

SÍNTESIS ENDÓGENA DEL ÁCIDO RUMÉNICO (c9t11-CLA) DE LA LECHE: CUANTIFICACIÓN EN OVEJAS MEDIANTE EL USO DE TRAZADORES ISOTÓPICOS

Toral, P. G.*, Frutos, P., Belenguer, A. y Hervás, G.

Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Univ. de León), Finca Marzanas s/n, 24346 Grulleros, León; *pablo.toral@csic.es

INTRODUCCIÓN

La leche de los rumiantes contiene ácidos grasos (AG) bioactivos, entre los que destaca el ácido linoleico conjugado (CLA). Su isómero mayoritario es el ácido ruménico o c9t11-CLA y a él se le atribuyen las principales características beneficiosas del CLA (e. g., anticancerígenas y antiaterogénicas; Palmquist et al., 2005). Por ello, existe un elevado interés en aumentar su concentración en los productos lácteos.

El c9t11-CLA que aparece en la leche puede tener un origen ruminal, al ser un metabolito intermedio de la biohidrogenación de los AG de la dieta. También puede sintetizarse de forma endógena por la acción de la enzima Δ^9 -desaturasa mamaria sobre el ácido vaccénico (t11-18:1), otro producto de la biohidrogenación ruminal (Bernard et al., 2013). Con el fin de diseñar las estrategias más adecuadas para aumentar el contenido de ácido ruménico en la leche de los rumiantes, resulta clave conocer su principal origen en cada especie.

Mediante cuantificación directa *in vivo*, se ha visto que la síntesis endógena es la fuente mayoritaria de CLA en la leche de vacas y cabras (63-80%; Mosley et al., 2006; Bernard et al., 2010). Los pocos resultados disponibles en ovejas, sin embargo, derivan de estimaciones indirectas, lo que podría contribuir a explicar la mayor variación en los datos de c9t11-CLA endógeno (51-89%; Frutos et al., 2014; Toral et al., 2015). Sería preciso, por ello, realizar mediciones directas en esta especie, siendo el uso de isótopos estables la técnica de elección por su fiabilidad e inocuidad (Bernard et al., 2013).

Por lo tanto, esta prueba se llevó a cabo en ovejas lecheras con el objetivo de cuantificar *in vivo*, por primera vez en esta especie, la síntesis endógena del c9t11-CLA de la leche, mediante la administración de su precursor, el t11-18:1, marcado con ^{13}C .

MATERIAL Y MÉTODOS

El ensayo se realizó con 5 ovejas de raza assaf homogéneas en cuanto a producción de leche, concentración de grasa láctea, peso vivo y días posparto, que fueron alimentadas ad libitum con una dieta mixta completa (relación forraje:concentrado 50:50). Tras 21 días de adaptación, cada animal recibió por vía i.v. una dosis única de 200 mg del trazador isotópico ([1- ^{13}C]t11-18:1, 99% de pureza) emulsionados en 140 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 t11-18:1 y c9t11-CLA marcados con ^{13}C en la leche, a las -24, -15, 0, 9, 24, 33, 48, 57 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 utilizando un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama y una columna polar de 100 m, siguiendo el método descrito por Shingfield et al. (2003). La separación de los isómeros c9t11, t7c9 y t8c10 del CLA se realizó con otra columna altamente polar de 100 m y el programa de temperatura empleado por de la Fuente et al. (2015). El enriquecimiento de los AG con ^{13}C se determinó mediante cromatografía de gases-combustión-espectrometría de masas de relaciones isotópicas (GC-C-IRMS). La proporción de t11-18:1 desaturado *in vivo* y la de c9t11-CLA sintetizado endógenamente se calcularon a partir de las ecuaciones descritas en un estudio previo sobre el uso de trazadores isotópicos en ovejas (Toral et al., 2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante el periodo de muestreo, la ingestión de alimento (promedio \pm error estándar de la media) fue de $2,99 \pm 0,064$ kg de MS/día, la producción de leche de $2,05 \pm 0,038$ kg/día y la concentración de grasa láctea de $5,62 \pm 0,140\%$. Estos valores se mantuvieron estables a lo largo del periodo experimental, en el cual también se registraron porcentajes muy constantes de t11-18:1 y c9t11-CLA en la leche (de media, $0,65 \pm 0,005$ y $0,30 \pm 0,003\%$ del total de AG, respectivamente). Los resultados para ambos AG se situaron en el rango descrito en ovejas que recibían dietas similares (Frutos et al., 2014, 2017; Toral et al., 2017).

En la figura 1 se muestran los enriquecimientos medios con ^{13}C de los dos AG cuantificados mediante GC-C-IRMS, corregidos para la abundancia natural en las muestras de leche recogidas antes de la inyección del trazador isotópico ($\approx 1,079\%$). Los máximos, del 3,24% en el $t11-18:1$ y del 2,39% en el $c9t11-CLA$, se observaron en el primer muestreo tras la administración del trazador isotópico (9 h p.i.), decayendo de forma paulatina hasta las 72 h p.i., cuando se obtuvieron valores medios de 0,25 y 0,34% para el ácido vaccénico y ruménico, respectivamente. En este sentido, la mayor sensibilidad de la metodología de GC-C-IRMS, comparada con otras como la de GC-MS, hacen que sea idónea cuando los valores de enriquecimiento son bajos (p. ej., $<2\%$; Mosley y McGuire, 2007). Esto permite además reducir la dosis de trazador isotópico administrada y, con ello, su coste (que puede ser especialmente elevado). En ensayos *in vivo*, la administración de dosis bajas de AG también resultaría conveniente para intentar interferir al mínimo con sus niveles plasmáticos en el animal y, por lo tanto, con la cantidad disponible para la captación mamaria.

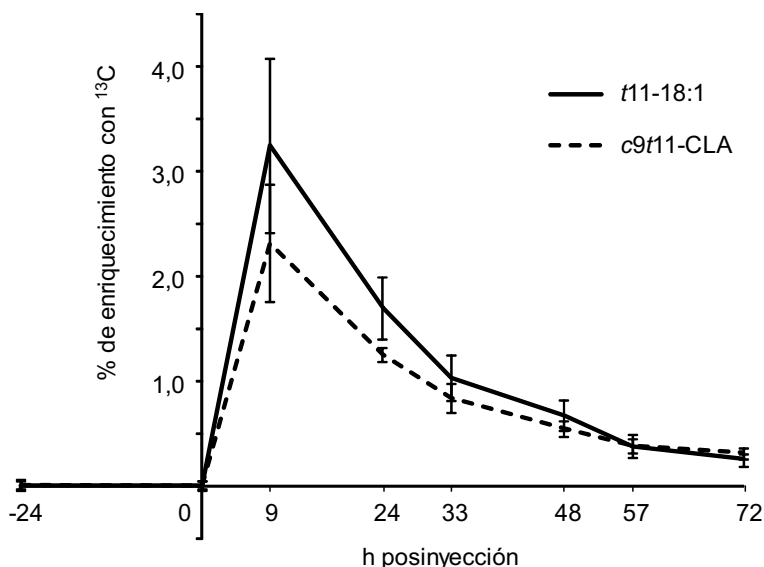


Figura 1. Enriquecimiento con ^{13}C del $t11-18:1$ y $c9t11-CLA$ en la leche de ovejas ($n=5$) que recibieron una inyección i.v. de 200 mg de $[1-^{13}\text{C}]t11-18:1$ a las 0 h. Las barras verticales representan el error estándar de la media. Las muestras de -24 h correspondieron a la mezcla proporcional de la leche recogida a -24 y -15 h.

La cinética de aparición de $t11-18:1$ y $c9t11-CLA$ marcados con ^{13}C fue similar a la observada previamente en vacas y cabras (Mosley et al., 2006; Bernard et al., 2010), pero diferente de la esperada en ovejas lecheras, considerando su respuesta a la administración de $^{13}\text{C}-18:0$ (Toral et al., 2017). En este último estudio, el máximo enriquecimiento del trazador no se había alcanzado hasta pasadas 16 h p.i., sin que hubiera un pico de enriquecimiento evidente para el producto de su desaturación, el $c9-18:1$. Aunque en dicho trabajo se especuló sobre una posible relación con diferencias interespecíficas en el metabolismo lipídico en la glándula mamaria, los resultados actuales sugieren que podrían existir diferencias en la cinética de transporte de cada AG. No obstante, el porcentaje de transferencia del trazador isotópico a la leche en el presente ensayo ($16,3 \pm 1,55\%$ en 72 h), fue muy inferior al obtenido en vacuno en un periodo de tiempo mucho más corto (33% en 24 h; Mosley et al., 2006), lo que apuntaría de nuevo a diferencias metabólicas entre especies de rumiantes.

A partir de los datos de porcentaje y producción de AG ^{12}C y ^{13}C en la leche, se pudo calcular que aproximadamente el $28,8 \pm 0,97\%$ del $t11-18:1$ captado por la glándula mamaria de las ovejas fue desaturado a $c9t11-CLA$, cuya síntesis endógena representó el $87,6 \pm 4,52\%$ de lo

secretado en la leche. La cifra de ácido vaccénico desaturado sería intermedia a la obtenida con el uso de isótopos estables en vacas y cabras (26 y 32%, respectivamente; Mosley et al., 2006; Bernard et al., 2010) y estaría dentro del rango estimado de forma indirecta en ovejas lecheras (22-29%; Toral et al., 2015). Su escasa variación apoya los resultados del metanálisis de Glasser et al. (2008), que sugerían que la capacidad de desaturación Δ^9 de la glándula mamaria no es un factor limitante de la secreción de *c9t11*-CLA en la leche, que estaría determinada por la disponibilidad de su precursor, el *t11-18:1*. Esta depende, a su vez, de la composición de la ración (Palmquist et al., 2005), lo que podría explicar las inconsistencias en las estimaciones previas (51-89% de ácido ruménico endógeno; Frutos et al., 2014; Toral et al., 2015) en ovejas que recibían dietas con diferente composición lipídica. No obstante, la comparación de los resultados obtenidos con dos dietas similares (este trabajo y el de Frutos et al., 2014) muestran que la aplicación de trazadores isotópicos permite cuantificar una mayor proporción de *c9t11*-CLA endógeno. Por ello, sería conveniente avanzar en esta línea de investigación para determinar qué parte de las diferencias se debería a variaciones en la composición de la dieta y cuál a la metodología empleada en cada caso (estimación indirecta mediante inhibición de la Δ^9 -desaturasa vs. cuantificación con isótopos estables). A modo de conclusión, al menos en las condiciones específicas de este ensayo, el 88% del ácido ruménico (*c9t11*-CLA) que aparece en la leche de las ovejas derivaría de la síntesis endógena mediante la acción de la enzima Δ^9 -desaturasa, que actúa sobre el 29% del ácido vaccénico (*t11-18:1*) captado por la glándula mamaria.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• 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+Business (EE.UU.). • de la Fuente, M.A., et al. 2015. Int. Dairy J. 47: 52-63. • Frutos, P., et al. 2014. J. Dairy Sci. 97: 1036-1046. • Frutos, P., et al. 2017. J. Dairy Sci. 100: 9611-9622. • Glasser, F., et al. 2008. J. Dairy Sci. 91: 2771-2785 • Mosley, E.E., et al. 2006. J. Nutr. 136: 570-575. • Mosley, E.E. & McGuire, M.A. 2007. Lipids 42: 939-945. • Palmquist, D.L., et al., 2005. Adv. Food Nutr. Res. 50: 179-217. • Shingfield, K.J., et al. 2003. Anim. Sci. 77: 165-179. • Toral, P.G., et al. 2015. J. Dairy Sci. 98: 1961-1971. • Toral, P.G., et al., 2017. J. Dairy Sci. 100: 5880-5887.

Agradecimientos: Este trabajo forma parte del proyecto AGL2017-87812 del MINECO, cofinanciado por el FEDER. P.G. Toral disfruta de un contrato Ramón y Cajal también del MINECO (RYC-2015-17230) y cofinanciado por el FSE.

ENDOGENOUS SYNTHESIS OF MILK RUMENIC ACID (*c9t11*-CLA) IN EWES: QUANTIFICATION USING ISOTOPIC TRACERS

ABSTRACT: Isotopic labeling has emerged as a reliable and sensitive methodology to directly examine lipid metabolism in lactating ruminants. However, a very limited number of studies has applied this technique to measure the proportion of milk rumenic acid (*c9t11*-CLA) synthesized endogenously by Δ^9 -desaturation in cows and goats, and there is none in ewes. This trial was therefore conducted in sheep to quantify, for the first time in this species, the in vivo endogenous synthesis of milk rumenic acid, using isotopic tracers. Five lactating ewes received an intravenous injection of 200 mg of [$1-^{13}\text{C}$]*t11-18:1*, and the ^{13}C enrichment of *t11-18:1* and *c9t11*-CLA in milk was then examined by GC-C-IRMS. On average, 29% of the *t11-18:1* transferred to the mammary gland within 72 h post-injection was desaturated to *c9t11*-CLA. The endogenous synthesis of milk rumenic acid represented approx. 88% of the amount secreted in milk. The available information is not sufficient to determine whether the inconsistencies compared with earlier indirect estimations are linked to different methodologies or to feeding conditions, which would merit further research.

Keywords: Δ^9 -desaturase, sheep, stable isotope, vaccenic acid.