UTILIZACIÓN DE ISÓTOPOS ESTABLES PARA CUANTIFICAR EN OVEJAS LA SÍNTESIS ENDÓGENA DEL ÁCIDO OLEICO DE LA LECHE

Toral, P. G., Frutos, P., Carreño, D. y Hervás, G.
Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Univ. de León), Finca Marzanas s/n. 24346 Grulleros, León, España. pablo.toral@csic.es

INTRODUCCIÓN

Una proporción muy elevada de los ácidos oleico (*c*9-18:1) y ruménico (*c*9*t*11-CLA) de la leche, entre otros, se producen de forma endógena en la glándula mamaria de los rumiantes (Shingfield et al., 2008; Frutos et al., 2014). Esta acción está mediada por la enzima estearoil-CoA desaturasa o Δ^9-desaturasa (SCD), que juega un papel fundamental en la regulación de la composición de la grasa láctea (Bernard et al., 2013). Al ser ambos ácidos grasos (AG) potencialmente beneficiosos para la salud de los consumidores, existe un elevado interés en la búsqueda de estrategias para aumentar su concentración en los productos lácteos, lo que explicaría también el interés por la SCD mamaria.

La cuantificación in vivo de los AG sintetizados mediante desaturación Δ^9 se ha realizado básicamente con trazadores radioactivos (Annison et al., 1967; Bickerstaffe & Annison, 1970) y con métodos indirectos como la inhibición de la SCD (Shingfield et al., 2008; Bichi et al., 2012). Desde hace algunos años, el empleo de isótopos estables constituye una alternativa para cuantificar de forma directa, fiable e inocua esta síntesis endógena, pero los estudios al respecto en los rumiantes lecheros son aún muy escasos (Mosley et al., 2006; Bernard et al., 2010; Toral et al., 2012). En relación con el ácido oleico, a pesar de su carácter saludable y de ser el principal producto de la SCD (Bernard et al., 2013), solo parece haberse publicado un trabajo preliminar en vacuno, utilizando ácido esteárico (^{13}18:0) como precursor (Mosley & McGuire, 2007). Además, no nos consta ninguna publicación sobre el uso de isótopos estables del carbono en el ovino.

Por lo tanto, este ensayo en ovejas lecheras se llevó a cabo para cuantificar in vivo la síntesis endógena del *c*9-18:1 de la leche, mediante el empleo de 18:0 marcado con ^{13}C.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para realizar esta prueba se utilizaron 6 ovejas de raza assaf homogéneas en cuanto a producción de leche, concentración de grasa láctea y días posparto, que fueron alimentadas ad líbitum con una dieta mixta completa (relación F:C 30:70). Tras 21 días de adaptación, cada animal recibió por vía intravenosa una dosis única de 2 g del trazador isotópico ([1-^{13}C]18:0, 99% de pureza) emulsionados en 200 ml de suero fisiológico. La administración se realizó justo después del ordeño de la mañana, en infusión continua durante 30 minutos.

Para estudiar la cinética de aparición de 18:0 y *c*9-18:1 marcados con ^{13}C en la leche, a las -24, -15, 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 48, 60 y 72 h posinyección (p.i.), se midió la producción de leche y se tomaron muestras individuales para analizar su porcentaje de grasa y su perfil lipídico. Los ésteres metílicos de los AG se separaron y cuantificaron mediante cromatografía de gases (Shingfield et al., 2003) y su enriquecimiento con ^{13}C por cromatografía de gases-combustión-espectrometría de masas de relaciones isotópicas (GC-C-IRMS). La proporción de 18:0 desaturado in vivo y la de *c*9-18:1 sintetizado endógenamente se calcularon siguiendo las ecuaciones descritas en la Tabla 1 (Mosley et al., 2006).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración de grasa de la leche se mantuvo estable a lo largo del periodo p.i. (de media, 6,69%), en el cual se registró una secreción de AG totales de aprox. 251 g/animal. El 18:0 representó el 7,77% del total de AG, con una proporción como ^{13}18:0 del 1,86%, mientras que el *c*9-18:1 fue más abundante (15,0% de los AG totales) y, por ello, su porcentaje de ^{13}C fue relativamente menor (1,49%). A partir de estos datos, se calculó el enriquecimiento en ^{13}C para ambos AG (Tabla 1), corrigiendo para la abundancia natural en las muestras de leche recogidas antes de la inyección del trazador isotópico (≈1,075%).

Los enriquecimientos medios con ^{13}C del 18:0 y *c*9-18:1 fueron del 0,79 y 0,41%, respectivamente, con máximos del 1,90% en el primer caso y 0,69% en el segundo.

En cuanto a los niveles mínimos de ^{13}C detectados, los valores de 0,41 y 0,29% para el 18:0 y el *c*9-18:1, respectivamente, confirmarían, en primer lugar, la idoneidad de la GC-C-IRMS

cuando la dosis del AG marcado es baja. Así pues, esta metodología sería la de elección por su elevada sensibilidad, comparada p. ej. con la de GC-MS (Mosley & McGuire, 2007), lo que resultaría especialmente ventajoso al disminuir la dosis de isótopo necesaria, reduciendo a la vez su coste y las posibles interferencias con el metabolismo del AG in vivo.
En la Tabla 1 se presentan las ecuaciones necesarias para poder realizar todos los cálculos. Como puede observarse, aprox. el 52% del *c*9-18:1 secretado en la leche procedería de la síntesis endógena, lo que representa una cifra muy parecida a la estimada de forma indirecta, mediante el uso de cobalto para inhibir la SCD, en ovejas que recibían una dieta similar (51%; Frutos et al., 2014). Sin embargo, este valor fue menor cuando la dieta de los animales incluía aceite de lino (29%; Toral et al., 2015) y mayor cuando se estimó con ácido estercúlico en ovejas en pastoreo (62%; Bichi et al., 2012). Sin descartar la influencia de la metodología utilizada en cada caso, estas diferencias apuntarían más bien a un papel clave de la composición de la dieta, por su impacto sobre el perfil de los AG que pueden ser captados por la glándula mamaria (Shingfield et al., 2003; Glasser et al., 2008). De hecho, se ha sugerido que la cantidad de *c*9-18:1 sintetizado endógenamente sería proporcional a la de 18:0 disponible para la SCD (Glasser et al., 2008) y prácticamente independiente de su capacidad de desaturación. Esto se vería apoyado por la similitud del porcentaje de 18:0 desaturado a *c*9-18:1 en nuestro estudio (≈49%) y en algunas estimaciones previas (48-57%; Bichi et al. 2012; Frutos et al., 2014). Como el ensayo estándar para determinar la desaturación Δ^9 se basa en la conversión del 18:0 marcado en *c*9-18:1 (Bickerstaffe & Annison, 1970; Bernard et al., 2013), nuestros resultados también constituyen la primera cuantificación directa in vivo de la actividad enzimática de la SCD en el ovino.
A modo de conclusión, el 52% del *c*9-18:1 que aparece en la leche de las ovejas procede de la síntesis endógena mediante la acción de la SCD, que desatura el 49% del 18:0 captado por la glándula mamaria. Sería necesario seguir avanzando en esta línea para estudiar la relevancia de la regulación nutricional de este proceso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Annison, E.F., et al. 1967. Biochemical J. 102: 637-647. • Bernard, L., et al. 2010. Br. J. Nutr. 104: 346-354. • Bernard, L., et al. 2013. Pp. 161-193 en "Stearoyl-CoA desaturase genes in lipid metabolism". Springer Science+Bussiness (EE.UU.). • Bichi, E., et al. 2012. J. Dairy Sci. 95: 5242-5252. • Bickerstaffe, R., et al. 1970. Comp. Biochem. Physiol. 35: 653-665. • Frutos, P., et al. 2014. J. Dairy Sci. 97: 1036-1046. • Glasser, F., et al. 2008. J. Dairy Sci. 91: 2771-2785. • Mosley, E.E., et al. 2007. Lipids 42: 939-945. • Mosley, E.E., et al. 2006. J. Nutr. 136: 570-575. • Shingfield, K.J., et al. 2003. Anim. Sci. 77: 165-179. • Shingfield, K.J., et al. 2008. J. Nutr. 138: 710-717. • Toral, P.G., et al. 2012. J. Dairy Sci. 95: 6755-6759. • Toral, P.G., et al. 2015. J. Dairy Sci. 98: 1961-1971.

Agradecimientos: Este trabajo forma parte del proyecto AGL2011-23700 (MINECO). P.G. Toral disfruta de un contrato Ramón y Cajal y D. Carreño de uno predoctoral FPI, ambos del MINECO y con cofinanciación del FSE.

USE OF STABLE ISOTOPOES TO QUANTIFY THE ENDOGENOUS SYNTHESIS OF MILK OLEIC ACID IN DAIRY EWES

ABSTRACT: Despite the convenience of using stable isotopes to examine fatty acid metabolism in lactating ruminants, very few studies have applied this technique in cows and goats, and no reports are available in ewes. Therefore, this assay was conducted to provide the first direct measurement of in vivo endogenous synthesis of milk oleic acid (*c*9-18:1) in dairy sheep, using ^{13}C-labeled stearic acid (18:0) as a tracer. Six lactating Assaf ewes received an intravenous injection of 2 g of [1-^{13}C]18:0, and ^{13}18:0 and ^{13}*c*9-18:1 secretion in milk were examined over the following 72 h by compound-specific isotope analysis using a GC-C-IRMS system. Within this period, approx. 49% of the 18:0 taken up by the mammary gland was desaturated to *c*9-18:1. The proportion of oleic acid deriving from Δ^9-desaturation represented on average 52% of the amount secreted in milk. Further research involving different feeding conditions would be now advisable.

Keywords: Δ^9-desaturation, sheep, stable isotope, stearoyl-CoA desaturase.

Tabla 1. Cálculos para determinar la proporción del ácido oleico (*c*9-18:1) de la leche sintetizado de forma endógena en la glándula mamaria de ovejas lecheras.

Parámetro	Ecuación	Media ± eem
18:0 secretado en la leche p.i. (g)	secreción de AG totales en la leche × % de 18:0 en la leche / 100	19,4 ± 1,23
*c*9-18:1 secretado en la leche p.i. (g)	secreción de AG totales en la leche × % de *c*9-18:1 en la leche / 100	36,7 ± 1,77
Enriquecimiento en ^{13}18:0 (% del 18:0)	(% de ^{13}18:0 en el periodo p.i. – % de ^{13}18:0 preinyección) × 100	0,79 ± 0,079
Enriquecimiento en ^{13}*c*9-18:1 (% del *c*9-18:1)	(% de ^{13}*c*9-18:1 en el periodo p.i. – % de ^{13}*c*9-18:1 preinyección) × 100	0,41 ± 0,055
^{13}18:0 secretado en la leche p.i. (g)	g de 18:0 secretado en la leche p.i. × % de enriquecimiento en^{13}18:0 / 100	0,15 ± 0,011
^{13}*c*9-18:1 secretado en la leche p.i. (g)	g de *c*9-18:1 secretado en la leche p.i. × % de enriquecimiento en ^{13}*c*9-18:1 / 100	0,15 ± 0,020
Transferencia de ^{13}AG a la leche (% de la dosis inyectada)	(g de ^{13}18:0 secretado en la leche p.i. + g de ^{13}*c*9-18:1 secretado en la leche p.i.) / 2 g de ^{13}18:0 inyectado × 100	15,0 ± 1,55
18:0 desaturado a *c*9-18:1 in vivo (% del 18:0 captado por la gl. mamaria)	g de ^{13}*c*9-18:1 secretado en la leche p.i. / (g de ^{13}18:0 secretado en la leche p.i. + g de ^{13}*c*9-18:1 secretado en la leche p.i.) × 100	49,2 ± 1,98
18:0 no convertido a *c*9-18:1 in vivo (% del 18:0 captado por la gl. mamaria)	100 – % de 18:0 desaturado a *c*9-18:1 in vivo	50,8 ± 1,98
Captación mamaria de 18:0 p.i. (g)	g de 18:0 secretado en la leche p.i. / % de 18:0 no convertido a *c*9-18:1 in vivo × 100	38,3 ± 2,15
18:0 desaturado a *c*9-18:1 p.i. (g)	g de 18:0 captado por la gl. mamaria p.i. × % 18:0 desaturado a *c*9-18:1 in vivo / 100	18,9 ± 1,42
*c*9-18:1 procedente de la síntesis endógena in vivo (% del *c*9-18:1)	g de 18:0 desaturado a *c*9-18:1 p.i. / g de *c*9-18:1 secretado en la leche p.i. × 100	51,7 ± 3,96

p.i. = posinyección de 2 g de [1-^{13}C]18:0

eem = error estándar de la media