

# LA CONCENTRACIÓN DE VITAMINA A EN EL PIENSO MODIFICA LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA REGULACIÓN METABÓLICA Y DIFERENCIACIÓN CELULAR EN PORCINO

Ayuso<sup>1</sup>, M., Fernández<sup>2</sup>, A., Isabel<sup>1</sup>, B., Rey<sup>1</sup>, A.I., Benítez<sup>2</sup>, R., Daza<sup>3</sup>, A., López-Bote<sup>1</sup>, C.J., Ovilo<sup>2</sup>, C.

<sup>1</sup> Dpto. Producción Animal, UCM. Ciudad Universitaria, s/n. 28040, Madrid

<sup>2</sup> Dpto. de Mejora Genética Animal, INIA, Ctra. Coruña Km. 7.5. 28040 Madrid

<sup>3</sup> Dpto. Producción Animal, UPM. Ciudad Universitaria, s/n. 28040, Madrid

[mayher@live.com](mailto:mayher@live.com)

## INTRODUCCIÓN

La vitamina A (vit A) es un retinoide natural cuya implicación en la regulación transcripcional de numerosos genes ha sido ampliamente estudiada y demostrada (Balmer y Blomhoff, 2002). Hay muchos trabajos realizados en humano y ratón en los que se valora su influencia en procesos fisiológicos muy importantes desde el punto de vista biomédico. También se ha estudiado el efecto de la vit A en especies ganaderas como ovino, vacuno o porcino (Daniel et al., 2004, Siebert et al., 2006, Olivares et al., 2011). Esto es debido a su influencia sobre la adipogénesis, fenómeno muy importante en el ámbito de la producción animal, ya que su alteración puede afectar a la calidad de la canal y de la carne. De hecho, la restricción de vit A en la dieta se ha propuesto como una posible herramienta para mejorar la calidad de la carne.

El objetivo de este estudio es comprobar el efecto de la restricción de vit A en la dieta de cerdos ibéricos sobre la expresión de un panel de genes candidato relacionados con la función de la vit A en relación a la adipogénesis, en tejidos adiposo y hepático. Los genes se han elegido por su importancia en procesos relacionados con el metabolismo y función de la vit A, tales como su activación y almacenamiento (*ADH1C*, *ALDH1A1* y *LRAT*), su transporte y señalización (*RBP4*, *CRABP2* y *FABP5*), así como en el control transcripcional de la adipogénesis (*PPAR $\gamma$* , *SREBP1C*, *RAR $\alpha$*  y *RXR $\gamma$* ) y el control de la lipogénesis y el metabolismo lipídico (*FASN*, *ELOVL6*, *ME1*, *ACACA*, *ACSL4*, *SCD*, *ACOX1*, *INSR*, *IGF1* y *LEP*)

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Animales y toma de muestras:** Se emplearon 40 machos castrados ibéricos, de estirpe Torbiscal, nacidos en el CIA "Dehesón del Encinar". A los 2 meses de edad, se establecieron dos grupos experimentales, control (C, n=20) y restringidos (R, n=20), que consumieron el mismo pienso que el grupo control, pero sin aporte de vit A en el corrector. Los animales se pesaron quincenalmente y recibieron el tratamiento hasta su sacrificio. Veinte animales (10C y 10R) se sacrificaron con 100 kg de peso vivo y los otros 20 con 160 kg de peso. Tras el sacrificio, se recogieron muestras de hígado, músculo *longissimus dorsi* y tocino dorsal, a nivel de la última costilla, para el análisis de ácidos grasos (AG) (-20°C) y para el estudio de expresión (-80°C). Se registró el peso de la canal, el espesor del tocino dorsal y el peso de piezas nobles.

**Estudio de expresión génica:** Se extrajo ARN total con el sistema Ribopure (Ambion) en muestras de grasa dorsal (capa interna) y de hígado. Se diseñaron parejas de cebadores a partir de las secuencias disponibles de ARNm porcino. La cuantificación se llevó a cabo mediante qPCR con SYBR Green (Roche) en un equipo Lightcycler 480 (Roche). Se utilizaron los genes *GAPDH* y *TBP* como endógenos para la normalización.

**Análisis estadístico:** El análisis de la expresión génica se llevó a cabo mediante un modelo lineal mixto en el que se incluye dieta x gen como efecto fijo y como aleatorios los efectos de la camada y el animal, específicos para cada gen (diana y referencia); y el efecto muestra, común a todos los genes (Steibel et al., 2009). Los efectos de la dieta sobre los genes fueron estimados mediante los correspondientes contrastes.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El tratamiento aplicado no produjo ningún efecto significativo sobre el crecimiento o engrosamiento de los animales. Sin embargo, la restricción de vit A afectó al perfil de

AG de la grasa dorsal e intramuscular, incrementando la proporción de AG monoinsaturados.

La expresión de los 20 genes candidato seleccionados pudo cuantificarse eficazmente en ambos tejidos, grasa e hígado (Figuras 1 y 2), excepto *LEP* en hígado y *LRAT* en grasa, que no pudieron ser analizados por su escasa expresión.

En la grasa dorsal, los genes *SCD* y *CRABP II* presentaron mayor expresión en el grupo R ( $p < 0,05$ ). La enzima *SCD* (*stearoyl-CoA desaturase* o  $\Delta$ -9 *desaturasa*) está relacionada con la desaturación de AG, y su expresión diferencial explica las diferencias fenotípicas encontradas en estos animales en cuanto al grado de saturación de la grasa dorsal e intramuscular, comentadas en otra comunicación. El *CRABP II* (*cellular retinoic acid binding protein 2*), es una proteína coactivadora del ácido retinoico (AR), que favorece el transporte del AR al núcleo y su unión al receptor nuclear RAR $\alpha$  (retinoic acid receptor alpha) favoreciendo sus efectos transcripcionales de inhibición de la diferenciación de células grasas. Por otro lado, la mayor expresión de *CRABP II* en el grupo R podría ser un mecanismo encaminado a favorecer la correcta señalización del escaso AR disponible en este grupo (Budhu y Noy, 2002).

Por el contrario, el gen *RXR $\gamma$*  presenta menor expresión en el grupo R ( $p < 0,0005$ ), y el gen *INSR* muestra una tendencia similar ( $p = 0,053$ ). El gen *RXR $\gamma$*  (*retinoid X receptor, gamma*) codifica para un receptor nuclear que interviene en el mecanismo de acción de AR, favoreciendo su efecto antiadipogénico (Bonet et al., 2003). Esto se refleja en los resultados fenotípicos en los que, a pesar de no existir diferencias en cuanto al espesor de tocino dorsal entre tratamientos, si se observa una correlación negativa (-0.683) entre dicho parámetro y la expresión de *RXR $\gamma$*  ( $p < 0,001$ ). El gen *INSR* (*insulin receptor*) codifica para el receptor que media la acción de la insulina, muy relacionada con el metabolismo de la glucosa y de los lípidos. Al contrario de lo que ocurría con el gen *CRABP II*, que se expresa en preadipocitos, pero no en adipocitos maduros (Berry et al., 2010), la expresión del *INSR* en preadipocitos es muy escasa y aumenta según las células van completando su proceso de diferenciación a adipocitos (Hausman et al., 2009). Los resultados obtenidos para estos dos genes son por tanto concordantes y sugieren una mayor proporción de adipocitos maduros en el grupo C y mayor proporción de preadipocitos en el grupo R, lo que se puede asociar a una adipogénesis más activa en el grupo R, con una continua diferenciación de células madre a preadipocitos (Hausman et al., 2009).

En cuanto al análisis de expresión realizado en el hígado, observamos un efecto positivo de la restricción de vit A sobre la expresión de los genes *IGF1* y *ACSL4* ( $p < 0,05$ ), así como un valor próximo a la significación en el caso de *ACOX1* ( $p = 0,059$ ). *IGF1* (*insulin-like growth factor 1*) codifica una proteína similar a la insulina en estructura y función, con un papel importante en la estimulación de la proliferación y diferenciación de preadipocitos (Hausman et al., 2009), de modo que su mayor expresión en el grupo R podría favorecer la adipogénesis y el engrasamiento. Las enzimas *ACSL4* (*acyl-CoA synthetase long-chain family member 4*) y *ACOX1* (*acyl-CoA oxidase 1, palmitoyl*) catalizan distintas reacciones de síntesis lipídica y/o  $\beta$ -oxidación de AG, por lo que su mayor expresión en el grupo R indicaría un metabolismo de AG más activo.

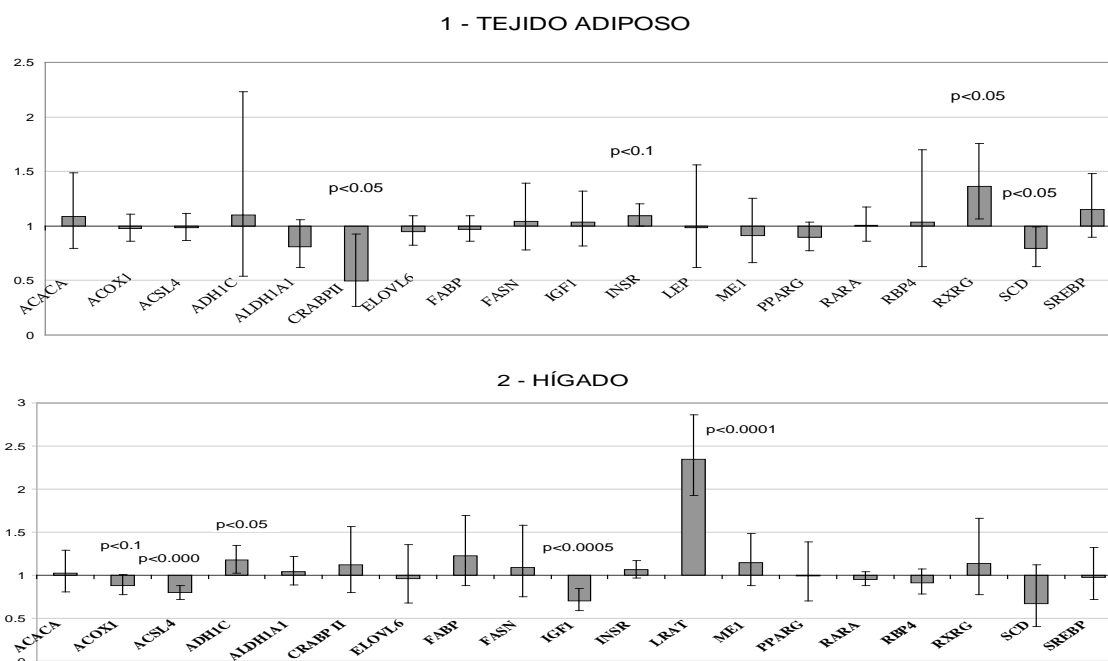
En el caso de los genes *LRAT* y *ADH1C*, que codifican enzimas relacionadas con el metabolismo del retinol, el efecto de la restricción sobre su expresión en hígado fue negativo ( $p < 0,05$ ). *LRAT* (lecithin retinol acyltransferase) cataliza la esterificación de AR a retinil éster, la forma en la que se almacena. En cuanto a *ADH1C* (*alcohol dehydrogenase 1C*), es la enzima responsable de la oxidación del retinol a retinaldehído para su activación. La menor expresión de ambas enzimas en el grupo R es coherente con la falta de sustrato.

Los resultados obtenidos muestran efectos relativamente modestos de la restricción de vit A sobre la expresión génica, pero concordantes con una adaptación de ambos tejidos a la falta de retinol y con la hipótesis de estimulación de la adipogénesis y el metabolismo lipídico en animales sometidos a dicha restricción

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Balmer, J. E. y R. Blomhoff. 2002. *J Lipid Res* 43: 1773-1808. ♦ Berry, D.C., Soltanian, H. & Noy, N. 2010. *J Biol Chem.* 285: 15324-15332. ♦ Bonet, ML., Ribot, J., Felipe, F., Palou, A. 2003. *Cell Mol Life Sci.* 60: 1311-1321. ♦ Budhu, A.S., & Noy, N. 2002. *Mol. Cell. Biol.* 22: 2632-2641. ♦ Daniel, Z.C.T.R., Salter, A.M., Buttery, P. J. 2004. *Anim Sci.* 78: 237-243. ♦ Hausman, GJ, Dodson, MV, Ajuwon, K, Azain, M, Barnes, K, Guan, LL, Jiang, Z, Poulos, S.P., Sainz, R.D., Smith, S., Spurlock, M., Novakofski, J., Fernyhough, M.E. & Bergen, W.G. 2009. *J Anim Sci.* 87: 1218-1246. ♦ Olivares, A., Rey, A.I., Daza, A., López-Bote, C.J. 2011. *Livest Sci.* 137: 31-36. ♦ Siebert, BD., Kruk, ZA., Davis, J., Pitchford, WS., Harper, GS., Bottema, CDK. 2006. *Lipids.* 41: 365-370. ♦ Steibel, JP., Poletto, R., Coussens, PM., Rosa, GJM. 2009. *Genomics.* 94: 146-152.

**Agradecimientos:** AGL2010-21991-C03-00, CAM-S2009-AGR1704, personal del CIA 'Dehesón del Encinar' (Oropesa, Toledo) e I. Martín de la Torre



**Figuras 1 y 2:** Cambio de expresión (fold change) de los genes estudiados en grasa (1) e hígado (2) del grupo control frente al restringido. Valores superiores a 1 indican mayor expresión del gen en el grupo C.

### DIETARY VITAMIN A MODIFIES THE EXPRESSION OF GENES INVOLVED IN METABOLIC REGULATION AND CELL DIFFERENTIATION IN PIGS

**ABSTRACT:** Vitamin A (vit A) is a key regulator of gene expression, influencing adipogenesis and lipogenesis in animal tissues. We studied the effect of dietary vit A restriction on the expression of candidate genes for adipogenesis, lipogenesis and vit A metabolism in porcine tissues. Forty Torbisal pigs were given a standard or a vit A restricted diet from two months of age until sacrifice at 100 and 160kg LW. Vitamin A restriction modified the expression of three genes in adipose tissue (*SCD* and *CRABP1* were upregulated and *RXRg* was downregulated). In liver, *IGF1* and *ACSL4* were upregulated and *LRAT* and *ACOX1* were downregulated. The results show coherent effects of the diet on retinol metabolism and agree with the potential relationship of vit A restriction with adipogenesis and lipid metabolism.

**Keywords:** Vitamin A, gene expression, adipogenesis, pig.