CUANTIFICACIÓN DE LA ENZIMA ESTEAROYL-CoA DESATURASA HEPÁTICA EN CERDOS DUROC.

Tor[1], M., Vilaro[2], F., Gol[1], S., Bosch[3], L., Reixach[4], J., Pena[1], RN. y Estany[1], J.
[1]Departament de Ciència Animal, Universitat de Lleida - Agrotecnio Center, Lleida. [2] Serveis Cientifico-tècnics. Universitat de Lleida. Avenida Rovira Roure 198. 25198. Lleida
[3]Departament d'Enginyeria Química, Agrària i Tecnologia Agroalimentària, Universitat de Girona, Girona. [4]Selección Batallé, Riudarenes, Girona.; mtor@ca.udl.cat

INTRODUCCIÓN

El gen de la enzima estearoil-CoA desaturasa (*SCD*) presenta un polimorfismo en la región del promotor (g.2228T>C) que afecta al grado de insaturación de la grasa intramuscular. Así, el genotipo TT ha sido asociado a una ratio de ácidos grasos monoinsaturados/saturados (MUFA/SFA) superior a la del genotipo CC (Estany et al., 2014). Además se ha descrito que dicha actividad puede verse modificada por el nivel de inclusión de vitamina A en la dieta. Se ha observado que en los cerdos CC aumenta la ratio MUFA/SFA en la grasa intramuscular a niveles altos de vitamina A en la dieta, mientras que en los TT sucede lo contrario (Estany et al., 2017). A pesar de que la síntesis *de novo* de ácidos grasos en el cerdo sucede fundamentalmente en el tejido adiposo (O'hea y Gilbert, 1969), el hígado puede ser un tejido apropiado para estudiar el efecto de la interacción genotipo y dieta sobre el metabolismo lipídico, puesto que juega un papel importante en el transporte y en la oxidación de los lípidos, así como en la síntesis de fosfolípidos y porque su actividad es modificada por la composición de la dieta (Kellner et al., 2017).

Para establecer y validar modelos que expliquen estos procesos metabólicos, es esencial disponer de datos cuantitativos sobre los péptidos y proteínas efectoras de cada actividad. Como aproximación, se han utilizado datos de expresión de los genes codificantes de cada enzima. Sin embargo, los niveles de ARNm, de proteína y de actividad enzimática no siempre están correlacionados (Vogel y Marcotte, 2012).

Recientemente se han desarrollado las técnicas de monitorización de reacciones múltiples (MRM) basadas en espectrómetros de masas triple cuadrupolo que se han aplicado con éxito en experimentos de proteómica dirigida. Estas técnicas tienen la ventaja de ser mucho más versátiles y selectivas que las que se basan en la inmunoafinidad. Además permiten cuantificaciones simultáneas aportando información esencial en investigación biológica y médica (Vidova y Spacil, 2017).

En este trabajo se aborda el desarrollo de un método para la cuantificación de la enzima SCD en hígado, aplicando técnicas de proteómica dirigida con el objetivo de estudiar el efecto de la restricción de vitamina A en la dieta y del genotipo *SCD* sobre el grado de insaturación de la grasa.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron 20 cerdos castrados de la raza Duroc distribuidos según un diseño factorial 2 x 2 (cerdos de genotipo TT y CC del gen *SCD* [g.2228T>C] alimentados con la misma dieta, pero suplementada (S) o no (NS) con 4.900-7.800 UI/kg de acetato de retinol, según fase del engorde). Los animales se sacrificaron a los 130 kg de peso vivo y durante la evisceración se tomó una muestra de hígado que se envaso y congeló *in situ*. El análisis cuantitativo de los ácidos grasos del hígado se realizó por cromatografía de gases en columna capilar previa transesterificación de los triglicéridos con trifluoruro de boro en metanol, directamente sobre la matriz liofilizada. La cuantificación del enzima SCD se realizó a través de 4 de sus péptidos tripsínicos determinados *in silico* mediante el software Skyline (McLean et al., 2010) y sintetizados *ad hoc* por GeneCust, Dudelange, Luxemburgo: Péptido1 (VLQNGGGK); Péptido3 (TPQYVEEDIRPEMK); Péptido5 (FSETDADPHNSR); Péptido6 (GFFFSHVGW LLVR). A partir del tejido hepático liofilizado se aisló la fracción de microsomas (Shenkman y Cinti, 1978), se cuantificó su concentración proteica (Protein quantification kit, Fluka, Switzerland), se procedió a su reducción y alquilación (ProteoPrep® Reduction and Alkylation Kit, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) y a su digestión tripsínica (Trypsin Singles Proteomics Grade, Sigma-Aldrich, St Louis, USA). Seguidamente se filtró con un ultra-filtro de centrifuga de 5 kDa (Vivaspin® 500, Sartorius, Goettingen, Germany). Previamente al análisis MRM el filtrado se liofilizo y redisolvió en 50 µL de agua MiliQ. A partir de los péptidos sintetizados se desarrolló un método MRM para su cuantificación las muestras. Se implementó sobre un

equipo UPLC /TQS (Waters, Milford, USA) equipado con una columna BEH Amide (2,1 x 150 mm; 1,7 µm) y usando como detector un espectrómetro de masas triple cuadrupolo TQ-S (Micromass MS Technologies, Manchester, UK) operando en modo positivo. Las transiciones de cuantificación optimizadas para Péptido1, Péptido3, Péptido5 y Péptido6 fueron 386,80>213,29; 579,21>278,15; 459,45>571,32 y 522,40>176,70 respectivamente. La cuantificación de las concentraciones se realizó mediante el software QuanLynx. Para el análisis estadístico se utilizó el software JMP Pro12 (SAS Institute Inc, Cary, NC, EEUU) con un modelo lineal con los factores dieta (S y NS), genotipo (CC y TT) y su interacción. La significación se declaró a $p<0,05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A partir de la digestión *in silico* del enzima SCD se identificaron diversos péptidos tripsínicos, siendo posible desarrollar, con 4 de ellos, un método MRM y aplicarlo a muestras de hígado. En la Tabla 1 se presentan los valores medios de su concentración y los coeficientes de correlación en los 20 animales estudiados. Las concentraciones de cada uno de ellos son dispares aun cuando se expresan como concentraciones molares. Por el contrario, todos ellos presentan entre si coeficientes de correlación altos y significativos. Este resultado indicaría que podría utilizarse cualquiera de ellos como péptido proteotípico de la enzima SCD, pero que es necesaria la validación del método, especialmente en los aspectos relacionados con la exactitud. Las diferencias de concentración entre los distintos péptidos podrían indicar un rendimiento distinto en el proceso de digestión o interferencias de la matriz durante el proceso analítico. Para profundizar en ese sentido, podría ser de utilidad la utilización de péptidos marcados con isótopos estables como patrón interno (Kuzyk et al., 2009) que permitieran trazar todo el proceso y mejorar así la cuantificación. Sin embargo, el patrón observado en las ratios entre concentraciones molares (Péptido1/Péptido5 ≈ 1; Peptido3/Peptido1 ≈ 2,3; Péptido6/Péptido3 ≈ 2,3) también podría sugerir la existencia de isoformas de la enzima, al igual que sucede en la especie humana o en ratón (Ntambi et al., 2004).

***Tabla 1**. Niveles hepáticos y correlaciones de los péptidos tripsínicos derivados de la enzima estearoil-CoA desaturasa.*

	ng/g	nMol/g	Péptido1	Péptido3	Péptido5	Péptido6
Péptido1	91,7 ± 15,6	0,101	-	0,990	0,896	0,952
Péptido3	470,3 ± 57,6	0,238	-	-	0,862	0,942
Péptido5	145,4 ± 7,7	0,092	-	-	-	0,810
Péptido6	942,1 ± 136,4	0,550	-	-	-	-

Todas las correlaciones fueron significativas ($p<0,0001$).

A pesar de haberse descrito una interacción entre el nivel de vitamina A de la dieta y el genotipo de la *SCD* sobre el grado de insaturación de la grasa intramuscular (Estany et al, 2017), dicha interacción no se ha observado en el hígado (Tabla 2). Tampoco se ha observado ningún efecto de los genotipos *SCD* estudiados sobre el contenido del hígado en los ácidos grasos palmítico, palmitoleico, esteárico y oleico ni sobre sus ratios respectivas. Tampoco se observa ningún efecto del genotipo sobre la concentración de ninguno de los péptidos proteotípicos de la enzima SCD en el tejido hepático. Por el contrario, si se observa un claro efecto de la dieta sobre el contenido de materia grasa del hígado. La restricción de vitamina A provoca un aumento de 0,72% de grasa sobre el tejido fresco, que se ve reflejado en un aumento significativo del contenido absoluto de los ácidos palmítico y oleico (en el caso del esteárico se observa una tendencia; $p<0,1$). Por el contrario, las ratios C16:1/C16:0 y C18:1/C18:0, relacionadas con la actividad SCD, permanecen invariables. Simultáneamente, se observa un incremento en los niveles de todos los péptidos proteotípicos de la enzima SCD, en los animales con restricción de vitamina A en la dieta. Estas diferencias desaparecen si se incluye el contenido de grasa como covariable en el modelo.

A pesar de que en porcino el hígado no sea el órgano preponderante en la síntesis *de novo* de los ácidos grasos, los resultados obtenidos indican que su actividad Δ9-desaturasa aumenta con la deposición de la grasa, de manera que la proporción MUFA/SFA se mantiene constante independientemente del contenido de grasa. Así pues, la restricción de vitamina A

en la dieta incrementa el contenido de grasa en el hígado pero en cambio no modifica su composición.

***Tabla 2**. Efecto del nivel de vitamina A y del genotipo de la SCD sobre los lípidos hepáticos y los péptidos proteotípicos de la enzima SCD.*

	Vit A normal	Vit A restringida	SCD TT	SCD CC	SE
% MG	1,95[b]	2,67[a]	2,20	2,42	0,168
C16:0[1]	3,46[b]	4,43[a]	3,59	4,30	0,305
C16:1[1]	0,17	0,25	0,20	0,22	0,026
C18:0[1]	4,95	6,05	5,15	5,85	0,425
C18:1[1]	3,31[b]	4,39[a]	3,59	4,12	0,363
C16:1/C16:0	0,049	0,055	0,054	0,050	0,003
C18:1/C18:0	0,68	0,73	0,70	0,71	0,054
Peptido1[2]	46,6[b]	136,7[a]	74,2	109,1	16,9
Peptido3[2]	310,7[b]	629,9[a]	416,3	524,4	65,9
Peptido5[2]	122,9[b]	167,9[a]	142,6	148,2	8,7
Peptido6[2]	551,1[b]	1333,3[a]	776,3	1108,0	145,8

La interacción nivel de VitA* GenotipoSCD no fue significativa para ninguna de las variables. [1] mg/ g de tejido fresco. [2] ng/g tejido fresco.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Estany, J., Ros-Freixedes, R., Tor, M. & Pena, R. N. 2014. PLoS One 9: 1–11. • Estany, J., Gol, S., Tor, M., Bosch, L., Reixach, J. & Pena, R.N. 2017. 36th International Society for Animal Genetics Conference. Dublin. Ireland. • Kellner, T.A., Gabler, N.K. & Patience, J.F. 2017. J. Anim. Sci. 95: 3609-3619. • Kuzyk, M.A., Smith,D., Yang, J., Cross, T.J., Jackson, A.M., Hardie, D.B., Anderson, N.L. & Borchers, H. 2009. Mol. Cell. Proteomics 8: 1860-1877. • MacLean, B., Tomazela, D.M., Shulman, N., Chambers, M., Finney, G.L., Frewen, B., Kern, R., Tabb, D.L., Liebler, D.C. & MacCoss, M.J. 2010. Bioinformatics. 26: 966–968. • Ntambi, J.M., Miyazaki, M. & Dobrzyn A. 2004. Lipids 39: 1061-1065. • O'Hea, E.K. Leveille, G.A. 1969. The Journal of Nutrition 99: 338-344. • Schenkman, J.B. & Cinti, D.L. 1978. Methods Enzymol. 52: 3-89. • Vidova, V. & Spacil, Z. 2017. Anal. Chim. Acta 964: 7-23. • Vogel, C. & Marcotte, E.M. 2012. Nat. Rev. Genet. 13: 227-232.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por los proyectos MINECO (AGL2015-65846-R), CDTI (No. 20150115) y fondos FEDER.

QUANTIFICATION OF HEPATIC STEAROYL-CoA DESATURASE IN DUROC PIGS.

ABSTRACT: the stearoyl-CoA desaturase enzyme presents a promoter polymorphism which interacts with the vitamin A diet content and modifies the monounsaturated fatty acids ratio of intramuscular fat. In this work, the same effects are studied on liver lipids. For this purpose, a targeted proteomics method has been developed to quantify the SCD enzyme. No interaction was observed between the vitamin A content of the diet and the SCD genotype on the content or composition of the liver lipids. Nevertheless, the restriction of dietary vitamin A caused an increase in the liver lipid content along with an increase in SCD activity, which prevents the modification of fat liver unsaturation ratio. Moreover, the ratio pattern between molar concentrations of the studied proteotypic peptides could suggest the existence of different isoforms of the SCD enzyme in pigs.

Keywords*:* pig, liver, targeted proteomics, stearoyl-CoA desaturase.