LA APLICACIÓN DE LA RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE PROTONES (H-NMR) EN OVEJAS CON DEPRESIÓN DE LA GRASA LÁCTEA: ¿PUEDE EL PERFIL METABOLÓMICO DE LA SANGRE EXPLICAR LA VARIACIÓN INDIVIDUAL?

Salama[1], A.A.K., Toral[2], P.G., Hervás[2], G., Caja[1], G. y Frutos[2], P
[1] Grup de Recerca en Remugants (G2R), Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, España. [2] Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas s/n. 24346 Grulleros, León, España.
ahmed.salama@uab.cat

INTRODUCCIÓN

Se ha observado que la suplementación de la dieta de las ovejas lecheras con lípidos marinos resulta en un perfil de ácidos grasos (AG) más saludable, pero reduce el contenido de grasa láctea, lo que se denomina el síndrome de baja grasa en la leche (MFD; Bichi et al., 2013). El MFD presenta una variación individual muy elevada, de modo que es muy severa en algunas ovejas y mucho más ligera en otras (Bichi et al., 2013). Este hecho hace pensar que pueden existir diferencias individuales en la respuesta a nivel genómico, transcriptómico, proteómico o metabolómico.

Por lo tanto, la hipótesis del presente trabajo fue que diferencias en el perfil metabólico de la sangre podrían explicar la variación individual en la intensidad de la MFD causada por la suplementación de la dieta con lípidos marinos. Se ha usado la técnica de resonancia magnética nuclear de protones (H-NMR) para estudiar el perfil metabolómico de ovejas sensibles o poco sensibles al MFD, lo que podría ayudar a entender este fenómeno y establecer estrategias para aliviarlo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 15 ovejas assaf (48 ± 1,4 días en lactación; 2,4 ± 0,42 partos). Las ovejas recibieron *ad libitum* una dieta mixta completa basada en heno de alfalfa y un concentrado (relación F:C 50:50), sin ninguna suplementación (grupo control; n = 5) o suplementada con 20 g de aceite de pescado/kg MS (grupo MFD; n = 10). Para seleccionar los 10 animales MFD se había partido de un total de 22, de los cuales se eligieron 5 que mostraron una elevada MFD (RESPO+) y 5 cuya respuesta fue leve (RESPO-). Se recogieron muestras de sangre en tubos con heparina antes de suplementar con el aceite de pescado y a los 36 d de tratamiento.

Para realizar el análisis de metabolitos con la técnica de H-NMR, el plasma se transfirió a tubos de RMN de 5 mm (Wilmad, VWR International, Eurolab, Barcelona) y se procesaron de acuerdo con la metodología descrita por Beckonert et al. (2007). Los espectros de NMR se obtuvieron utilizando un espectrómetro Bruker Avance-III operando a 600 MHz con temperatura de 298K. La detección de los espectros se controló con el software TopSpin 2.1 (Bruker, Alemania). Para mejor edición espectral, se han usado 2 tipos de filtros: filtrado según tiempo de relajación T2 (usando CPMG) i filtrado según difusión molecular (DOSY-1D).

Los datos se trataron con el paquete “Chemospec” del programa R. A continuación se usó el programa MetaboAnalyst (v.3; http://www.metaboanalyst.ca) para la normalización de los datos y su análisis multivariante. Se aplicó el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) para determinar el cambio químico de los metabolitos importantes que marcan la diferencia entre grupos. Los metabolitos se identificaron según la posición en el espectro, de acuerdo con la bibliografía disponible (Nicholson et al., 1995; Kostara et al., 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis PLS-DA (Figura 1) muestra la adecuación de la técnica H-NMR para diferenciar las ovejas control de aquellas que sufren una intensa MFD (RESPO+). Sin embargo, no se pudo explicar la diferente respuesta individual en los animales que consumen lípidos de origen marino (es decir, entre RESPO- y RESPO+). Esto coincide con otros datos de las mismas ovejas relativos a la composición de ácidos grasos de su leche o a la expresión de genes implicados en la lipogénesis mamaria (López-Rodríguez et al. 2017a,b).

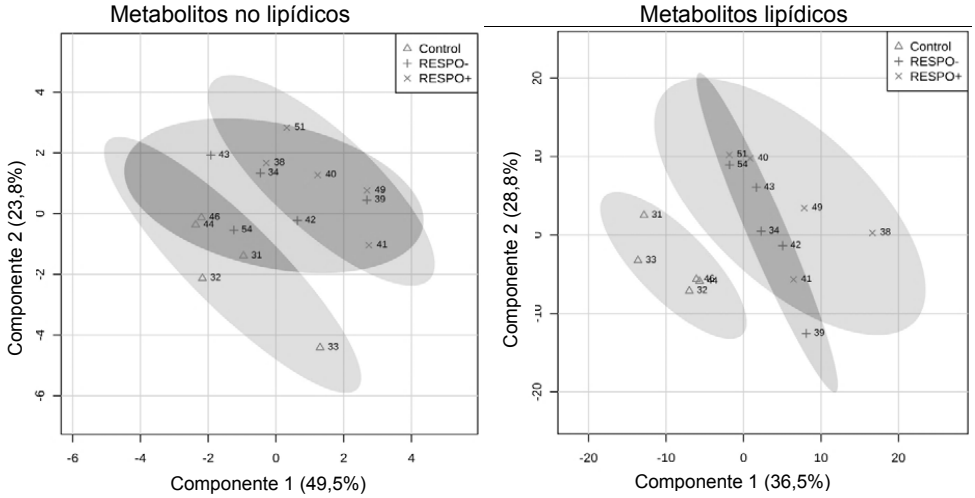


Figura 1. *Representación gráfica de los valores de los componentes principales del perfil de metabolitos obtenidos por PLS-DA.*

En cuanto a los principales metabolitos que presentan diferencias entre los 3 grupos (Tabla 1), algunos pertenecen al metabolismo proteico y mostraron concentraciones más altas en el grupo control, intermedias en RESPO- y bajas en RESPO+, lo cual podría relacionarse con el mayor porcentaje de proteína láctea en las ovejas control (5,03%) vs. las suplementadas con aceite de pescado, aunque entre estas últimas los valores fueron muy similares (4,76% en RESPO- y 4,73% en RESPO+). La leucina, no obstante, mostró un comportamiento errático, con las concentraciones más elevadas en RESPO-. Es probable que esto apunte a la regulación nutricional de la captación y utilización de aminoácidos por la glándula mamaria y a su implicación en la depresión de la proteína láctea, síndrome que suele acompañar al de MFD pero de forma mucho más limitada (Cant et al., 1993). Aunque la β-glucosa presentó un patrón similar a los aminoácidos, el cuerpo cetónico acetoacetato, que podría ser usado para la síntesis de novo de AG, aumentó a medida que se reducía la grasa láctea.

De los metabolitos lipídicos, el colesterol fue el único cuya concentración plasmática fue superior en el grupo control (Tabla 1). Aunque el contenido de colesterol en leche suele reducirse con la suplementación lipídica, la respuesta en plasma puede ser justo la contraria (Altenhofer et al., 2014; Gómez-Cortés et al., 2015). Los valores del resto de metabolitos lipídicos aumentaron con la caída de la grasa en RESPO- y RESPO+. Esto es inesperado en algunos casos, por ejemplo en el del linoleico, porque el contenido lácteo de este AG en la leche se reduce con el consumo de aceite de pescado (Carreño et al., 2016; Toral et al., 2016). Sin embargo, los incrementos en las ovejas RESPO- y RESPO+ podrían apuntar a la presencia en la sangre de metabolitos intermedios de la biohidrogenación ruminal con carácter antilipogénico. En este sentido, especulamos que los AG monoinsaturados podrían corresponder al *cis*-9 16:1, al *trans*-10 18:1 o al *cis*-11 18:1, sobre cuya implicación en el síndrome de MFD se continúa investigando (Kairenius et al., 2015; Toral et al., 2016). Cabe destacar que se observaron varios lípidos no identificados (datos no presentados) cuyas mayores concentraciones aparecieron en el grupo control y las más bajas en el RESPO+, y que podrían corresponder a lípidos que intervienen en diferentes procesos de la lipogénesis, pero no antilipogénicos.

Estos resultados preliminares no nos permiten aceptar la hipótesis inicial porque no parecen explicar la variación individual en la intensidad de la MFD causada por la suplementación de la dieta con lípidos marinos.

Tabla 1. *Metabolitos que marcan la diferencia entre grupos en ovejas lecheras alimentadas con una dieta control o suplementada con aceite de pescado y que muestran una acusada (RESPO+) o ligera (RESPO-) depresión de la grasa láctea.*

Metabolito	Cambio químico (ppm)	Tratamiento		
		Control	RESPO-	RESPO+
Metabolitos no lipídicos				
Acetoacetato	2.22			
β-glucosa	3.26			
Lactato	1.33 y 4.12			
Creatina	3.05			
Prolina	3.30			
Valina	1.04			
Isoleucina	1.01			
Leucina	0.91			
Metabolitos lipídicos				
Linoleico	2.76			
AG omega-3	0.94			
Glicerol	5.23			
AG monoinsaturado	5.26			
AG monoinsaturado	5.32			
Colesterol	1.02			

Los colores negro, gris y blanco indican una concentración alta, media y baja, respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Altenhofer, C. et al. 2014. J. Dairy Res. 81: 120-128. • Beckonert, O. et al. 2007. Nat. Protoc. 2: 2692-2703 • Bichi, E., et al. 2013. J. Dairy Sci. 96: 524-532. • Cant, J.P. et al. 1993. J. Dairy Sci. 76: 762-774. • Carreño, D., et al. 2016. J. Dairy Sci. 99: 7971-7981. • Gómez-Cortés et al., 2015. Food Chem. 188: 325-327. • Kairenius, P., et al. 2015. J. Dairy Sci.98: 5653-5672. • Kostara, C.E. et al. 2010. J. Proteome Res. 9: 897-911. • Nicholson, J.K. et al. 1995. Anal. Chem. 67: 793-811. • López-Rodríguez et al. 2017a,b. Jornadas ITEA • Toral, P.G. et al. 2016. J. Dairy Sci. 99: 1133-1144.

Agradecimientos: Este trabajo forma parte del Proy. AGL2014-54587 y P.G. Toral disfruta de un contrato Ramón y Cajal, ambos del MINECO y con cofinanciación del FSE.

THE USE OF H- NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE (H-NMR) IN EWES SUFFERING MILK FAT DEPRESSION: MAY BLOOD METABOLOMIC DIFFERENCES EXPLAIN THE INDIVIDUAL VARIATION?

ABSTRACT: This study was conducted in dairy sheep to test the hypothesis that differences in the blood metabolomic profile would explain individual variations in terms of milk fat depression (MFD) when marine lipids were added to the diet. Assaf ewes (n=15) received 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]. H-NMR was evaluated in blood samples collected on days 0 and 36. Supplementation with fish oil reduced the concentrations of proline, valine, isoleucine, keratin, lactate and β-glucose in blood. The reductions in amino acid concentrations are in accordance with lower mammary protein synthesis in supplemented ewes. On the other hand, some fatty acids (FA) increased, including some potentially antilipogenic FA that are supposed to be able to induce MFD. However, there was no clear separation between RESPO+ and RESPO-. At the systemic level, blood metabolomic profile was not successful to explain the individual variation in MFD.

Keywords: fish oil supplementation, H-NMR metabolomics, sheep.