

EFFECTO DE LA GRASA DE LA DIETA SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO LIPÍDICO DEL CERDO

P. Duran-Montgé*, P. K. Theil†, C. Lauridsen†, E. Esteve-García*

*IRTA. Mas de Bover, Ctra. de Reus-El Morell km. 3,8 E-43120 Constantí (Tarragona)

†Department of Animal Health, Welfare, and Nutrition, Danish Institute of Agricultural Sciences, Research Centre Foulum, Tjele, Denmark

Correo electrónico: enric.esteve@irta.es

INTRODUCCIÓN

La regulación del metabolismo de los ácidos grasos (AG) se da, entre otros, a través de cambios a nivel de transcripción, procesamiento del mRNA, estabilidad del mRNA o actividad de varios factores de transcripción. En este último caso, como la familia peroxisome proliferator activated receptor (*PPAR*) [1] y la sterol regulatory element binding proteins (*SREBP1*) [2]. Estos factores de transcripción regulan la expresión de diversos enzimas clave dentro las rutas metabólicas de los AG. En cerdos, el tejido adiposo es el principal órgano de síntesis de los AG [3], pero hasta el momento sobre los efectos de los distintos AG de la dieta sobre la transcripción únicamente se han realizado estudios con cultivos celulares y cerdos destetados [4, 5]. En especies donde el hígado es órgano primario de lipogénesis, los AG insaturados son más inhibitorios que los saturados, como es el caso de aves y roedores; en especies donde el tejido adiposo es el órgano principal, los AG saturados podrían ser tan potentes (o más) que los insaturados [6]. Este estudio fue diseñado para estudiar el efecto de la composición de AG de la dieta sobre la transcripción de los genes involucrados en el metabolismo de la grasa en el hígado y tejido adiposo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y dietas. 61 cerdas (Duroc ♂x Landrace ♀) (62 ±5 kg pv) fueron asignadas a uno de los 7 tratamientos, con 8 animales por tratamiento, en 3 series de 3, 3 y 2 cerdas por serie. Las siete dietas fueron formuladas de acuerdo a los requerimientos nutricionales de la NRC (1998). Los tratamientos se asignaron de forma aleatoria por peso y camada. Las seis dietas con un 10% de grasa fueron a base de cebada y soja, y la dieta semisintética se formuló para contener un nivel muy bajo de grasa (Tabla 1).

Las grasas utilizadas fueron: sebo, aceite de girasol alto-oleico, aceite de girasol, aceite de linaza, mezcla (55% sebo, 35% aceite girasol, 10% aceite de linaza) y una mezcla con aceite de pescado (40% aceite de pescado, 60% aceite de linaza). Para el estudio se tomaron muestras durante el sacrificio del hígado y grasa subcutánea del cuello que se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente a -75°C.

Análisis. Las dietas se analizaron para determinar el contenido en materia seca (AOAC, 1990), proteína cruda (Dumas), energía (AOAC, 1990) y AG. Los AG se extrajeron según Folch et al. (1957) [8] y se transmetilaron con BF₃ i KOH en metanol, posteriormente se cuantificaron por cromatografía de gases utilizando C19:0 como patrón interno (Tabla 2).

El mRNA se extrajo con TriReagent, y luego se adicionó BCP (Mol. Res. Cent., Cincinnati, Ohio 45212, USA) para separar el RNA y posteriormente se precipitó con isopropanol y purificó con etanol. La síntesis del cDNA se realizó mediante la transcriptasa inversa (Invitrogen, Taastrup, Denmark) siguiendo el protocolo del proveedor. El cDNA fue amplificado con TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Stockholm, Sweden) utilizando primers específicos para cada gen, siendo el marcaje del producto amplificado realizado mediante SYBR Green (*SREBP-1* y *PPAR-α*) o sondas marcadas con carboxifluoresceína en el extremo 5' (*ACACA*, *FASN*, *SCD*, *D6D* y *HPRT1*). La *HPRT1* se utilizó como control endógeno (housekeeping gene). Para evaluar las cantidades de mRNA se calculó el número de ciclos (Ct) por el que la curva logarítmica cruzaba un valor umbral calculado, y se utilizó para determinar un ΔCt ($\Delta Ct = Ct \text{ gen} - Ct \text{ housekeeping gene}$). Los valores de ΔCt se analizaron por cada gen utilizando el procedimiento MIXED del SAS (tratamiento y series de animals, efectos fijos; camada x series efecto aleatorio).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Varios autores [9, 10] sugieren que la *SREBP1c* regula la expresión de diferentes genes lipogénicos. Experimentos *in vivo* con ratas [11] y también en cerdos [5, 12] han demostrado

que el aceite de pescado, rico en PUFAs de cadena larga, disminuye el contenido en mRNA de *SREBP1*. Al igual que estos experimentos, los animales alimentados con aceite de pescado mostraron los niveles más bajos de *SREBP1* mRNA (Tabla 3). Los contenidos en *ACACA* y *SCD* mRNA (niveles bajos en la dieta que contiene aceite de pescado) muestran un comportamiento parecido al de la *SREBP1*, sugiriendo una regulación de estos *SREBP1*. La regulación de los contenidos en mRNA de los genes relacionados con la síntesis de AG siguió una pauta diferente al hígado. A diferencia del hígado, los cerdos alimentados con la dieta sin grasa presentaron una expresión más alta de los genes involucrados en la síntesis de esteárico: *acetil CoA carboxilasa* y *ácido graso sintasa* (*ACACA* y *FASN*) y también de un gen involucrado en la desaturación (*Stearoil CoA desaturasa*) (*SCD*). Estos resultados se ajustan al incremento de la lipogénesis observado por Smith et al, (1996) [13] en cerdos alimentados con una dieta sin grasa comparado con cerdos alimentados con 10% de grasa. A diferencia de lo observado en el hígado, el contenido en mRNA de la *SREBP* no mostró diferencias entre tratamientos, lo cual se corresponde con lo observado por Liu et al. (2005)[12]. Los cerdos alimentados con sebo, dieta rica en AG saturados, presentó los niveles más bajos en *ACACA* y *FASN* mRNA, mientras que los cerdos alimentados con aceite de girasol presentó los valores más altos. Otros autores [13, 14] también han observado una reducción en la lipogénesis en cerdos alimentados con dietas enriquecidas con grasas saturadas comparando con dietas ricas en grasas insaturadas lo cual podría ser relacionado con una menor digestibilidad de las grasas saturadas; en nuestro caso esta posible interferencia se resolvió fijando la cantidad de grasa de las dietas en función de su digestibilidad (Duran-Montgé y col., en prensa 2007) [7]. *PPAR- α* no mostró ningún cambio en los contenidos de mRNA por el tipo de dieta, tanto en tejido adiposo como en hígado. Los resultados demuestran que la composición de la grasa de la dieta modifica la expresión de genes relacionados con la lipogénesis, tanto en hígado como en tejido adiposo. El tejido adiposo es el principal órgano de síntesis de AG en el cerdo y nuestros resultados sugieren que los efectos del tipo de grasa de la dieta en el hígado son distintos. Los AG saturados, comparados con otras fuentes de grasa, reducen la expresión de la *FASN*, *ACACA* y la *SCD* en el tejido adiposo.

Tabla 1. Composición de la dieta

| | Sin Grasa | Sebo | Girasol alto-oleico | Aceite Girasol | Aceite Linaza | Mezcla | Aceite Pescado |
|--|-----------|-------|------------------------|-------------------|------------------|--------|-------------------|
| <i>Formulación de la dieta (%)</i> | | | | | | | |
| Almidón de trigo | 70.0 | | | | | | |
| Aislado de proteína de soja | 14.0 | | | | | | |
| Pulpa de remolacha | 10.1 | | | | | | |
| Melaza | 4 | | | | | | |
| Cebada | | 62.5 | 64.2 | 63.7 | 64.1 | 63.8 | 63.7 |
| Soja 44% | | 24.1 | 23.7 | 23.8 | 23.7 | 23.8 | 23.8 |
| Sebo | | 10.97 | | | | 5.45 | |
| Aceite de girasol alto-oleico | | | 9.58 | | | | |
| Aceite de girasol | | | | 9.97 | | 3.47 | |
| Aceite de linaza | | | | | 9.68 | 0.99 | 5.80 |
| Aceite de pescado | | | | | | | 3.87 |
| Carbonato cálcico | 1.08 | 1.6 | 1.61 | 1.61 | 1.61 | 1.61 | 1.91 |
| Complejo vitamínico/mineral ^a | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| Fosfato dicálcico | 0.2 | 0.28 | 0.27 | 0.27 | 0.27 | 0.27 | 0.27 |
| Cloruro sódico | 0.15 | 0.22 | 0.22 | 0.22 | 0.22 | 0.22 | 0.22 |
| L-lisina- HCl | | 0.01 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 | 0.02 |
| DL- metionina | 0.04 | | | | | | |
| <i>Nutrientes y energía</i> | | | | | | | |
| Materia seca (%) | 88.8 | 90.5 | 90.4 | 90.4 | 90.4 | 90.4 | 90.4 |
| Proteína cruda (Nx6.25) (%) | 14.1 | 15.6 | 15.1 | 15.5 | 15.9 | 15.8 | 16.1 |
| Proteína cruda digerida (%) ^b | 11.1 | 11.8 | 11.4 | 11.7 | 11.6 | 11.3 | 11.6 |
| EB ^c (Kcal Kg-1) | 3.56 | 4.47 | 4.50 | 4.54 | 4.46 | 4.54 | 4.46 |

^a Corrector vitamínico-mineral por kg de pienso: Vitamina A: 5000 UI; Vitamina D₃: 1000 UI; Vitamina E: 15 mg; Vitamina B₁: 1,3 mg; Vitamina B₂: 3,5 mg; Vitamina B₁₂: 0.025 mg; Vitamina B₆: 1,5 mg; Pantotenato cálcico: 10 mg; Ácido nicotínico: 15 mg;

Biotina: 0,1 mg; Ácido fólico: 0,6 mg; Vitamina K₃: 2 mg; Fe: 80 mg; Cu: 6 mg; Co: 0,75 mg; Zn: 60 mg; Mn: 30 mg; I: 0,75 mg; Se: 0,10 mg; Etoxiquin: 150 mg.

^b Digested crude protein was obtained from a fecal protein digestibility trial (Duran-Montgé et al. in press 2007)

^c EB=Energía bruta

Tabla 2. Contenido en ácidos grasos (mg g-1muestra)

| | Sin Grasa | Sebo | Girasol alto-oleico | Aceite Girasol | Aceite Linaza | Mezcla | Aceite Pescado |
|------------|-----------|-------|------------------------|-------------------|------------------|--------|-------------------|
| C16:0 | 0.48 | 28.70 | 7.87 | 11.22 | 8.21 | 19.96 | 12.95 |
| C16:1 | 0.00 | 2.37 | 0.19 | 0.11 | 0.08 | 1.35 | 1.81 |
| C18:0 | 0.14 | 22.85 | 4.25 | 5.56 | 3.64 | 12.79 | 4.07 |
| C18:1(n-9) | 0.56 | 34.76 | 86.78 | 32.52 | 20.74 | 29.53 | 18.99 |
| C18:2(n-6) | 1.38 | 14.20 | 21.50 | 73.28 | 26.18 | 26.04 | 21.49 |
| C18:3(n-3) | 0.18 | 1.90 | 1.29 | 1.26 | 47.10 | 18.94 | 31.20 |
| C20:5 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.02 | 3.88 |
| C22:6 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.00 | 0.04 | 12.30 |
| Suma de AG | 2.9 | 116.8 | 125.6 | 128.0 | 108.1 | 115.4 | 114.7 |

AG: Ácidos grasos,

Tabla 3. Efecto de la dieta sobre el contenido relativo de mRNA de genes relacionados con el metabolismo lipídico en hígado y tejido adiposo (mg g-1muestra)*

| | Sin Grasa | Sebo | Girasol alto-oleico | Aceite Girasol | Aceite Linaza | Mezcla | Aceite Pescado | P |
|-----------------------|-------------------|--------------------|------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------|
| <i>Hígado</i> | | | | | | | | |
| ACACA | 1.0 ^{bc} | 1.00 ^{bc} | 1.49 ^a | 1.16 ^{ab} | 1.07 ^{bc} | 1.03 ^{bc} | 0.85 ^c | 0.014 |
| FASN | 1.0 | 0.72 | 1.15 | 1.20 | 0.69 | 0.87 | 0.49 | 0.25 |
| SREBP1 | 1.0 ^c | 1.31 ^{bc} | 2.06 ^a | 1.52 ^{abc} | 1.46 ^{abc} | 1.09 ^c | 0.61 ^d | 0.0002 |
| PPAR | 1.0 | 1.06 | 1.03 | 0.88 | 1.06 | 0.91 | 0.86 | 0.86 |
| SCD | 1.0 ^{cd} | 1.56 ^{bc} | 2.89 ^a | 2.22 ^{ab} | 1.80 ^{abc} | 1.16 ^{cd} | 0.64 ^d | 0.0004 |
| D6D | 1.0 | 1.52 | 1.52 | 2.00 | 1.04 | 0.95 | 0.70 | 0.11 |
| <i>Tejido adiposo</i> | | | | | | | | |
| ACACA | 1.0 ^a | 0.65 ^d | 0.66 ^{cd} | 0.84 ^{ab} | 0.84 ^{abc} | 0.75 ^{bcd} | 0.69 ^{bcd} | 0.0049 |
| FASN | 1.0 ^a | 0.30 ^d | 0.39 ^{bcd} | 0.53 ^b | 0.33 ^{cd} | 0.38 ^{bcd} | 0.42 ^{bcd} | <0.0001 |
| SREBP1 | 1.0 | 0.83 | 0.94 | 0.93 | 0.91 | 1.08 | 0.85 | 0.70 |
| PPAR | 1.0 | 1.08 | 1.16 | 1.13 | 1.01 | 0.94 | 0.96 | 0.79 |
| SCD | 1.0 ^a | 0.43 ^b | 0.41 ^{bc} | 0.54 ^b | 0.22 ^c | 0.43 ^b | 0.38 ^{bc} | 0.0031 |
| D6D | 1.0 | 1.17 | 1.28 | 1.15 | 1.20 | 0.96 | 1.04 | 0.86 |

*El contenido en mRNA es relativo al contenido de la dieta Sin Grasa.

Acetil CoA carboxilasa α (ACACA), Ácido Graso sintasa (FASN), sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP1), peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR- α), estearoil CoA desaturasa (SCD), Δ 6-desaturasa (D6D), HPRT1: Hipoxantina fosforibosiltransferasa

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Lee, S.S.T., et al., Molecular and Cellular Biology, 1995. 15(6): p. 3012-3022.
- Kim, J.B. and B.M. Spiegelman, Genes & Development, 1996. 10(9): p. 1096-1107.
- O'Hea, E.K. and G.A. Leveille, Journal of Nutrition, 1969. 99(3): p. 338-&.
- Liu, B.H., et al., Journal of Animal Science, 2005. 83: p. 1516-1525.
- Hsu, J.M., et al., Journal of Animal Science, 2004. 82(3): p. 683-689.
- Azain, M.J., Journal of Animal Science, 2004. 82: p. 916-924.
- Duran-Montgé, P., et al., Livestock Science, 2007.
- Folch, J., M. Lees, and G.H.S. Stanley, Journal of biological chemistry, 1957. 226(1): p. 497-509.
- Brown, M.S. and J.L. Goldstein, Cell, 1997. 89(3): p. 331-340.
- Xu, J., et al., Journal of Biological Chemistry, 2001. 276(13): p. 9800-9807.
- Xu, J., et al., Journal of Nutrition, 2002. 132(11): p. 3333-3339.
- Liu, B.H., et al., Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2005. 18(10): p. 1451-1456.
- Smith, D.R., D.A. Knabe, and T.B. Smith, Journal of Animal Science, 1996. 74: p. 975-983.
- Allee, G.L., D.H. Baker, and G.A. Leveille, Journal of Animal Science, 1971. 33(6): p. 1248-&.

