.
Entre los factores de transcripción que funcionarían como reguladores centrales, solo se encontraron variaciones en *INSIG1* (P<0,10), lo cual sorprendió porque este factor está implicado en la activación del *SREBF1* (Yang et al., 2002), con lo que la represión del primero podría haber provocado la del segundo. El papel relevante del *SREBF1* en la depresión de la grasa láctea en ovino se ha señalado en algunos trabajos, no solo de genes candidatos sino también de secuenciación masiva (Suárez-Vega et al., 2017), a pesar de su evolución a veces errática y de que a menudo sus cambios no alcancen el nivel de significación exigido.
En conjunto, aun teniendo en cuenta que las tendencias a la significación no nos permitirían sacar conclusiones sólidas y pendientes del análisis de otros genes candidatos, los resultados preliminares de este trabajo nos obligan a rechazar la hipótesis inicial. Así pues, podríamos concluir que las diferencias en la abundancia de ARNm de genes implicados en la lipogénesis mamaria no parecen ser los principales responsables de la distinta intensidad del síndrome de MFD mostrado por el ovino cuando consume lípidos marinos. No obstante, como ya hemos señalado, son necesarios más estudios al respecto.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Bichi, E., et al. 2013a. Anim. Feed Sci. Technol. 186: 36-44. • Bichi, E., et al. 2013b. J. Dairy Sci. 96: 524-532. • Capper, J. L., et al. 2007. Animal 1: 889-898. • Carreño, D., et al. 2016. J. Dairy Sci. 99: 7971-7981. • Ticiani, E., et al. 2016. Animal 10: 1677-1683. • Toral, P.G., et al. 2016. J. Dairy Sci. 99: 8461-8471. • Rodríguez-López et al. (2017). Jornadas AIDA • Suárez-Vega, A., et al. 2015. Sci. Rep. 5: 18399. • Suárez-Vega, A., et al. 2017. Sci. Rep. (en prensa). • Yang, T. et al. 2002. Cell 110: 489-500.

Agradecimientos: Este trabajo forma parte del Proy. AGL2014-54587; L. Rodríguez-López disfruta de una beca predoctoral FPI y P.G. Toral de un contrato Ramón y Cajal, todos ellos del MINECO y con cofinanciación del FSE.

MILK FAT DEPRESSION IN DAIRY EWES FED MARINE LIPIDS: MAY THE mRNA ABUNDANCE OF GENES INVOLVED IN MAMMARY LIPOGENESIS EXPLAIN THE INDIVIDUAL VARIATION?

ABSTRACT: This study was conducted in dairy sheep to test the hypothesis that differences in the transcriptional regulation of mammary lipogenesis may be responsible for individual variations in terms of milk fat depression (MFD) in response to diet supplementation with marine lipids. Fifteen ewes receiving a total mixed ration supplemented with 0 (control; n=5) or 20 g of fish-oil/kg DM [n=10; with animals divided in those showing a strong (RESPO+, n=5) or slight (RESPO-) MFD] were used. Candidate gene expression was analysed by quantitative reverse transcription-PCR on milk somatic cells collected on days -2 or -1 and 34 or 35. Consumption of the fish oil diet tended to reduce the mRNA abundance of *ACSS2*, *FASN, LPIN1* and *INSIG1* (P<0.10), but only *SCD* and *GPAT4* showed a tendency to differ between RESPO+ and RESPO- ewes (P<0.10). These results would support that the nutritional regulation of milk synthesis is mediated by transcriptional mechanisms but oblige to reject the initial hypothesis.

Keywords: fish oil supplementation, gene expression, lipogenesis, nutrigenomics.