

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE LA DIETA CON ACEITE DE PESCADO SOBRE LA ABUNDANCIA DE ARNm DE GENES IMPLICADOS EN LA LIPOGÉNESIS MAMARIA EN OVEJAS LECHERAS

Carreño, D., Hervás, G., Toral, P.G., Castro-Carrera, T., Fernández, M. y Frutos*, P. Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas s/n. 24346 Grulleros, León, España. *Correo electrónico: p.frutos@csic.es

INTRODUCCIÓN

En el ganado vacuno, se ha observado una clara relación entre el denominado síndrome de baja grasa en la leche (MFD por sus siglas en inglés) y la represión de ciertos genes implicados en el metabolismo lipídico en la glándula mamaria (Invernizzi et al., 2010; Bauman et al., 2011). Sin embargo, en pequeños rumiantes, especialmente en el ovino, la información al respecto es muy escasa e inconcluyente (Shingfield et al., 2010; Bichi et al., 2013).

En un estudio previo, se suplementó la dieta de ovejas con lípidos marinos para modular el perfil de ácidos grasos (AG) de la leche y, como se esperaba, se produjo una caída del contenido de grasa láctea (MFD). Sin embargo, en la semana 7 de tratamiento, dicha caída no se pudo relacionar con cambios en la expresión de una serie de genes candidatos implicados en la lipogénesis (Bichi et al., 2013). No obstante, estos resultados no permiten descartar que la regulación nutricional de la síntesis de grasa de la leche esté mediada por mecanismos transcripcionales, ya que la ausencia de cambios en la abundancia de ARNm podría deberse a otros motivos. Entre ellos, como se ha planteado en vacas (Invernizzi et al., 2010) y en ovejas que no sufrían MFD (Castro-Carrera et al., 2015), podría estar el del momento del muestreo. Es decir, que quizás a tiempos más cortos, sea más sencillo detectar las diferencias.

Por lo tanto, este trabajo se realizó en ovejas lecheras para analizar su respuesta a una dieta suplementada con aceite de pescado, de la cual se sabe que induce MFD, en términos de abundancia de ARNm de los principales genes candidatos implicados en la lipogénesis mamaria, a corto (aprox. 1 semana) y medio plazo (4 semanas).

MATERIAL Y MÉTODOS

Para llevar a cabo el ensayo, se partió de 12 ovejas de raza assaf en la semana 7 de lactación, que se distribuyeron en función de su peso vivo, producción de leche, días posparto y número de lactación en 2 tratamientos que consistieron en una dieta mixta completa (relación F:C 50:50), sin ninguna suplementación (control) o suplementada con 17 g de aceite de pescado/kg MS. Los animales recibieron la dieta control durante aproximadamente un mes, permitiendo su adaptación antes de la biopsia inicial. Trascurridas 2 semanas desde esa biopsia (i. e., cuando los animales estaban recuperados) se les ofrecieron las dos dietas experimentales durante 31 días.

Los días 0, 7 y 30 se midió la producción de leche y recogió una muestra de cada animal, proporcional a la producción de la mañana y de la tarde, para determinar el contenido de grasa mediante espectrometría de infrarrojos y el perfil lipídico mediante cromatografía de gases (Toral et al., 2015). La ingestión se controló diaria e individualmente.

Para la aproximación de genes candidatos, se realizaron biopsias del tejido secretor mamario en 3 momentos: 13 días antes del inicio de la oferta de las dietas experimentales (día 0) y a los 8 y 31 días del experimento. Desafortunadamente, tras la segunda biopsia, dos animales de cada grupo tuvieron que descartarse al no mostrar una buena recuperación. Las muestras de tejido se conservaron a -80 °C hasta la extracción de ARN; los valores de RIN fueron $8,12 \pm 0,46$. Los fragmentos de ADN complementario sintetizados a partir del ARN extraído se analizaron mediante qPCR (Toral et al., 2015), utilizando cebadores específicos para los siguientes genes: acetil-CoA carboxilasa alfa y AG sintasa (ACACA y FASN, implicados en la síntesis de AG de novo); lipoproteinlipasa (LPL, implicado en la captación y transporte intracelular de AG); delta-9 desaturasa 1 (SCD1, implicado en la desaturación delta-9 de los AG); y el factor 1 de unión a elementos reguladores del esteroide (SREBF1, factor de transcripción potencialmente implicado en la regulación de los genes anteriores; Shingfield et al., 2010). La abundancia de los transcritos se normalizó utilizando los genes de control interno PPIA, UXT2 y EIF3K.

El efecto de la dieta y el del tiempo se analizaron mediante un análisis de medidas repetidas en el tiempo, utilizando como covariable los datos obtenidos al inicio del experimento y anidando los animales al tratamiento. Para ello, utilizamos el procedimiento MIXED del SAS 9.4 (SAS Inst. Inc., EE. UU).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La suplementación de la dieta con aceite de pescado no afectó ($P>0,10$) ni a la ingestión de alimento ($3,3\pm 0,28$ kg MS/animal y día) ni a la producción de leche ($2,5\pm 0,39$ kg/d). Aunque durante la primera semana no se encontraron diferencias en el contenido de grasa de la leche (Figura 1), ya se observó una reducción en la abundancia de transcritos de *SREBF1* ($P<0,05$) y de algunos de sus genes diana (i. e., *ACACA* y *SCD1*; $P<0,05$ y $0,10$, respectivamente), lo que sugiere que los efectos transcripcionales aparecen antes de detectarse la MFD.

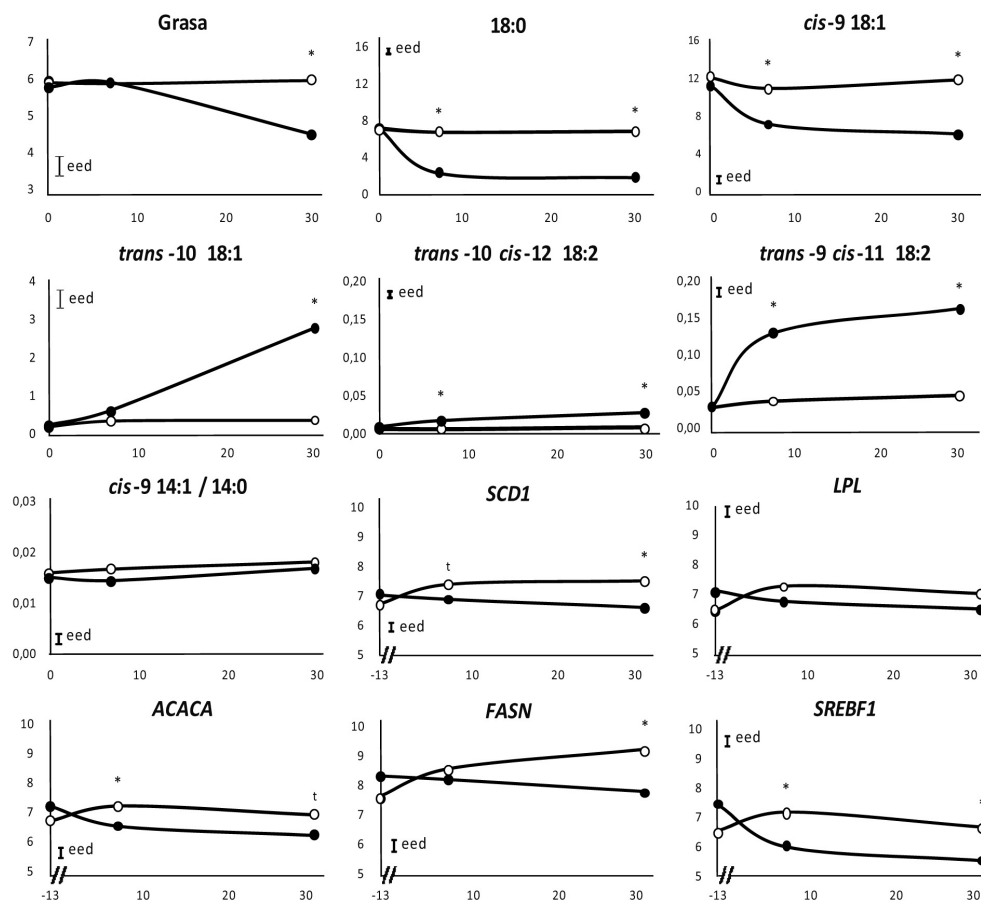


Figura 1. Evolución del porcentaje de grasa y de algunos AG de la leche (g/100 g AG) y de la abundancia de ARNm de 5 genes relacionados con la lipogénesis (datos transformados \log_2) a lo largo del experimento en ovejas lecheras alimentadas con una dieta control (O) o suplementada con un 1,7% de aceite de pescado (●). El eje de abscisas representa los días de experimento. eed = error estándar de la diferencia. $t = P<0,10$; * = $P<0,05$.

En ese momento (día 7), la suplementación con aceite de pescado disminuyó también las concentraciones lácteas de 18:0 y *cis*-9 18:1 ($P<0,05$), AG que se han relacionado con el síndrome de MFD en ovejas y vacas alimentadas con lípidos marinos (Shingfield et al., 2010; Bichi et al., 2013).

Los datos del día 30/31 mostraron una reducción del porcentaje (25%) y la producción (22%) de grasa ($P<0,05$), así como de la abundancia de ARNm de *SREBF1*, *FASN*, *SCD1* ($P<0,05$) y *ACACA* ($P<0,10$) en el tejido secretor mamario de las ovejas suplementadas con aceite de pescado. Estos resultados coinciden con una mayor concentración de ciertos AG con efecto antilipogénico, como el *trans*-10 18:1, el *trans*-10 *cis*-12 18:2 ($P<0,05$), aunque su contenido se mantuvo muy bajo y su relación con la MFD en ovino no está clara (Shingfield et al., 2010; Bichi et al., 2013) y el *trans*-9 *cis*-11 18:2 ($P<0,05$; Perfield et al., 2007). Por el contrario, no se encontraron reducciones ($P>0,10$) en la mayoría de los índices de desaturación (e. g., *cis*-9 14:1/14:0), a pesar de la disminución de *SCD1*. Por último, tampoco se pudo relacionar el efecto positivo de la suplementación de la dieta con aceite de pescado sobre la proporción de AG de cadena larga ($>16C$) en la leche con cambios en la abundancia de transcritos del gen *LPL*. No obstante, se sabe que en determinadas circunstancias, esta enzima podría no resultar limitante para la captación de AG (Shingfield et al., 2010).

En conclusión, dada la relación observada entre el perfil de AG de la leche y la abundancia de ARNm de los genes estudiados, y a pesar del carácter preliminar de los resultados, cabe suponer que el efecto de la suplementación de la dieta de ovejas lecheras con una dosis moderada (1,7% MS) de aceite de pescado esté mediado por mecanismos transcripcionales. En cuanto a la importancia del momento del muestreo, con la excepción del *FASN*, los cambios observados en los demás genes candidatos se detectaron el día 7 y se mantuvieron relativamente constantes hasta el final del estudio.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bauman, D.E., et al. 2011. Annu. Rev. Nutr. 31: 299-319.
- Bichi, E., et al. 2013. Anim. Feed Sci. Technol. 186: 36-44.
- Castro-Carrera, T., et al. 2015. Animal (doi:10.1017/S1751731114002882).
- Invernizzi, G., et al. 2010. Funct. Integr. Genomics 10: 561-575.
- Perfield, J.W., et al. 2007. J. Dairy Sci. 90: 2211-2218.
- Shingfield, K.J., et al. 2010. Animal. 4: 1140-1166.
- Toral, P.G., et al. 2015. J. Dairy Sci. (doi:10.3168/jds.2014-8731).

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Castilla y León (Proy. CSI023U13). D. Carreño y P.G. Toral disfrutaron, respectivamente, de una beca predoctoral FPI del MINECO y de un contrato Juan de la Cierva.

EFFECT OF DIET SUPPLEMENTATION WITH FISH OIL ON THE mRNA ABUNDANCE OF GENES INVOLVED IN MAMMARY LIPOGENESIS IN LACTATING EWES

ABSTRACT: This study was conducted in sheep to investigate the relationship between changes in both the mRNA abundance of genes involved in mammary lipogenesis, and the milk fatty acid (FA) composition, in response to a diet known to induce milk fat depression (MFD). Twelve ewes (6 animals/treatment) received a total mixed ration supplemented with 0 (control) or 17 g of fish-oil/kg DM, for 31 days. Milk FA profile was analysed by gas chromatography on samples collected on days 0, 7 and 30, and candidate gene expression by quantitative reverse transcription-PCR on samples of mammary secretory tissue removed by biopsy on days -13, 8 and 31. As expected, the fish-oil supplemented diet induced MFD and modified milk FA composition. Increases in some putative antilipogenic FA (e.g., *trans*-10 18:1, *trans*-10 *cis*-12 18:2, and *trans*-9 *cis*-11 18:2) were accompanied by reductions in the mRNA abundance of *ACACA*, *FASN*, *SCD1* and *SREBF1*, which would support that the nutritional regulation of milk FA composition is mediated by transcriptional control mechanisms. Most variations in mRNA abundance were detected on early stages of the feeding period (day 7) and stayed relatively stable until the end of the assay (d 31).

Keywords: gene expression, lipid metabolism, milk fat depression, sheep.