

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD Δ 9-DESATURASA EN CERDOS DUROC DIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE ÁCIDO ESTEÁRICO DEUTERADO EN LA DIETA

Sarri, L., De la Fuente, G., Seradj, A.R., Estany, J., Pena, R.N., Balcells, J. y Tor, M.
Departament de Ciència Animal, Universitat de Lleida - Agrotecnio Center, Lleida.
Email: laura.sarri.espinosa@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La creciente inquietud de los consumidores por una alimentación más saludable provoca, entre otros, el incremento en la demanda de productos con menor contenido en ácidos grasos (AG) saturados y con una mayor proporción en AG monoinsaturados. Los saturados se relacionan con una mayor incidencia de enfermedades coronarias (Hu & Willett, 2002) y los monoinsaturados mejoran la calidad nutricional, tecnológica y organoléptica de la carne (Wood *et al.*, 2003). En el cerdo existe un polimorfismo en el promotor del gen de la enzima esteroil-CoA desaturasa (SCD) (g.2228T>C) que incrementa los niveles de ácido oleico en la grasa intramuscular (Estany *et al.*, 2014). Generalmente, la actividad Δ 9-desaturasa se mide como la razón entre los AG monoinsaturados cis-9 sobre sus precursores saturados. Debido a que la deposición de ambos puede ser de origen dietético o endógeno, la actividad real de la enzima SCD puede quedar enmascarada por la deposición de los AG que provienen de la dieta.

En la actualidad, los equipos de cromatografía de líquidos acoplados a espectrómetros de masas de triple cuádruplo (UPLC/TQ) permiten desarrollar métodos de monitorización de reacciones múltiples (MRM) que pueden separar moléculas marcadas isotópicamente de las naturales con una buena cuantificación, de manera simultánea, en rangos dinámicos amplios y unos límites de detección muy bajos.

El objetivo de este trabajo es evaluar la actividad real de la enzima SCD, midiendo la incorporación al tejido adiposo de ácido esteárico deuterado (18:0D35) añadido a la dieta, y la concentración de ácido oleico deuterado (18:1D33), derivado del anterior, por la acción de la enzima SCD.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el experimento se utilizaron 24 cerdos en crecimiento de aproximadamente 25-30 Kg de peso vivo, distribuidos según un diseño factorial, 3 (tipos genéticos) x 2 (dietas). Los tres tipos genéticos fueron: machos enteros F2 (Pietrain ♂ x (Duroc x Landrace) ♀); machos castrados Duroc-TT (Duroc de genotipo TT para el gen SCD); y machos castrados Duroc-CC (Duroc de genotipo CC para el gen SCD). Todos los cerdos fueron alimentados durante 7 días con una dieta que incorporaba un 0.02% de 18:0D35 (Tracer, Madrid, España). Dentro de cada tipo genético, la mitad de los cerdos se alimentaron con una dieta baja en proteína (15%; LP) y la otra mitad con una dieta normal (17%; NP). A partir del segundo día, se tomó diariamente, en todos los cerdos, una muestra de sangre de la vena yugular, que seguidamente fue centrifugada y almacenada (-40°C). Al séptimo día, los cerdos fueron sacrificados con una dosis letal de Euthasol® (ESTEVE S.A., Oudewater, Holanda), y se obtuvieron muestras de tejido adiposo subcutáneo, *m. longissimus thoracis* e hígado. Se realizó la extracción de los lípidos totales de las muestras de plasma y de tejidos en frío (Folch *et al.*, 1957) y la posterior hidrólisis de los triglicéridos (Aldai *et al.*, 2006). Los AG se extrajeron con éter de petróleo, se evaporó el disolvente, se re-disolvió en isopropanol y, previamente a la cromatografía, se filtraron a través de un filtro hidrofílico de politetrafluoroetileno de 0.2 μ m de diámetro de poro. Para el análisis de los AG se utilizó un sistema UPLC/XevoTQs equipado con una columna HSS-T3 (2.1 x 150 mm; 1.8 μ m tamaño de partícula) (Waters, Milford, MA, EEUU). Se diseñó y optimizó un método MRM que incluyó los siguientes AG: esteárico (14:0), palmítico (16:0), palmítico deuterado (16:0D31), palmitoleico (16:1), esteárico 18:0, 18:0D35, oleico (18:1), 18:1D33, linoleico (18:2), linoléico (18:3) y araquidónico (20:4). Se calcularon los ratios 18:0D35/18:0; 18:1/18:0 y 18:1D33/18:0D35. Los datos se procesaron mediante el software QuanLynx®. Para el análisis estadístico se realizó mediante el software JMP Pro12 (SAS Institute Inc, Cary, NC, EEUU). Para el tejido adiposo se utilizó un modelo lineal de dos factores, dieta

(LP, NP) y genotipo (Duroc-TT; Duroc-CC; F2) y su interacción. Para el enriquecimiento del plasma sanguíneo se utilizó un modelo mixto con el factor fijo día (de 3 a 7) y el factor aleatorio animal. La significación se estableció a $P < 0.05$. La separación de las medias se realizó mediante una prueba t de Student.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La técnica analítica utilizada fue suficientemente sensible para detectar los niveles de 18:0D35 en plasma y en los tejidos hepático, adiposo y muscular, después de administrar la dieta suplementada durante siete días. Además, aumentando el volumen de inyección del cromatógrafo y modificando los parámetros del espectrómetro de masas, fue posible detectar el ácido graso 18:1D33 en el tejido adiposo, aunque no en el hígado. En cerdo, el tejido adiposo es el órgano de mayor síntesis de AG, incluso por encima del hígado (O'Hea & Leveille, 1969), a diferencia de lo que ocurre con los humanos o en ratón. Este hecho, junto a que el tejido adiposo es un tejido de acumulación de lípidos, explicaría la presencia de 18:1D33 por encima de los niveles de detección y cuantificación únicamente en este tejido.

En el plasma sanguíneo, la incorporación del 18:0D35 de la dieta fue muy rápida, detectándose el ácido graso marcado a partir del tercer día de ingestión y estabilizándose los niveles a partir del cuarto (Figura 1.a). En tejido adiposo, el enriquecimiento del 18:0D35, medido como la ratio 18:0D35/18:0 ($\times 1000$) fue de 0.059 ± 0.0087 y no presentó diferencias ni entre genotipos ni según los niveles de proteína de la dieta. En la Figura 1.b se presenta la actividad $\Delta 9$ -desaturasa aparente, como ratio entre los ácidos oleico y esteárico. No se detectó ningún efecto significativo de la dieta ni interacción de esta con el genotipo. En cambio, sí se observaron claras diferencias con respecto al tipo genético, coincidentes con la bibliografía (Estany et al., 2014). Los cerdos Duroc de genotipo CC tuvieron una ratio de insaturación significativamente menor que los Duroc TT y F2. La actividad $\Delta 9$ -desaturasa real presentó un comportamiento diferente al de la aparente. En este caso, no se observó un efecto significativo de la dieta, pero sí una interacción de esta con el genotipo (Figura 1.c). Así pues, en los animales que recibieron una dieta con niveles normales de proteína no se observaron diferencias en la actividad $\Delta 9$ -desaturasa real entre genotipos. Por el contrario, en los animales que recibieron una dieta con restricción en el contenido de proteína hubo una clara diferencia entre genotipos. El genotipo CC mostró una actividad $\Delta 9$ -desaturasa real claramente inferior al genotipo TT. En los cerdos con dieta LP, la ingestión de una ración isocalórica, pero con un nivel de proteína restringido, pudo suponer un aumento de la lipogénesis durante los días que duró la fase experimental, tal y como reportó Kerr *et al.* (2003). Esto implicaría, por tanto, una intensificación de la actividad $\Delta 9$ -desaturasa y por ende de que se manifestaran más claramente las diferencias entre los genotipos CC y TT. De algún modo, la actividad $\Delta 9$ -desaturasa real mide lo sucedido en el tejido adiposo durante los días del experimento, mientras que la actividad $\Delta 9$ -desaturasa aparente es un reflejo de acumulación de lípidos en la célula durante un periodo mucho más amplio. Posiblemente, con una fase experimental más larga, que diera tiempo a la acumulación en el adipocito de ácido 18:1D33, se detectaría también el efecto del genotipo en los animales que ingirieron la dieta NP.

Puesto que el AG 18:1D33 es de origen exclusivamente endógeno, se ha confirmado una mayor actividad del gen *SCD* en los genotipos F2 y Duroc-TT respecto al Duroc-CC en animales jóvenes, de entre 25 y 30 kg de peso vivo, donde predomina la deposición de proteína frente a la de grasa. Convendría comprobar si la actividad $\Delta 9$ -desaturasa real se incrementa efectivamente en fases más avanzadas, cuando la curva de crecimiento del tejido adiposo se halla cercana a su punto de inflexión. Por otro lado, medir la actividad $\Delta 9$ -desaturasa real a partir de un ácido graso marcado, ha permitido distinguir el efecto de enmascaramiento de la dieta y acotar la medida de la actividad $\Delta 9$ -desaturasa a un periodo de tiempo determinado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldai, N. *et al.* 2006. J. Chromatogr. A 1110: 133-139.
- Estany, J. *et al.* 2014. PLoS One 9: 1-11.
- Folch, J. *et al.* 1957. J Biol Chem 226: 497-509.
- Hu, F.B. & Willett, W.C. 2002. JAMA 288: 2569-2578.
- Kerr, B.J. *et al.* 2003. J Anim Sci. 81: 3075-87.
- O’Hea, E.K. & Leveille, G.A. 1969. J Nutr. 99:338-344.
- Wood, J.D. *et al.* 2003. Meat Sci. 66: 21-32.

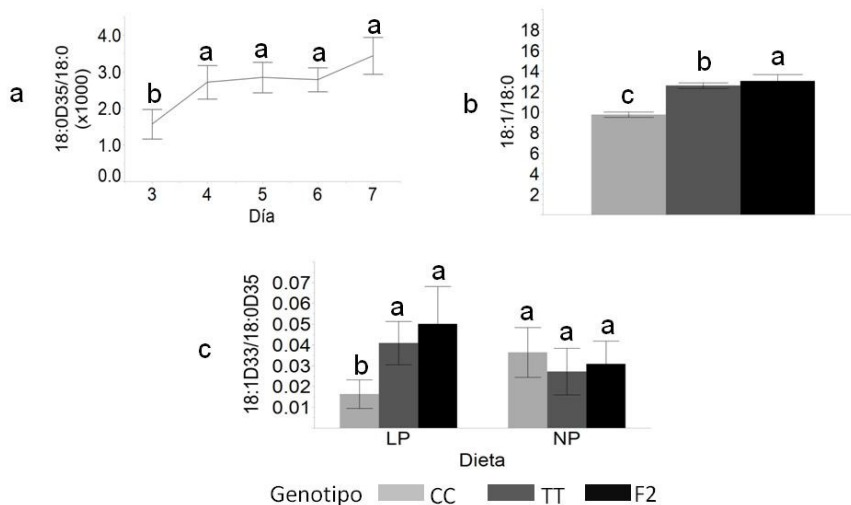


Figura 1. Efecto de un polimorfismo en la enzima esteroil-CoA desaturasa (SCD; g.2228T>C) sobre los índices de incorporación y desaturación del ácido esteárico deuterado (18:0D35). (a) Evolución del enriquecimiento del ácido esteárico marcado en el plasma sanguíneo. (b) Actividad SCD aparente y (c) actividad SCD real, en el tejido adiposo subcutáneo en dietas con contenido en proteína bajo (LP) y normal (NP). Letras distintas dentro de cada figura indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Agradecimientos: Estudio financiado por el proyecto Feed-a-Gene del programa H2020 (Referencia 633531) y por el programa retos del MINECO (Referencia AGL2017-89289-R).

DETERMINATION OF THE REAL $\Delta 9$ -DESATURASE ACTIVITY IN DUROC PIGS BY ADDING DEUTERATED STEARIC ACID IN THE DIET

ABSTRACT: A C>T polymorphism in the promoter of the pig stearoyl-CoA desaturase (SCD) gene is responsible for enhanced biosynthesis of oleic acid by desaturating stearic acid in intramuscular fat. To evaluate the real activity of the SCD enzyme, an experiment was carried out with 24 growing pigs of 25-30 kg body weight, of two commercial varieties: 8 entire F2 and 16 castrated purebred Duroc pigs, 8 CC/ 8 TT for the SCD genotype. Each variety was subdivided in 2 groups that were fed for 7 days with 2 levels of crude protein [15% low protein (LP); 17% normal protein (NP)]. A 0.02% of deuterium-labelled C18:0 (C18:0D35) was incorporated in all diets. Blood samples were collected daily for 5 days before culling and then adipose, muscle and liver were sampled. C18:0D35 in plasma was detected from the second day of ingestion and stabilised at day 3. Subcutaneous fat enrichment in C18:0D35 was uniform and did not present differences between genotypes nor by dietary protein level. Differences between genotypes were detected on apparent SCD activity, being the Duroc pigs CC genotype the lowest, while this effect only was detected on pigs fed the LP diet in real SCD activity, probably due to enhanced lipogenesis.

Keywords: pig, adipose tissue, $\Delta 9$ -desaturase activity, deuterated stearic acid, lipogenesis.