

Universidad Pública de Navarra

*Nafarroako Unibertsitate Publikoa*

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR  
DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

*NEKAZARITZA INGENIARIEN  
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKOA*

**EFFECTO DE LA DIETA EN EL NIVEL DE EXPRESIÓN GÉNICA DE LAS ENZIMAS  
ACETIL-COA CARBOXILASA, LIPOPROTEIN LIPASA Y ESTEAROIL-COA  
DESATURASA, ENZIMAS LIPOGÉNICAS IMPLICADAS EN LA SÍNTESIS Y  
ACUMULACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS EN EL DEPÓSITO  
SUBCUTÁNEO DE OVINO**

presentado por

OLAIA URRUTIA VERA(*e*)*k*

*aurkeztua*

INGENIERO AGRÓNOMO  
*NEKAZARITZA INGENIARITZA*

Septiembre, 2010/ *2010ko otsaila*

ANA ARANA NAVARRO, Catedrática en Ciencias Biológicas, Profesora titular del Área de Producción Animal de la Universidad Pública de Navarra.

INFORMA:

Que el Trabajo Fin de Carrera titulado “Efecto de la dieta en el nivel de expresión génica de las enzimas Acetil-CoA Carboxilasa, Lipoprotein Lipasa y Esteroil-CoA Desaturasa, enzimas lipogénicas implicadas en la síntesis y acumulación de ácidos grasos insaturados en el depósito subcutáneo de ovino” que presenta la alumna OLAIA URRUTIA VERA ha sido realizado en el Departamento de Producción Agraria de esta Universidad bajo mi dirección y autorizo su presentación.

Y para que conste fimo el presente informe en Pamplona, a 31 de agosto de 2010.

Fdo. Ana Arana Navarro

## AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer, en primer lugar, a Ana Arana, mi tutora en este trabajo fin de carrera, que con su gran ayuda y apoyo en todo momento, ha hecho posible la realización del mismo.

A mis compañeras de laboratorio, que siempre han contestado sin problema y con amabilidad todas las dudas que me han surgido.

Quisiera dar las gracias a mis compañeras de la universidad, que con ellas he vivido tantos momentos, alegrías y desilusiones de estos años de carrera, que son un recuerdo inolvidable.

Un agradecimiento especial a mi familia, mis padres, a los que debo el haber llegado aquí, mi hermano Unai y a ti, Miguel Mari, por apoyarme y ayudarme en todo estos años de carrera. En especial a “Amatxo”, por estar tantas horas a mi lado, aguantarme y comprenderme.

A todos ello, muchas gracias de corazón.

# ÍNDICE

# ÍNDICE

Índice.....	i
Abreviaturas.....	iii
Índice de tablas.....	iv
Índice de figuras.....	v
Resumen.....	1
1. Introducción.....	3
2. Revisión bibliográfica.....	5
2.1. El ganado ovino de carne.....	5
2.1.1. Censo de ganado ovino en España.....	5
2.1.2. Consumo de carne de ovino en España.....	7
2.1.3. Ganado ovino de Raza Navarra.....	8
2.2. Efecto de los ácidos grasos en la salud humana.....	8
2.3. Ácidos grasos (AG).....	11
2.3.1. Características generales y tipos de ácidos grasos.....	11
2.3.1.1. Definición y funciones.....	11
2.3.2. Nomenclatura.....	12
2.3.3. Tipos de ácidos grasos importantes.....	13
2.3.3.1. Ácidos grasos saturados.....	13
2.3.3.2. Ácidos grasos monoinsaturados .....	14
2.3.3.3. Ácidos grasos poliinsaturados $\omega$ -3 y $\omega$ -6 .....	14
2.3.3.4. Ácido alfa-linolénico (ALA).....	16
2.3.3.5. Ácido linoléico conjugado (ALC o CLA).....	16
2.3.4. Metabolismo de los ácidos grasos en rumiantes.....	17
2.3.4.1. Metabolismo del rumen.....	17
2.3.4.2. Metabolismo del ácido alfa-linolénico.....	20
2.3.4.3. Metabolismo del ácido linoléico conjugado.....	21
2.3.4.4. Biosíntesis de los ácidos grasos.....	23
2.3.5. Efecto de la dieta en la composición de los ácidos grasos	

de la carne y grasa.....	24
2.4. Enzimas implicadas en síntesis y acumulación de los ácidos grasos.....	27
2.4.1. Acetil-CoA Carboxilasa.....	27
2.4.2. Lipoprotein Lipasa.....	28
2.4.3. Estearoil-CoA Desaturasa.....	29
2.5. Efecto de la modificación de los ácidos grasos mediante estrategias alimentarias en la expresión génica de las enzimas implicadas en la síntesis y acumulación de dichos ácidos grasos.....	30
3. Objetivos y planteamiento experimental.....	31
4. Material y métodos.....	32
4.1. Material.....	32
4.1.1. Material animal.....	32
4.1.2. Sacrificio y toma de muestras.....	36
4.2. Metodología para el análisis de la expresión génica de las enzimas lipogénicas ACC, LPL y SCoAD.....	37
4.2.1. Obtención de ARNm a partir de tejido subcutáneo.....	42
4.2.1.1. Extracción de ARNm de tejido subcutáneo.....	42
4.2.1.2. Cuantificación de ARNm total.....	45
4.2.1.3. Tratamiento con DNAsas para muestras de ARNm.....	45
4.2.2. Obtención de cDNA a partir de ARNm por medio de la reacción de la transcriptasa inversa.....	46
4.2.3. Amplificación cualitativa de marcadores a partir de cDNA y clonación.....	47
4.2.3.1. Diseño de los cebadores para la PCR.....	47
4.2.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR cualitativa).....	48
4.2.3.3. Electroforesis de ADN en gel de agarosa.....	50
4.2.4. Clonación.....	51
4.2.5. Curvas estándar y análisis de eficiencia.....	55
4.2.6. Procedimiento operativo para la amplificación de cDNA de los marcadores mediante la PCR a tiempo real. ....	58
4.2.7. Análisis estadístico.....	58

5. Resultados.....	59
5.1 Puesta a punto de la técnica para el estudio del efecto de la dieta en el nivel de expresión génica de enzimas lipogénicas Acetil-CoA Carboxilasa, Lipoprotein Lipasa y Estearoil-CoA DesaturasaPCR a tiempo real con muestras individuales y con muestras colectivas o “pooles”.....	59
5.1.1. Extracción de ARNm y obtención de cDNA a partir de ARNm.....	59
5.1.2. Amplificación cualitativa de marcadores a partir de cDNA y clonación.....	59
5.1.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa.....	59
5.1.2.2 Clonación.....	61
5.1.2.3. Curvas estándar y análisis de eficiencia.....	63
5.2. PCR a tiempo real con muestras individuales y qPCR con muestras colectivas o “pooles”.....	67
5.3. Efecto de la dieta en el nivel de expresión génica de tres enzimas lipogénicas.....	68
Acetil-CoA Carboxilasa.....	68
5.3.2. Lipoprotein Lipasa.....	69
5.3.3. Estearoil-Coa Desaturasa.....	70
6. Discusión.....	71
6.1. Acetil-CoA Carboxilasa.....	71
6.2. Lipoprotein Lipasa.....	72
6.3. Estearoil-CoA Desaturasa.....	73
7. Conclusiones.....	74
8. Referencias bibliográficas.....	75

## ABREVIATURAS

ACC: Acetil-CoA Carboxilasa

ACC1: Isoenzima 1 de la Acetil-CoA Carboxilasa

ACC2: Isoenzima 2 de la Acetil-CoA Carboxilasa

AG: Ácido graso

AGE: Ácidos grasos esenciales

AGMI (o MUFA): Ácido graso monoinsaturado

AGPI (oPUFA): Ácido graso poliinsaturado

AGS: Ácido graso saturado

AGV: Ácidos grasos volátiles

ALA: Ácido alfa-linolénico

CCAE: Confederación de Cooperativas Agrarias de España,

CLA (o ALC): Ácido linoléico conjugado

DEPC: Agua tratada con agente que desactiva las RNAsas del medio

DHA: Ácido docosahexanoico

EM: Energía Metabolizable

EPA: Ácido eicosapentaenoico

FAS: Sintetasa de Ácidos Grasos

GMD: Ganancia media diaria

G3PDH: Glicerol 3 fosfato deshidrogenada

IC: Índice de conversión



ICDH: NAD-Isocitrato Deshidrogenada

IM: Intramuscular

ITG: Instituto Técnico de Gestión

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

LA: Ácido linoléico

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LPL: Lipoprotein Lipasa

L0: Lote Control

L5: Lote lino 5%

L10: Lote lino 10%

MARM: Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino,

MD: Enzima málica

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAC: Política Agraria Común

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

VLDL: Lipoproteínas de muy baja densidad

PV: Peso vivo

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

SC: Subcutáneo

SCD1: Isómero 1 de la enzima SCD

SCD2: Isómero 2 de la enzima SCD

SCoAD (o SCD): Estearoil-CoA Desaturasa

TFC: Trabajo Fin de Carrera

TG: Triglicéridos

UE: Unión Europea

UV: Luz ultravioleta

VTA: Ácido *trans* vaccénico

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Análisis provincial del número de animales de ganado ovino.....	5
<b>Tabla 2.</b> Tipos de ácidos grasos de la serie omega 3.....	15
<b>Tabla 3.</b> Tipos de ácidos grasos de la serie omega 6.....	15
<b>Tabla 4.</b> Composición en materias primas (%) y composición de los piensos utilizados.....	34
<b>Tabla 5.</b> Parámetros de crecimiento y cebo de los corderos.....	35
<b>Tabla 6.</b> Efecto de la dieta en la composición en ácidos grasos de la grasa subcutánea en corderos de Raza Navarra (media y error estándar).....	36
<b>Tabla 7.</b> Características de los cebadores utilizados en presente trabajo.....	48
<b>Tabla 8.</b> Cuantificación del producto de la clonación.....	63
<b>Tabla 9.</b> Número de moléculas obtenidas tras la clonación.....	64
<b>Tabla 10.</b> Eficiencias de amplificación de la PCR a tiempo real.....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación gráfica de la evolución del número de cabezas de ganado ovino (miles de animales).....	7
<b>Figura 2.</b> Ácido <i>cis</i> -9-octadecenoico.....	12
<b>Figura 3.</b> Configuración <i>cis</i> y <i>trans</i> del ácido oleico.....	13
<b>Figura 4.</b> Biohidrogenación del ácido linoleico.....	18
<b>Figura 5.</b> Hidrogenación bacteriana del ácido alfa linolénico.....	19
<b>Figura 6.</b> Biosíntesis del Ácido docosahexaenoico a partir del ALA.....	20
<b>Figura 7.</b> Principales rutas de formación del ácido ruménico en el rumen y en la glándula mamaria de los rumiantes a partir del ácido linoleico y linolénico.....	22
<b>Figura 8.</b> Rutas bioquímicas del proceso de desaturación que interviene en la síntesis endógena de 9c11tCLA.....	22
<b>Figura 9.</b> Principales vías metabólicas implicadas en la lipogénesis del tejido graso de los rumiantes.....	24
<b>Figura 10.</b> Planta de lino.....	25
<b>Figura 11.</b> Semilla de lino.....	25
<b>Figura 12.</b> Esquema conjunto del metabolismo lipídico en el hígado y el tejido adiposo..	29
<b>Figura 13.</b> Finca experimental “El Serrón”, Valtierra.....	32
<b>Figuras 14.</b> Toma de muestras del depósito pelviorrenal.....	37
<b>Figuras 15.</b> Toma de muestras del depósito subcutáneo.....	37

<b>Figuras 16.</b> Toma de muestras del depósito intramuscular.....	37
<b>Figura 17.</b> Gráfico de amplificación para determinar el Ct.....	39
<b>Figura 18.</b> Material esterilizado y tratado con RNase ZAP.....	42
<b>Figura 19.</b> Troceado de la muestra con bisturí.....	43
<b>Figura 20.</b> Homogeneizado con nitrógeno líquido.....	43
<b>Figura 21.</b> Muestra en forma de polvo.....	43
<b>Figura 22.</b> Trasfiriendo la muestra a una columna.....	44
<b>Figura 23.</b> Desechando el eluído.....	44
<b>Figura 24.</b> Corte de la banda de ADN.....	51
<b>Figura 25.</b> Curvas de disociación de diversas amplificaciones.....	57
<b>Figura 26.</b> Amplificación del gen $\beta$ actina mediante PCR cualitativa.....	60
<b>Figura 27.</b> Amplificación del gen ACC y LPL mediante PCR cualitativa.....	60
<b>Figura 28.</b> Amplificación del gen SCoAD mediante PCR cualitativa.....	61
<b>Figura 29.</b> Amplificación del gen $\beta$ actina para la comprobación de la clonación.....	62
<b>Figura 30.</b> Amplificación del gen ACC y LPL para la comprobación de la clonación....	62
<b>Figura 31.</b> Amplificación del gen SCoAD par la comprobación de la clonacion.....	63
<b>Figura 32.</b> Curva estándar del gen $\beta$ actina.....	64
<b>Figura 33.</b> Curva estándar del gen Acetil-CoA Carboxilasa (ACC).....	65
<b>Figura 34.</b> Curva estándar del gen Lipoprotein Lipasa (LPL).....	65
<b>Figura 35.</b> Curva estándar del gen Stearoyl-CoA Desaturasa.....	66
<b>Figura 36.</b> Representación gráfica de los valores de Ct de las muestras individuales y las muestras colectivas.....	67

<b>Figura 37.</b> Representación gráfica de la expresión del gen Acetil-CoA Carboxilasa (ACC) para cada tratamiento.....	69
<b>Figura 38.</b> Representación gráfica del nivel de expresión del gen Lipoprotein Lipasa (LPL) para cada tratamiento.....	70
<b>Figura 39.</b> Representación gráfica de la expresión del gen Esteroil-CoA Desaturasa (SCoAD) para cada tratamiento.....	71
<b>Figura 40.</b> Nivel de expresión de los genes ACC, LPL y SCoAD para los diferentes tratamientos.....	71

# RESUMEN

## RESUMEN

En los últimos años, se ha producido una disminución en el consumo de carne de cordero. Una de las razones de este descenso en el consumo se debe a su alto contenido en ácidos grasos, ya que, existe una preocupación social por la salud, teniendo en cuenta que este tipo de grasas suponen un mayor riesgo de sufrir obesidad, cáncer y enfermedades cardiovasculares.

Como respuesta a dicha problemática, se diseñan estrategias de alimentación para los rumiantes con el objeto de modificar la composición de los ácidos grasos de su carne y de su grasa. Entre estas estrategias se encuentra la de alimentar a los corderos con materias primas ricas en ácidos grasos tipo omega 3, como es el lino.

En diversos estudios, se ha observado que este tipo de alimentación rica en ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) aumenta la composición en estos ácidos grasos (AG) en la carne y en la grasa, pero al mismo tiempo inhibe la actividad de algunas enzimas implicadas en la síntesis de estos ácidos grasos poliinsaturados, considerados como ácidos grasos “saludables”. Debido al efecto inhibitorio puede no lograrse el enriquecimiento en AGPI esperado en el diseño inicial del estudio.

El objetivo del trabajo fin de carrera realizado es el de estudiar el efecto de la dieta en el nivel de expresión génica de varias enzimas lipogénicas implicadas en la síntesis de ácidos grasos insaturados en el depósito subcutáneo de ovino.

El trabajo se ha realizado utilizando 36 corderos ternascos, provenientes de la explotación experimental de ovino de carne “El Serrón” del ITGG en Valtierra, divididos en tres lotes de 12 animales que recibieron tres dietas diferentes en función de su composición en lino; lote control (0% lino), lote 5% (5% de lino) y lote 10% (10% de lino). Los corderos presentaron diferencias en la composición de ácidos grasos del tejido subcutáneo como consecuencia de la inclusión del lino y aquellos que ingirieron lino en la ración presentaron mayor cantidad en la composición de ácido linolénico, ácido vaccénico y del C18:2n6t9t12 y el total de ácidos grasos omega 3.



Los genes, cuya expresión génica se ha analizado, han sido: la Acetil-CoA Carboxilasa (ACC), Lipoprotein Lipasa (LPL) y la Estearoil-CoA Desaturasa (SCoAD).

La metodología a utilizar consiste en la cuantificación de la expresión génica de las enzimas Acetil-CoA Carboxilasa (ACC), Lipoprotein Lipasa (LPL) y Estearoil-CoA Desaturasa (SCD) mediante la técnica de PCR a tiempo real utilizando el *método comparativo de Ct's*, siendo la  $\beta$  actina el gen endógeno.

Los resultados de este trabajo indican que la inclusión de lino en un 10% en la dieta de los corderos disminuye la expresión génica de la enzima relacionada con la síntesis *de novo* de ácidos grasos, la Acetil-CoA Carboxilasa. Además, el lino en la dieta, tanto al 5% como al 10%, incrementa la expresión génica de la enzima Lipoprotein Lipasa, enzima encargada de la captación desde la sangre de los ácidos grasos provenientes de la dieta. Por último, los corderos que ingirieron lino al 10% vieron disminuida la expresión génica de la enzima Estearoil-CoA Desaturasa.

Teniendo en cuenta estos resultados, podría indicar que las dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga además de aumentar la incorporación de ácidos grasos provenientes de la alimentación, disminuyen la síntesis *de novo* y la desaturación. Por lo que sería conveniente tener en cuenta estos efectos en el momento de diseñar las dietas a suministrar a los corderos con objeto de modificar determinados ácidos grasos en la carne y grasa de estos.

# INTRODUCCIÓN

# 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, en los países desarrollados, existe una gran sensibilización por el efecto del tipo de alimentación sobre la salud. Organizaciones como la Organización Mundial de la Salud recomiendan la disminución de consumo de las grasas saturadas debido al riesgo de sufrir obesidad, cáncer y enfermedades cardiovasculares (OMS, 2003). Además de reducir la cantidad de grasa saturada en la dieta, se recomienda incrementar el consumo de alimentos saludables como alimentos que contienen ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 o CLA.

A nivel estatal, la población española está abandonando los hábitos alimentarios de la dieta mediterránea con el consecuente efecto en la salud de las personas (Bondia, 2007). Heinrich, (1992), en una investigación realizada sobre los hábitos alimenticios y demanda de carne y productos cárnicos en España sostiene que la incidencia de ciertas enfermedades relacionadas con el consumo de grasa animal, se percibe como un condicionante que afecta negativamente al consumo de carne.

La carne de rumiante posee un alto contenido en ácidos grasos saturados y en menor cantidad, ácidos grasos poliinsaturados (beneficiosos para la salud), debido a esto, este tipo de carne ha visto disminuido su consumo por algunos grupos de consumidores. Por ello, comenzó a surgir la idea de utilizar diferentes estrategias alimentarias para aumentar los niveles los ácidos grasos poliinsaturados en la carne de rumiantes. Entre los compuestos utilizados en dichas estrategias alimentarias se encuentran los aceites vegetales como el lino, las harinas y aceites de pescado o microalgas (Bas *et al*, 2007).

En estudios realizados anteriormente como los de Sandeep *et al*, (2010), Geetha *et al*, (2000) y Bernard *et al*, (2005), se ha comprobado que la alimentación rica en ácidos grasos poliinsaturados inhibe la expresión génica de algunas enzimas implicadas en la síntesis de AG, de forma que no se produce el enriquecimiento previsto en determinados ácidos grasos poliinsaturados, considerados importantes para la salud.

En este sentido, en el Área de Producción Animal de la Universidad Pública de Navarra se ha realizado una investigación sobre el enriquecimiento en ácidos grasos

saludables (poliinsaturados  $\omega$ -3) de la carne de cordero de Raza Navarra mediante la utilización de lino como fuente alimentaria.

En dicho trabajo se ha observado que la inclusión de lino en la dieta no ha tenido un efecto sobre el crecimiento de los corderos ni sobre las características de la canal de los tres lotes tampoco se han observado diferencias. Los corderos alimentados con lino tampoco acumularon más grasa en sus depósitos y, por tanto, los parámetros relacionados con el desarrollo y metabolismo del tejido graso, es decir, el diámetro y número de adipocitos y actividad de las enzimas lipogénicas Glicerol-3-Fosfato-Deshidrogenasa, Sintetasa de Ácidos Grasos FAS, Isocitrato Deshidrogenasa y Glucosa6P-Deshidrogenasa, no presentaron diferencias para los tres grupos de corderos.

Por otra parte, observaron diferencias significativas en la composición de los ácidos grasos del tejido subcutáneo como consecuencia de la inclusión de lino en la dieta. Se produjo un incremento de la cantidad de ácido linolénico (ALA, C18:3n3c9c12c15), del ácido vaccénico, C18:1t11, y del C18:2n6t9t12. También se observó una disminución de los ácidos grasos de la familia  $\omega$ -6, entre ellos, del ácido linoleico (LA, C18:2n6c9c12). Sin embargo, no se observaron diferencias ni en el CLA, Ácido eicosapentaenoico (EPA) ni en el Ácido docosahexanoico (DHA).

Con el presente trabajo, se pretende estudiar si la utilización del lino en la dieta, que produce la variación de ácidos grasos anteriormente citados, ha tenido influencia sobre la expresión génica de enzimas encargadas de la síntesis y acumulación de ácidos grasos como son El Acetil-CoA Carboxilasa, Lipoprotein Lipasa y Esteroil-CoA Desaturasa, en el depósito subcutáneo de ovino.

# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. El ganado ovino de carne

#### 2.1.1. Censo de ganado ovino en España

En el año 2008 (Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, MARM) la cabaña ovina en España alcanzó el 21,9% del total de la Unión Europea (UE-27), únicamente superado por el Reino Unido, con el 24,4%. En la tabla 1 se muestra el número de animales por Comunidad Autónoma en España en el año 2008.

Más del 80% del ganado ovino se concentra en cinco regiones: Extremadura (20%), Castilla y León (17,7%), Castilla La Mancha (15,1%), Andalucía (13,4%) y Aragón (13,8%), según datos de la Confederación de Cooperativas Agrarias de España, CCAE (De Antonio, 2008).

Tabla 1. Análisis provincial del número de animales de ganado ovino, (MARM, diciembre 2008).

COMUNIDADES AUTÓNOMAS (CCAA)	TOTAL ANIMALES
Galicia	265.152
P. de Asturias	58.726
Cantabria	115.450
País vasco	333.090
Navarra	705.332
La rioja	136.821
Aragón	2.270.716
Cataluña	748.844
Baleares	400.139
Castilla y León	4.145.751
Madrid	103.317

---

Castilla-La Mancha	3.115.583
C. Valenciana	406.414
R. de Murcia	533.808
Extremadura	4.107.161
Andalucía	2.412.623
Canarias	93.355
España	19.952.282

---

La figura 1 ilustra la evolución del censo de ganado ovino en España en los últimos años.

La evolución del censo ovino en España permaneció prácticamente estable desde 1992 hasta el año 2000, con excepción del año 1995 en el cual descendió ligeramente. A partir del año 2000, el censo ovino muestra un retroceso anual, esta reducción se debe a razones coyunturales (aparición de lengua azul en 2007 y el encarecimiento de los precios de las materias primas para alimentación animal) como estructurales como es la aplicación de la Reforma de la PAC (MARM).



Figura 1. Representación gráfica de la evolución del número de cabezas de ganado ovino (miles de animales).

### 2.1.2. Consumo de carne de ovino en España

El consumo medio en los hogares españoles ha ido disminuyendo en los últimos años. En consumo medio se situaba en 4,45 kg *per capita* en 2007, mientras que en 2003 era de 5,94 kg (MARM, 2009).

El consumo de ovino muestra diferentes hábitos según las zonas geográficas. En general, presenta una tendencia al consumo de carnes de animales de edad inferior a 3 meses mientras que ha disminuido la demanda de carnes de animales de edades superiores.

Uno de los mayores problemas del consumo de ovino es la elevada estacionalidad y la percepción de un producto vinculado a fechas determinadas, sobre todo Navidad, de forma que no forma parte de la compra habitual (CCA). Por ejemplo, en mayo de 2008, el consumo de carne de ovino fue de 9.409 miles de kg, en diciembre del mismo año, sin embargo, fue de 17.283 miles de kg. (MARM, 2009).



### 2.1.3. Ganado ovino de Raza Navarra

En el año 1997, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, aprobó la Reglamentación Específica del Libro Genealógico de la raza ovina Navarra.

La importancia de la Raza Navarra reside, por una parte, en su significado en el campo económico-social de la zona de ocupación, al afectar a un importante número de familias que viven de los ingresos obtenidos del rebaño (Instituto Técnico de Gestión Ganadero, ITG Ganadero, 2010).

La distribución geográfica de la raza, en general se limita a Navarra, principalmente en su parte occidental media y Sur.

La raza Navarra es una raza destinada principalmente para la producción de carne. En este sentido, el “ternasco” ha sido el tipo comercial más importante y generalizado en la zona de explotación de la raza, corderos acabados con piensos concentrados hasta los 22-26 kg. de peso en vivo, generalmente en un período de tiempo inferior a los 90 días.

También existen dos tipos de producción alternativos: la producción del cordero lechal (peso máximo de 14 kg. en vivo y alimentado con la leche materna) y el cordero de tipo pascual pastenco, producido en la zona del Pirineo Navarro, durante los meses de julio y agosto y alimentado con la leche materna y recursos obtenidos del pastoreo (ITG Ganadero, 2010).

## 2.2. Efecto de los ácidos grasos en la salud humana

En las sociedades industrializadas, la creciente incidencia de enfermedades crónicas de tipo cardiovascular, metabólico y degenerativo es un fiel reflejo de los cambios en la alimentación de la población. Una dieta inadecuada puede multiplicar el riesgo de sufrir problemas coronarios, diabetes o cáncer, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2020 tres cuartas partes de las muertes prematuras que se produzcan en el mundo estarán causadas por este tipo de enfermedades.

Los alimentos funcionales que son aquellos que juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la salud y prevención de enfermedades, este hecho ha producido un

incremento en la demanda de este tipo de alimento debido a que los consumidores se preocupan por la relación existente entre la dieta y la salud.

Existe mucha diferencia entre los efectos que producen en la salud humana los distintos ácidos grasos que se pueden encontrar en los alimentos que forman la dieta (Gago *et al*, 2007):

- Ácidos grasos saturados de cadena media (C12:0-C16:0)

Este tipo de ácidos grasos presentes en la grasa de la leche de rumiantes, aceite de coco, palmiste o palma, incrementan la concentración total de colesterol en plasma y del LDL.

- Ácidos grasos monoinsaturados

Mayoritariamente se encuentran en grasas animales (monogástricos) y en algunos aceites vegetales como el de oliva o colza. Tienen un efecto positivo, reducen el nivel de LDL en plasma.

- Ácidos grasos poliinsaturados

Este tipo de ácidos grasos tienen un efecto hipocolesterolémico, se ha demostrado su eficiencia en la prevención de enfermedades cardiovasculares, en la reducción del crecimiento de distintos tumores, así como efectos antiinflamatorios y el desarrollo del cerebro y de las funciones mentales. Debido a estos efectos beneficiosos en para la salud se recomienda un consumo mínimo de este tipo de grasas, así como una relación máxima ácidos grasos omega 6 y omega 3 para favorecer la síntesis de productos activos de estos últimos a partir de sus precursores.

Los estudios nutricionales sobre los ácidos grasos omega 3 comenzaron en los años 70 dada la reducida incidencia de la mortalidad por enfermedades coronarias entra la población esquimal de Groenlancia, que consumía grandes cantidades de alimentos de origen marino ricos en ácidos grasos n-3: eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA).

Kim *et al*, (2009) llegaron a la conclusión de que el consumo elevado de ácidos grasos provenientes de pescado reducen el riesgo de cáncer de mama, además, la ingesta de

ácidos grasos omega 3 de pescado está inversamente asociado con el riesgo de cáncer de mama postmenopáusico.

Uno de los ácidos grasos omega 3 importantes es el ácido alfa-linolénico, un AG beneficioso para la salud. Hay estudios que han demostrado de que el ALA está asociado a un menor riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, aunque el mecanismo no es explicado aún de forma muy clara (Connor W. E., 2000 y Brouwer *et al.*, 2004).

Se ha sugerido en algunas investigaciones que existe un mayor efecto neuroprotector en modelos vivos para la isquemia y ciertos tipos de epilepsias con el aumento del consumo de ALA (Lauritzen *et al.*, 2000).

Estudios realizados han demostrado que los ácidos grasos omega 6 y omega 3 no sólo hay que tomarlos en cantidades suficientes, además hay que guardar una cierta proporción entre ambos tipos.

Una relación omega 6/omega 3 muy alta, promueve la patogénesis de muchas enfermedades, incluyendo las cardiovasculares, cáncer, inflamatorias y autoinmunes, mientras que niveles bajos de este ratio ejercen efectos supresores (Simopoulos A. P., 2001).

La disminución del ratio a 5:1 conlleva beneficios para los asmáticos y de 4:1 ayuda a prevenir enfermedades cardiovasculares hasta en un 40% en hombre y 50-70% en mujeres (Penny *et al.*, 2002). Un ratio 2-3:1, ayuda en la artritis reumatoide y cáncer colorectal (de Deckere, 1999).

Kiecolt-Glaser J. K. et al. (2007) encontraron que cuanto más alto era el nivel de ácidos grasos omega 6 en la sangre de los participantes en el estudio, más probabilidades tenían de sufrir síntomas de depresión y tener altos niveles de sustancias sanguíneas inflamatorias (Janice *et al.*, 2007).

De la Torre *et al.*, (2006) proponen un ratio n-6/n-3 menor o igual que cinco mientras que Wood *et al.*, (2004) recomiendan un valor menor que 4.

El ácido linoléico conjugado (CLA) es otro de los ácidos grasos importantes. Desde principios de este siglo, varios estudios han sugerido que el CLA podría tener efectos beneficiosos sobre la composición corporal y sobre el metabolismo de la glucosa y los

lípidos, a partir de los cual se empezó a considerar su uso y consumo como ingrediente funcional (fuente: Internacional Food Information Council Foundation).

Debido a estos efectos beneficiosos se han realizado estudios para modificar la cantidad de ácido graso conjugado en la carne y leche de rumiantes. Loor *et al*, (2003) estudiaron, entre otras cosas, el efecto de la dieta en el contenido de CLA en la leche de vaca mediante la inclusión de girasol y aceite de cártamo con infusiones al abomaso de los isómeros de CLA, *cis*9, *trans*11-CLA y *trans*10, *cis*12-CLA. Observaron que la concentración de *cis*9, *trans*11-CLA en leche aumenta con las infusiones de *cis*9, *trans*11-CLA, sin embargo, disminuye con las infusiones de *trans*10, *cis*12-CLA. La inclusión de *trans*10, *cis*12-CLA aumentan el contenido en leche de este isómero pero no afectan a la cantidad de CLA, *cis*9, *trans*11-CLA.

Wynn *et al*, (2006) llevaron a la conclusión de que la concentración de los isómeros *cis*9, *trans*11-CLA y *trans*10, *cis*12-CLA en el tejido adiposo subcutáneo, omental y pélvicorrenal de ovejas adultas aumenta de forma significativa con el incremento de CLA protegido, como suplemento a la alimentación.

## 2.3. Ácidos grasos (AG)

### 2.3.1. Características generales y tipos de ácidos grasos

#### 2.3.1.1. Definición y funciones

Un ácido graso es una biomolécula orgánica de naturaleza lipídica formada por elementos, tales como el carbono, hidrógeno y oxígeno, que se organizan en una larga cadena hidrocarbonada lineal, de número par de átomos de carbono, en cuyo extremo hay un grupo carboxilo. Los ácidos grasos pueden ser saturados (AGS, sin dobles enlaces), monoinsaturados (AGM, un doble enlace) o poliinsaturados (AGPI, dos a más dobles enlaces) (Chow y Lobb, 2008).

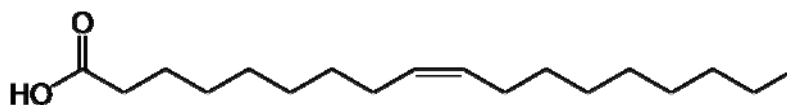


Figura 2. Ácido *cis*-9-octadecenoico (nomenclatura *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC).

Los ácidos grasos cumplen varias funciones biológicas; función energética, son moléculas muy energéticas y necesarias en todos los procesos celulares en presencia de oxígeno (cubren hasta el 40% de las necesidades energéticas en los humanos, en una dieta normal) (Lehning, 2009). También cumplen una función estructural, ya que, son componentes fundamentales de los fosfolípidos y esfingolípidos (moléculas que forman parte de la bicapa lipídica de las membranas de todas las células) y una función reguladora, algunos ácidos grasos son precursores de las prostanglandinas, tromboxanos y leucotrienos, moléculas que intervienen en la regulación y control de numerosos procesos vitales.

### 2.3.2. Nomenclatura

Existen varias alternativas a la hora de dar nombre a los ácidos grasos, a continuación se presentan los más utilizados.

El método sistemático nombra los ácidos grasos basándose en el número de átomos de carbono y el número y posición de dobles enlaces relativos al extremo carboxílico. Así, el ácido oleico, por ejemplo, se designa 18:1 (9); el número 18 indica el número de carbonos, el 1, el número de dobles enlaces y el 9, que el doble enlace comienza en el 9º carbono, contando desde el extremo  $-\text{COOH}$  (Chow y Lobb, 2008).

Otra designación de los ácidos grasos insaturados es aquella que nombra los ácidos grasos indicando la posición que ocupan los dobles enlaces con respecto al último carbono de la cadena (el extremo  $-\text{CH}_3$ ), es decir, el carbono  $\omega$  o  $n$ . En este caso la nomenclatura del ácido oleico será  $\omega$ -9 o  $n$ -9.

Otra de las letras griegas utilizada en la nomenclatura de los ácidos grasos el  $\Delta$  seguida de un número, designa la presencia y número de enlaces dobles o triples en la cadena hidrocarbonada contando desde el extremo carboxilo (Chow y Lobb, 2008).

A la hora de nombrar los ácidos grasos teniendo en cuenta su estructura, se definen dos tipos de ácidos grasos; *cis* y *trans*. Un ácido graso *cis* es un ácido graso insaturado en el cual los dos átomos de hidrógeno del doble enlace están situados en el mismo lado de la molécula formando un “codo” (la mayoría de los AG poseen esta configuración), mientras que los AG *trans* los dos átomos de carbono están uno a cada lado del doble enlace (molécula rectilínea).

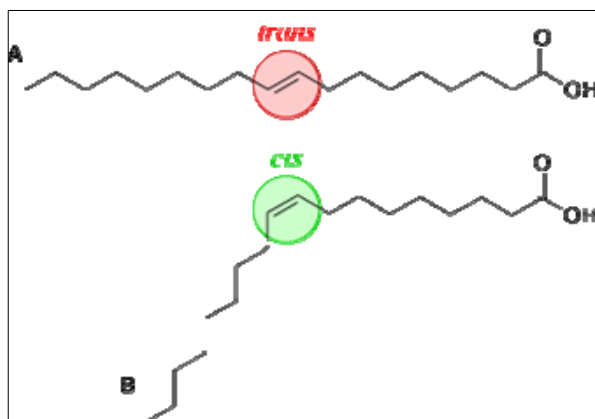


Figura 3. Configuración *cis* y *trans* del ácido oleico.

### 2.3.3. Tipos de ácidos grasos importantes

#### 2.3.3.1. Ácidos grasos saturados

Los ácidos grasos saturados son ácidos grasos en los que todos los enlaces entre los átomos de carbono de la cadena hidrocarbonada son simples, sin ningún doble enlace, lo que se traduce en una estructura rectilínea de la molécula.

Este tipo de ácidos grasos son más comunes en animales, su punto de fusión es más elevado que sus homólogos insaturados por lo que son sólidos a temperatura ambiente.

Uno de los ácidos grasos saturados que se citará posteriormente es el ácido esteárico, su fórmula química es  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$  y su nombre según IUPAC es ácido octadecanoico. A temperatura ambiente es un sólido, parecido a la cera (Chow y Lobb, 2008).

El ácido palmítico (Ácido hexadecanoico) es también un ácido graso saturado de cadena larga, y el es principal ácido graso saturado de la dieta.

#### 2.3.3.2. Ácidos grasos monoinsaturados (AGMI ó MUFA)

Los ácidos grasos monoinsaturados son aquellos ácidos grasos de cadena carbonada par que presentan un sólo doble enlace carbono-carbono.

El ácido oleico, llamados comúnmente omega 9, es un ácido de este tipo, componente principal de aceite de oliva, así como el ácido vaccenico, ácido graso que forma parte del proceso de la biohidrogenación ruminal.

### 2.3.3.3. Ácidos grasos poliinsaturados $\omega$ -3 y $\omega$ -6 (AGPI ó PUFA)

Los ácidos grasos poliinsaturados poseen más de un doble enlace entre sus carbonos, dentro de este grupo se encuentran los ácidos grasos de la serie omega 3 y serie omega 6.

Los ácidos grasos de la serie  $\omega$ -3 son ácidos grasos esenciales (AGE), es decir, ácidos grasos que el humano y los mamíferos son incapaces de sintetizar debido a la ausencia de las enzimas como  $\Delta$ 12 y  $\Delta$ 15 desaturasas (Lehninger, 2009).

Los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 se encuentran en algunas fuentes vegetales como las semillas de lino, la semilla de chía, el sacha inchi (48% de omega 3) y las nueces.

Los ácidos grasos esenciales son aquellos ácidos grasos que el organismo no puede sintetizar, por lo que deben obtenerse por medio de la dieta. Se trata de ácidos grasos poliinsaturados con todos los dobles enlaces en posición *cis*.

En la tabla 2 se observan los tipos de ácidos grasos de la serie  $\omega$ -3.

Tabla 2. Tipos de ácidos grasos de la serie omega 3 (Chow y Lobb, 2008).

Nombre común	Nomenclatura	Nombre químico
Ácido alfa-linolénico (ALA)	18:3 ( $\omega$ -3)	octadeca-9,12,15-trienoico
Ácido estearidónico	18:4 ( $\omega$ -3)	octadeca-6,9,12,15-tetraenoico
Ácido eicosatetraenoico	20:4 ( $\omega$ -3)	eicosa-8,11,14,17-tetraenoico
Ácido eicosapentaenoico (EPA)	20:5 ( $\omega$ -3)	eicosa-5,8,11,14,17-pentaenoico
Ácido docosapentaenoico	22:5 ( $\omega$ -3)	docosa-7,10,13,16,19-pentaenoico
Ácido docosahexanoico (DHA)	22:6 ( $\omega$ -3)	docosa-4,7,10,13,16,19-hexaenoico

Los ácidos grasos del tipo omega-6, también ácidos grasos esenciales, son ácidos grasos que presentan el primer doble enlace en el carbono de la posición 6 (desde el final de

la cadena del ácido graso). Este tipo de ácidos grasos son elongados a otros ácidos grasos como el ácido araquidónico o ácido docosahexaenoico.

En la tabla 3 se muestran los tipos de ácidos grasos de la serie  $\omega$ -6.

Tabla 3. Tipos de ácidos grasos de la serie omega 6 (Chow y Lobb, 2008).

Nombre común	Nomenclatura	Nombre químico
Ácido linoléico	18:2 ( $\omega$ -6)	Ácido 9,12-octadecadienoico
Ácido $\gamma$ -linolénico	18:3 ( $\omega$ 6)	Ácido 6,9,12-octadecatrienoico
Ácido eicosadienoico	20:2 ( $\omega$ -6)	Ácido 11,14-eicosadienoico
Ácido dihomo-gamma-linolénico	20:3 ( $\omega$ -6)	Ácido 8,11,14-eicosatrienoico
Ácido araquidónico	20:4 ( $\omega$ -6)	Ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico
Ácido docosadienoico	22:2 ( $\omega$ -6)	Ácido 13,16-docosadienoico
Ácido adrenico	22:4 ( $\omega$ -6)	Ácido 7,10,13,16-docosatetraenoico
Ácido docosapentaenoico	22:5 ( $\omega$ -6)	Ácido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico
Ácido caléndico	18:3 ( $\omega$ -6)	Ácido 8E,10E,12Z-octadecatrienoico

Los ácidos grasos de la serie omega-6 compiten con los ácidos grasos de la serie omega-3, ya que, compiten por las mismas enzimas de elongación y desaturación.

Estudios realizados han demostrado que ambos ácidos grasos no sólo hay que tomarlos en cantidades suficientes, además hay que guardar una cierta proporción entre ambos tipos (véase el apartado 3.2.6. Efecto de los ácidos grasos en la salud humana).

#### 2.3.3.4. Ácido alfa-linolénico (ALA)

El ácido alfa-linolénico (ALA) es un ácido graso esencial de la serie omega 3 (el isómero  $\alpha$ ), formado por 18 átomos de carbono con tres dobles enlaces en las posiciones 9, 12 y 15, junto con el ácido linoleico ( $\omega$ -6) es un precursor necesario en la biosíntesis de los



eicosanoides (prostanglandinas, tronboxanos y leucotrienos) que intervienen en numerosos procesos fisiológicos.

Este ácido graso precede de aceites de semillas o de vegetales con hojas verdes-oscuros, como son la semilla de lino, sésamo, cacahuete, girasol, soja, almendro, hojas de verdolaga o el fruto del nogal.

### 2.3.3.5. Ácido linoléico conjugado (ALC ó CLA)

El ácido linoleico conjugado, se refiere a un grupo de isómeros posicionales y geométricos del ácido linoléico, cuyos dobles enlaces están conjugados, es decir, que los dobles enlaces se encuentran separados por un solo átomo de carbono, al que están unidos por enlaces simples.

Los isómeros más abundantes son el *cis*-9, *trans*-11-C18:2 (ác. ruménico), *tras*-7, *cis*-9 C18:2 y *trans*-10, *cis*-12-C18:2. Comprenden un porcentaje del 80-90%, 16% y 3-5% del total, respectivamente (Barman *et al*, 2000 y Khanan y Dhiman. 2004).

Este tipo de ácidos grasos están presentes en la carne y productos lácteos procedentes de rumiantes.

### 2.3.4. Metabolismo de los ácidos grasos en rumiantes.

#### 2.3.4.1. Metabolismo del rumen

A nivel ruminal son cuatro los procesos que ocurren con los lípidos: hidrólisis, biohidrogenación, síntesis y saponificación de los ácidos grasos.

Los procesos de hidrólisis, biohidrogenación y saponificación son procesos que se dan siempre, sin embargo, la síntesis depende de la cantidad de ácidos grasos consumidos (Relling y Mattioli, 2003).

Tras la ingesta del alimento, comienza la digestión de las grasas en el rumen mediante el proceso de la hidrólisis por medio de lipasas bacterianas. Como principales productos de la hidrólisis se liberan ácidos grasos y glicerol, junto con alcoholes aminados derivados de los fosfolípidos y galactosa de los galactolípidos.

La hidrólisis de los lípidos de la dieta en el rumen tiene lugar por la acción de lipasas, galactosidasas y fosfolipasas producidas por bacterias (principalmente *Anaerovibrio lipolytica*) y protozoos (Harfoot y Hazlewood, 1988). En la mayoría de los casos, la lipólisis ocurre de forma rápida y casi total (90% en menos de una hora; Immig *et al*, 1993). Sin embargo, mediante estrategias alimentarias se puede modificar este hecho. Un incremento de la concentración de almidón en la dieta reduce, de forma muy significativa, la tasa de lipólisis en el rumen (Gerson *et al*, 1985). Este resultado podría ser debido a un cambio selectivo en la composición de la flora microbiana relacionado con el aumento de la acidez del contenido ruminal. En esta línea, Van Nevel y Demeyer (1996) observaron que un descenso del pH desde 6,3 hasta 5,25 reducía linealmente la liberación de ácido linoléico a partir de aceite de soja hasta menos de un tercio. También se ha observado que la adición de antibióticos, especialmente ionóforos, reduce el grado de lipólisis *in vitro* (Van Nevel y Demeyer, 1995).

El glicerol, los alcoholes aminados y la galactosa son metabolizados y convertidos en ácidos grasos volátiles (AGV), que son absorbidos por la pared ruminal.

El 70-90% de los ácidos grasos liberados en la hidrólisis sufren un proceso de hidrogenación bacteriana (especialmente la bacteria *Butirivibrio fibrisolvens*), el resto son incorporados al soma bacteriano pasando a ser una fuente de ácidos grasos esenciales e insaturados para el rumiante al ser absorbidos en el intestino.

En la biohidrogenación las enzimas isomerasas propias de la flora intestinal de los rumiantes transforman los ácidos grasos mono y poliinsaturados provenientes de la dieta en sus isómeros *trans*.

La hidrogenación del ácido linoleico (AL), ácido graso esencial, comienza con la isomerización del AL (*cis*-9, *cis*-12 octadecadienoico o *cis*-9, *cis*-12 C18:2) a *cis*-9, *trans*-11 C18:2, ácido linoleico conjugado. Posteriormente hay dos reducciones sucesivas, primero a 11-*trans* C18:1 (ácido *trans*-vaccénico) y posteriormente a C18:0 o ácido esteárico (Giacopini, 2007).

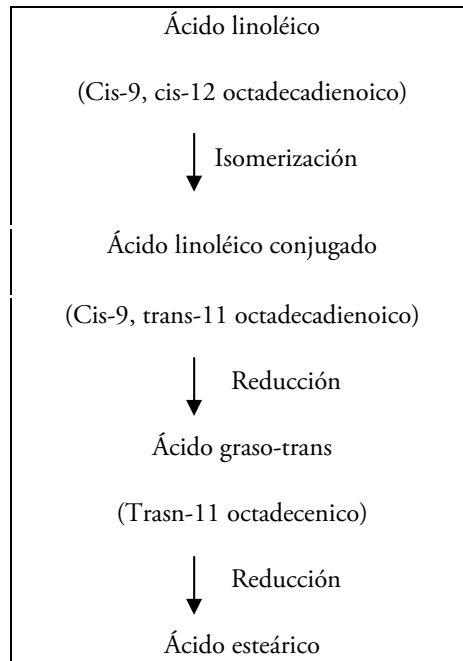


Figura 4. Biohidrogenación del ácido linoléico (Adaptado Harfoot y Hazelwood, 1988).

La biohidrogenación de otro ácido graso importante, el ácido alfa linoléico (ALA) es similar al del AL. La hidrogenación comienza con la isomerización del AAL, *cis*-9, *cis*-11, *cis*-15 C18:3, seguida por una secuencia de reducciones que finaliza con la formación de esteárico. Dicho proceso se ilustra en la figura 5.

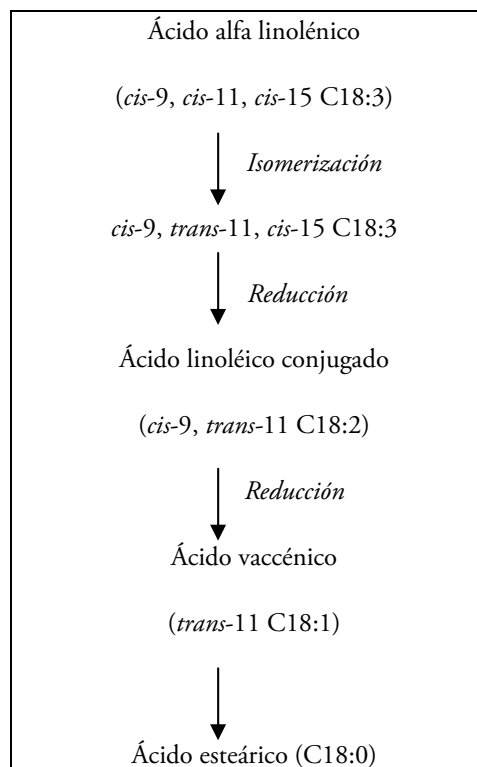


Figura 5. Hidrogenación bacteriana del ácido alfa linoléico (Adaptado Harfoot y Hazelwood, 1988).

Muchas veces la biohidrogenación no es completa quedando productos intermedios, de los cuales algunos tienen funciones metabólicas en los animales. El porcentaje de hidrogenación está en relación con la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados que llegan al rumen y del pH ruminal. A mayor cantidad de ácidos grasos insaturados, menor va a ser la proporción de biohidrogenación. Cuando más bajo es el pH ruminal, mayor es la inhibición del crecimiento de las bacterias encargadas de la biohidrogenación, sobre todo del grupo que realiza el último paso (de 18:1 a 18:0), quedando de esa forma mayor cantidad de metabolitos intermedios (Relling y Mattioli, 2003).

Actualmente, con el objetivo de aumentar la incorporación de ácidos grasos esenciales omega 3 (mediante la disminución del efecto biohidrogenizador del rumen), se han estudiado varias alternativas. Entre ellas, incluir los ácidos grasos insaturados o poliinsaturados (semillas de lino, colza, aceites de pescado, etc.) encapsulados en proteínas protegidas como formaldehído o por jabones cálcicos de ácidos grasos (Arana *et al.*, 2005).

El último de los cuatro procesos que tiene lugar en el rumen es la saponificación de los ácidos grasos, en el que, por el pH ácido del rumen, los lípidos forman jabones insolubles de calcio y magnesio, para posteriormente abandonar el rumen.

#### 2.3.4.2. Metabolismo del ácido alfa-linolénico (ALA)

Las células de los mamíferos no tienen la enzima,  $\Delta 15$ -Desaturasa, necesaria capaz de introducir un doble enlace en los átomos de carbono 15, por lo que, no pueden sintetizar el ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3  $\omega$ -3).

Como ya se ha dicho este ácido graso se considera “esencial”, y se incorpora al metabolismo de los rumiantes mediante la ingesta de alimento que lo contienen (fundamentalmente de origen vegetal).

Este ácido graso esencial se utiliza para la síntesis de otros ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, en ácido docosahexaenoico (C22:6  $\omega$ -3) es el más importante. La conversión de los ácidos grasos esenciales en sus derivados permite que éstos se incorporen rápidamente en los fosfolípidos, que forman parte de las membranas (Martínez *et al.*, 2002).

En la siguiente figura podemos ver la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3, siendo el ALA el precursor.

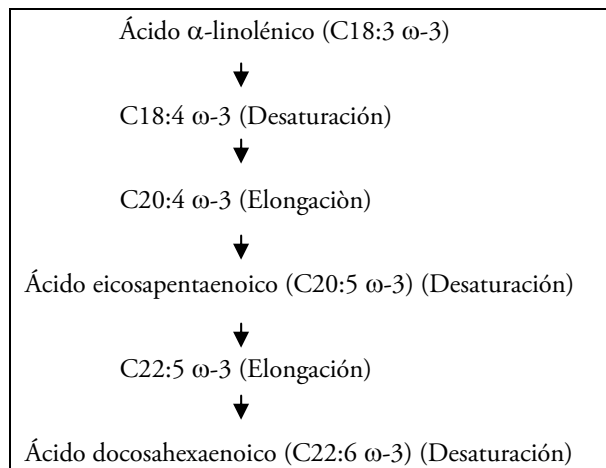


Figura 6. Biosíntesis del Ácido docosahexaenoico a partir del ALA (Adaptado de Martínez *et al.*, 2002).

#### 2.3.4.3. Metabolismo del ácido linoléico conjugado

El ácido linoléico conjugado presente en la leche y carne de los rumiantes procede de los fuentes; una de ellas, es en la biohidrogenación ruminal (figura 4 y 5).

Sin embargo, esta síntesis ruminal es reducida y no explica, por si mismo, la cantidad de CLA presente en la leche y carne de los rumiantes (Khanal y Dhiman, 2004).

La segunda fuente de síntesis del ácido linoleico conjugado tiene lugar en los tejidos del animal (síntesis endógena); glándula mamaria, tejido adiposo o células hepáticas.

En la siguiente figura se presentan las principales rutas de formación del ácido ruménico (isómero de CLA de mayor importancia) en el rumen y en los tejidos.

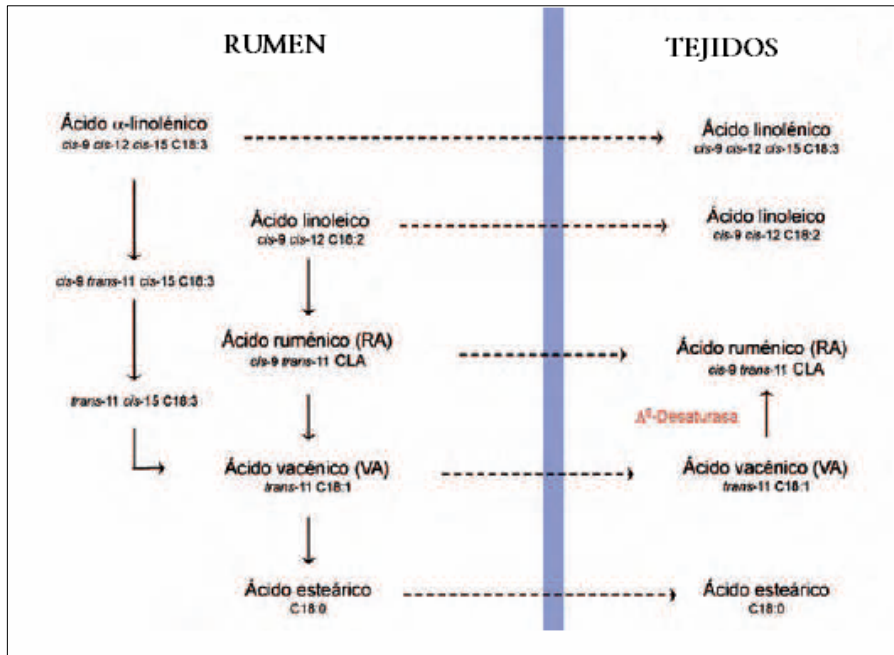


Figura 7. Principales rutas de formación del ácido ruménico en el rumen y en la glándula mamaria de los rumiantes a partir del ácido linoleico y linolénico (Adaptado de Toral *et al*, 2009).

La síntesis endógena de ácido ruménico se da por medio de la enzima Estearoil-CoA Desaturasa o  $\Delta^9$ -Desaturasa partiendo del ácido vacénico o ácido esteárico.

El proceso de desaturación de los ácidos grasos en una complejo multienzimático que incluye al NADPH-citocromo b<sub>5</sub> reductasa, citocromo b<sub>5</sub>, Acyl-Coa Sintetasa y  $\Delta^9$ -desaturasa (figura 8).

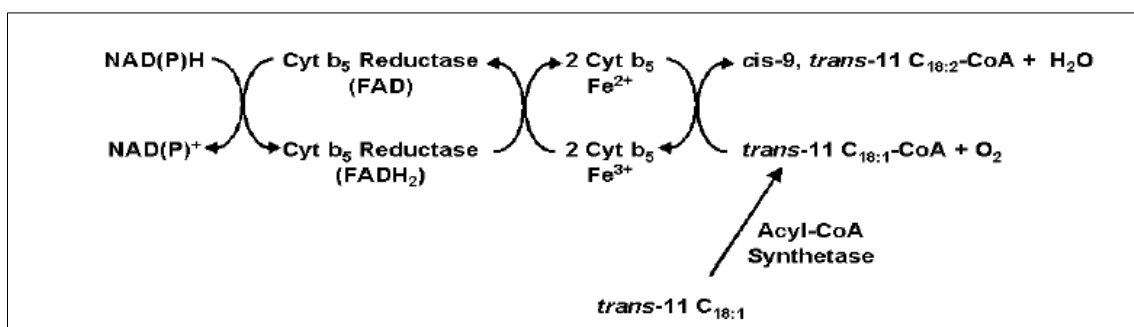


Figura 8. Rutas bioquímicas del proceso de desaturación que interviene en la síntesis endógena de 9c11tCLA (Barman *et al*, 1999).

#### 2.3.4.4. Biosíntesis de los ácidos grasos

La biosíntesis de los ácidos grasos *de novo* tiene lugar en el citoplasma celular, en los adipocitos y hepatocitos, y se efectúa a partir del acetyl-CoA.

La mayoría de los ácidos grasos sintetizados tienen dos destinos: su incorporación en triacilglicéridos para el almacenamiento de energía metabólica o la incorporación en los fosfolípidos componentes de la membrana.

Los triacilglicéridos son el producto de la esterificación entre el glicerol 3 fosfato y ácidos grasos. El glicerol 3 fosfato es sintetizado a partir de la glucosa por medio de la enzima Glicerol 3 Fosfato Deshidrogenada (G3PDH).

La síntesis de malonil-CoA a partir de acetyl-CoA, es el primer paso en la síntesis de ácidos grasos (es una reacción irreversible) catalizada por la enzima Acetyl-CoA Carboxilasa, ACC (Baber *et al*, 2005).

El malonil-CoA es el sustrato sobre el que actúa la Sintasa de ácidos grasos (FAS) que a través de siete reacciones de condensación cataliza la síntesis de ácido palmítico (Smith *et al*, 2003) y otros ácidos grasos de cadena larga (Leonard *et al*, 2000).

La enzima FAS demanda una fuente de carbono, que en el caso de los rumiantes es fundamentalmente el acetato, una fuente de hidrógeno, aportado en forma de NADPH+H (su origen puede estar en diversas vías metabólicas en las que principalmente intervienen la enzima málica (MD) y la Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa. En el caso de los rumiantes, la energía empleada en la síntesis de los ácidos grasos se obtiene mediante la vía de las pentosas catalizada por la enzima NAD-Isocitrato Deshidrogenada (ICDH) (Soret *et al*. 1998).

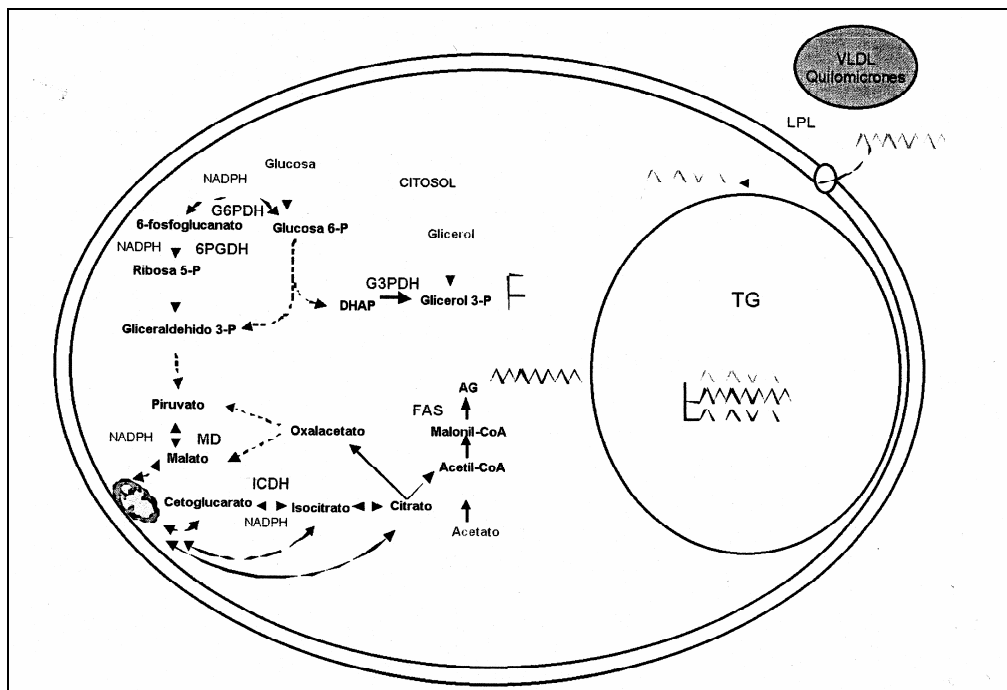


Figura 9. Principales vías metabólicas implicadas en la lipogénesis del tejido graso de los rumiantes (Soret *et al*, 2008)

### 2.3.5. Efecto de la dieta en la composición en los ácidos grasos de la carne y grasa

La alimentación de los animales es uno de los aspectos que más influye en la composición de los ácidos grasos de la carne, teniendo en cuenta este hecho, en los últimos años se ha comenzado a utilizar y estudiar diferentes estrategias alimentarias para obtener un cambio favorable en el perfil de ácidos grasos de la carne de rumiantes, ya que, debido a la biohidrogenación ruminal, el tejido graso de los rumiantes contiene una mayor proporción de ácidos grasos saturados (Arana *et al*, 2005).

En respuesta a la creciente demanda de productos funcionales en las estrategias nutricionales se estudia la posibilidad de incluir nuevos productos como plantas silvestres, aceites de pescado o algas, en las dietas del ganado. Todo ello con el objetivo principal de modificar la composición de la fracción lipídica de la carne y el perfil de ácidos grasos, con especial atención en el enriquecimiento de ácidos grasos poliinsaturados omega-3, ácido linoléico conjugado y antioxidantes (Gago L. *et al*, 2007).

Uno de los productos utilizados y estudiados para la alimentación de rumiantes es el lino. La linaza o lino es una buena fuente de grasa vegetal omega-3, además, la semilla de



lino de color café es rica en proteína y fibra dietética. Este tipo de lino contiene un 41% de grasa, 20% de proteína, 28% de fibra dietética total, 7,7% de humedad y 3,4% de ceniza (Linaza-Un Producto Premier de Salud y Nutrición).

El ácido alfa linolénico constituye el 57% de los ácidos grasos totales y el ácido linoléico un 16%.



Figura 10. Planta de lino.



Figura 11. Semilla de lino.

El lino contiene glucósidos cianógenos, grupo de sustancias naturales que se encuentran en ciertas plantas que libera cianuro, cuando es degradado por las enzimas o ácidos orgánicos. Sin embargo el consumo de cantidades moderadas no representa riesgo alguno para la salud.

En numerosos estudios se ha demostrado que, en los animales rumiantes, las variaciones en la alimentación si puede influir en el contenido lipídico y micronutrientes y, sobre todo, en el perfil de ácidos grasos (Scollan *et al*, 2006).

French *et al*, (2000) observaron que el aumento de la proporción de hierba en la dieta es importante en la modificación de los ácidos grasos en la carne de vacuno. Cuando los animales se alimentan en base a hierba los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI o PUFA) 18:2 $\omega$ -6 disminuyen, sin embargo, los AGPI 18:2 $\omega$ -3 muestran un aumento significativo. Como resultado de la variación de estos AGPI en el ratio  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 se observa una disminución significativa. También encontraron que existe una reducción significativa en la proporción de ácidos grasos saturados, 16:0 y 18:0, lo que contribuye a un aumento del ratio AGPI/AGS.

La principal fuente complementaria de ácidos grasos en rumiantes son los aceites vegetales y oleaginosas, aceite de pescado y algas marinas (Givens *et al*, 2000).

Scollan *et al*, (2001) observaron que la linaza o aceite de linaza (rica en 18:3 $\omega$ -3 o ácido alfa linolénico) y aceite de pescado pueden incrementar la concentración de 18:3 $\omega$ -3 (mayor incremento en el caso de la linaza) en el del músculo *longissimus dorsi* del ganado vacuno asociado a una disminución deseable del ratio  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 (disminución más significativa en el caso del aceite de pescado). El ratio AGPI/AGS en general no presentó un incremento por encima de 0,1-0,15 (Scollan *et al*, 2001).

Sin embargo, García *et al*, (2003) y Noci *et al*, (2005), comprobaron que la utilización de semillas de girasol (rico en  $\omega$ -6) o aceite de girasol incrementa la concentración de 18:2 $\omega$ -6, pero aumenta el ratio de ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega 6 y ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega 3, lo que desde el punto de vista de la salud no es favorable.

Como se observa no todas las dietas suministradas a los rumiantes a base de aceites provenientes de plantas afectan de igual forma a la composición de ácidos grasos. El aceite de palma no produce ningún efecto significativo sobre la composición de ácidos grasos en el depósito intramuscular y subcutáneo, sin embargo, el aceite de girasol, además de incrementar el 18:2n-6, disminuye la cantidad de C16:0 y aumenta la concentración de C18:2 tras-10, cis-12 (en el tejido subcutáneo de corderos) (Manso *et al*, 2009).

Bas *et al*, (2007), estudiaron el efecto de la inclusión de semillas de lino en la dieta (0%, 3%, 6% y 9%) en la composición de ácidos grasos del músculo y tejido adiposo de corderos. Observaron que el ácido vaccénico (C18:1t11), el ácido linoléico, los CLA y los ácidos grasos de la serie  $\omega$ -6 no varían de forma significativa con el aumento del porcentaje de lino en la dieta. En cambio, el ácido alfa linolénico y los ácidos grasos de la serie  $\omega$ -3 si presentan un aumento significativo ( $P < 0,001$ ) al incrementar la cantidad de lino en la dieta. Debido al aumento de los ácidos grasos de la serie  $\omega$ -3 el ratio  $\omega$ -6/ $\omega$ -3 disminuye de forma significativa.

Los resultados de la composición de ácidos grasos obtenidos por estos autores y la composición de ácidos grasos de los corderos del presente trabajo son parecidos, en ambos casos, aumenta de forma significativa el contenido en ácido linolénico y disminuye el ratio  $\omega$ -6/ $\omega$ -3.

## 2.4. Enzimas implicadas en la síntesis y acumulación de los ácidos grasos

### 2.4.1. Acetil-Coa Carboxilasa (ACC)

La ACC es una de las enzimas más importantes de síntesis de ácidos grasos *de novo*, ya que, esta enzima biotin-dependiente cataliza la carboxilación irreversible de la acetil-CoA para producir malonil-CoA, proporcionando así un sustrato indispensable para la biosíntesis de ácidos grasos.

En los mamíferos, existen dos isoenzimas de la ACC; ACC1 y ACC2, difieren entre ellas en el tejido en el que se expresan y la función. La ACC1 se expresa en todas las células pero su síntesis es inducida en los tejidos lipogénicos (tejido adiposo, hígado y glándula mamaria), sin embargo, la ACC2 se limita a tejidos adaptados a la  $\beta$  oxidación de los ácidos grasos, como son el músculo esquelético, el hígado y el corazón. La diferente distribución de ambas isoenzimas indica que mientras que la ACC1 regula la síntesis de ácidos grasos *de novo*, la ACC2 regula la oxidación de los ácidos grasos (Travers M. T. y Barber M. C., 2001)

En el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la dieta en la expresión génica de la ACC implicada en la síntesis de ácidos grasos y aunque se nombra como ACC se refiere a la isoenzima ACC1.

La lipogénesis se regula en el paso de Acetil-CoA Carboxilasa por modificadores alostéricos, modificación covalente e inducción y represión de la síntesis enzimática. El citrato activa la enzima, en cambio, la acil-CoA de cadena larga inhibe su actividad. A corto plazo, la insulina activa la Acetil-CoA carboxilasa por desfosforilación y a largo plazo por inducción de síntesis. El glucagón y la adrenalina tienen acciones opuestas a la insulina.

### 2.4.2. Lipoprotein Lipasa (LPL)

La lipoprotein lipasa es un enzima anclado en el endotelio que desempeña un papel fundamental en el metabolismo lipídico a través de la hidrólisis de los triglicéridos transportados por los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL)

(Goldberg *et al*, 1996). Durante este proceso de hidrólisis se liberan ácidos grasos que son absorbidos por los tejidos periféricos, siendo oxidados y empleados como fuente de energía (por ejemplo en el músculo), o bien reesterificados en forma de triglicéridos y almacenados, tal como sucede en el tejido adiposo. En este sentido, la LPL actúa como un mediador importante en el mantenimiento de la homeostasis energética y la acumulación de la grasa en el tejido adiposo (Zechner *et al*, 2000). La LPL se expresa principalmente en el tejido adiposo y muscular (esquelético y cardíaco).

La LPL también es la enzima encargada de la captación desde la sangre de los ácidos grasos que provienen de la alimentación.

La enzima es sintetizada en el interior de las células de los tejidos (por ejemplo, en los adipocitos) y es exportada a los capilares, donde se une a las células endoteliales. Allí se une (por enlaces no covalentes) a cadenas de glucosaminoglucanos cargadas muy negativamente, como el heparán sulfato.

La actividad lipoproteína lipasa del tejido adiposo es activada por la insulina, en un tiempo relativamente corto (unas horas). En el músculo es ligeramente inhibida por la insulina, pero su actividad aumenta con el ejercicio.

En la figura siguiente se esquematiza la conexión entre el hígado y el tejido adiposo del metabolismo lipídico, como se puede observar en la biosíntesis de ácidos grasos forman parte la enzima ACC y LPL.

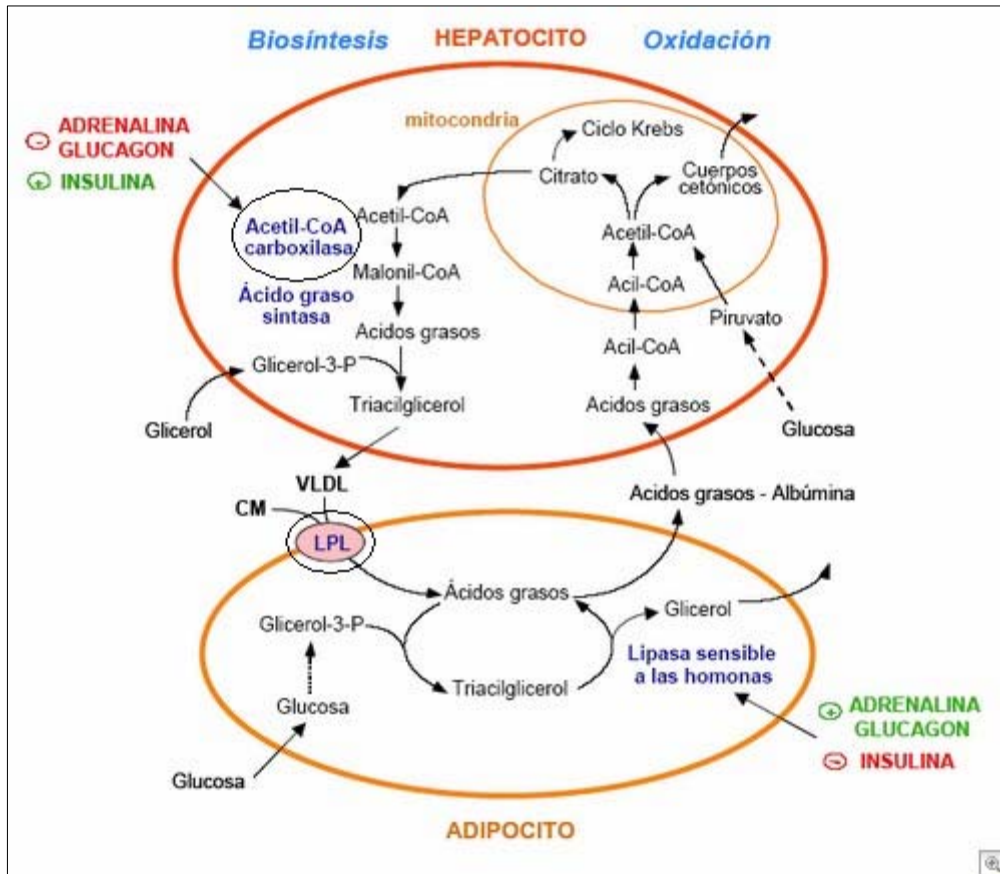


Figura 12. Esquema conjunto del metabolismo lipídico en el hígado y el tejido adiposo. Abreviaturas: CM (quilomicrones); VLDL (lipoproteínas de muy bajadensidad); LPL (lipoproteínalipasa). (Adaptado de Voet et al., 2007).

### 2.4.3. Esteroil-CoA Desaturasa (SCoAD o SCD)

La Esteroil-CoA Desaturasa es la enzima del retículo endoplasmático que cataliza la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados de forma endógena.

Se encarga de la conversión de *trans*11-vaccénico y ácido esteárico a *cis*9, *trans*11-CLA en el tejido adiposo de los rumiantes, introduce dobles enlaces  $\Delta 9$  en estos ácidos grasos y en general, ácidos grasos C16 y C18.

En dietas de condiciones normales, el gen SCD1 que codifica a la enzima SCoAD está altamente expresada en el tejido adiposo blanco, el tejido adiposo marrón, las glándulas de Meibomio, de Harder y la glándula del prepucio en condiciones normales de alimentación (Dobrzyń *et al*, 2006).

Aunque dependiendo de la especie varía el número de isómeros de la enzima Esteroil-CoA Desaturasa, en general, existen dos isómeros; SCD1, como ya se ha dicho tiene mayor expresión en el tejido adiposo blanco, tejido adiposo marrón, glándula de Meibomio, de Harder y del prepucio, mientras que el isómero SCD2 se expresa en el

cerebro y es inducida durante el desarrollo neonatal de mielinización periférica (Ntambi *et al*, 2004).

La expresión de la enzima SCD1 es inducida en el hígado y corazón por el colesterol, vitamina A y PPAR $\gamma$ . En cambio, los AGPI, hormona tiroidea, glucagón, triazolidinediones y la leptina provocan la represión de esta enzima.

## **2.5. Efecto de la modificación de los ácidos grasos mediante estrategias alimentarias en la expresión génica de las enzimas implicadas en la síntesis y acumulación de dichos ácidos grasos.**

Diversos estudios han comprobado que mediante la modificación de la dieta se puede modificar la composición de ácidos grasos de rumiantes, sin embargo, no son tantos los estudios realizados sobre el efecto de la modificación de la dieta en la expresión génica de enzimas implicadas en la síntesis y acumulación de los ácidos grasos.

Bonnet *et al*, (2000) estudiaron el efecto de la dieta; grupo control (78% heno y 22% grano de cebada), grupo subalimentación (66% heno y 34% paja) y grupo sobrealimentación (45% heno y 55% concentrado que contiene maíz, pulpa de remolacha azucarera, harina de soja, melaza, harina de pescado y vitaminas-minerales), en la expresión del gen LPL.

La actividad de la LPL fue significativamente modulado por el estado nutricional de las ovejas, la subalimentación (respecto al grupo control) supone una disminución -59%,  $P < 0,01$ ) de la actividad de la enzima en el tejido adiposo, en cambio, la sobrealimentación produce aumento significativo (+248%,  $P < 0,01$ ) en su actividad.

Los autores sugieren que el aumento de la expresión de la LPL puede ser debida al incremento o decremento de la insulina en los dos tratamientos, ya que, la insulina activa a la enzima.

Estos resultados coinciden con los de otros autores que dicen que en los rumiantes la actividad de la LPL disminuye su actividad por la subalimentación y la aumenta por sobrealimentación (Bonnet *et al*, 1998, Chilliard *et al*, 1979, DiMarco *et al*, 1981 y Tume *et al*. 1983).

Sandeep et al. (2010) han estudiado el efecto de la dieta en la expresión de genes asociados con la síntesis y metabolismo de los ácidos grasos en ganado bovino. En la experiencia estudiaron el efecto diferentes tipos de alimentación: P: sólo pasto, PO: pasto y aceite de maíz (rica en ácido linoléico), C: concentrado (maíz y soja) y PC: pasto y grano de maíz, en la expresión de las enzimas ACC, LPL y SCoAD.

Encontraron que la expresión de la ACC disminuía en los animales alimentados con concentrados o maíz grano o aceite en combinación con pasto respecto a los animales alimentados solamente con pasto.

También observaron diferencias en la expresión de la SCoAD; en animales alimentados con concentrado y pasto-grano o aceite de maíz la expresión del gen aumenta frente a los alimentados solamente con pasto. En el caso del tratamiento con pasto y aceite de maíz, la expresión tiende a incrementar aunque las diferencias no sean estadísticamente significativas ( $P=0,068$ ).

No encontraron diferencias en la expresión de la LPL en los animales alimentados con los diferentes tratamientos.

Estos autores llegaron a la conclusión de que la inclusión de maíz altera significativamente la expresión de los genes directamente implicados con la síntesis de ácidos grasos.

Duckett *et al*, (2009) realizaron una experiencia utilizando los mismos grupos de tratamiento que los anteriores autores. Observaron que la expresión de SCoAD era mayor (46 veces mayor) en los animales alimentados con concentrado respecto a los alimentados con pasto. Ocurre lo mismo en el caso de los animales alimentados con pasto-grano de maíz (18 veces mayor) y pasto-aceite de maíz (7 veces mayor) respecto a los alimentados solamente con pasto. El resultado obtenido por estos autores utilizando los mismos tratamientos para la alimentación de los animales coincide resultado al que llevaron Sandeep *et al*, (2010).

Bas *et al*. (2007), estudiaron el efecto de la inclusión de semillas de lino en la dieta (0%, 3%, 6% y 9%) en la composición de ácidos grasos del músculo y tejido adiposo de corderos. En este caso observaron que la actividad de la enzima  $\Delta 9$ -Desaturasa aumentaba

en una pequeña proporción en animales alimentados con un suplemento de lino del 3% respecto al control (0% de lino), en cambio, la actividad sufrió una disminución en los corderos de los grupos lino 6% y 9%.

Existen otros estudios relacionados con el efecto de la modificación de ácidos grasos, como puede ser el CLA, en la expresión génica de las enzimas implicadas en la síntesis de los ácidos grasos.

En este sentido, Wynn *et al*, (2006), estudiaron el efecto de la alimentación con CLA (protegido de la biohidrogenación) sobre la expresión de la ACC y SCoAD. En los diferentes tratamientos que diferían en la cantidad de ácidos grasos no se encontraron diferencias en la expresión de ambos genes. Estos autores sugirieron que el ratio SCoAD/ACC podría indicar las tasas relativas de desaturación y lipogénesis, aunque esto no se ha observado en los resultados.



# OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

## 2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Los objetivos del presente trabajo fin de carrera son los siguientes:

- La puesta a punto de la técnica necesaria para medir la expresión génica de las enzimas Acetil-CoA Desaturasa (ACC), Lipoprotein Lipasa (LPL) y Esteroil-CoA Desaturasa (SCoAD).
- Estudiar el efecto de la inclusión de lino (al 5% y 10%) en la dieta de corderos de raza Navarra durante su cebo afecta a la expresión génica de las enzimas ACC, LPL y SCoAD, implicadas en la síntesis y acumulación de ácidos grasos, en el depósito subcutáneo de ovino.

# MATERIAL Y MÉTODOS

## 4.1.1. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Material animal

Los animales utilizados en este trabajo fueron 36 corderos de raza Navarra, criados en la finca experimental “El Serrón” ubicada en Valtierra (Navarra) propiedad del Instituto Técnico de Gestión Ganadero de Navarra.

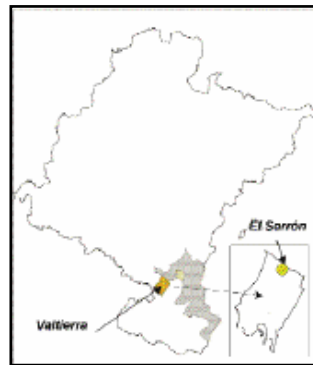





Figura 13. Finca experimental “El Serrón”, Valtierra (Navarra Agraria, 2006).

Los animales se seleccionaron al nacimiento, siendo todos ellos machos para minimizar el efecto de diversas variables. El peso medio de los animales al nacer fue de 4,5 Kg.

La Ganancia Media Diaria de los corderos fue de  $0,187 \pm 0,022$  Kg./día durante el tiempo que duró la lactación (57 días de media), por lo que, después del destete ya habían alcanzado un peso medio de 15,2 Kg. En este momento los animales se dividieron en tres lotes y durante una semana recibieron una alimentación basada en un pienso comercial y paja *ad libitum*. Transcurrido este tiempo, se reorganizaron los lotes definitivos con los siguientes pesos medios: el lote control (L0, sin aporte de lino) 17,64 Kg., el lote 5% (L5, con un 5% de aporte de lino) 17,65 Kg. y por último, el lote 10 % (L10, 10% lino) 17,49 Kg.

Las dietas correspondientes a cada lote fueron las siguientes:

-  Lote control: pienso comercial compuesto por cebada, soja 44, carbonato cálcico, bicarbonato sódico, sal, micromix corderos (complejo vitamínico mineral), Tastex + 638 (aromatizante y saborizante), así como agua y paja *ad libitum*.
-  Lote 5%: recibieron el mismo pienso comercial que el primer lote y un suplemento de 5% de semilla de lino extrusionada.
-  Lote 10%: pienso comercial y un suplemento de 10% de semilla de lino extrusionada.

El cebo de los corderos duró el tiempo necesario para que los corderos alcanzaran un peso vivo de 26 Kg.

En las tablas número 4 se ilustra la composición en materia prima de los piensos utilizados, la composición química, así como la composición analítica del producto utilizado para el aporte extra de semilla de lino.

Tabla 4. Composición en materias primas (%) y composición de los piensos utilizados  
(Adaptado del Trabajo Fin de Carrera (TFC) de Solaun I., 2010).

Materia prima	Lote Control	Lote 5 %	Lote 10 %
Cebada	81,17	75,87	70,51
Soja 44	15,23	13,05	10,88
Valomega 160* <sup>1</sup>	-	7,48	15,01
Carbonato cálcico	1,76	1,76	1,76
Bicarbonato sódico	1,00	1,00	1,00
Sal	0,50	0,50	0,50
Micromix corderos* <sup>2</sup>	0,3	0,3	0,3
Cenizas	5,52	5,94	6,02
E.M. (Mcal/Kg.)	2,70	2,75	2,82
Proteína bruta (%)	14,56	14,35	14,48
Fibra bruta (%)	4,64	4,83	5,08
Materia grasa (%)	2,11	4,50	6,32

\*1mezcla extrusionada de granos de lino (70% y segundas de trigo (30%).5,70% de ácido linolénico y 4,70% de ácido linoleico.

\*2complejo vitamínico mineral compuesto por vitaminas A, D3, E, B1, B2 y B6; Mn, I, Co, Zn, Fe, Se, Mo, S, Mg y antioxidante.

En la tabla 5 se ilustra los resultados de los parámetros de crecimiento y cebo, se observa que la diferente composición de los piensos utilizados no tuvo un efecto sobre el crecimiento de los corderos, ya que, los tres lotes crecieron a un mismo ritmo y presentaron un mismo índice de conversión del alimento. En las características de la canal de los tres lotes tampoco se observaron diferencias.

Tabla 5. Parámetros de crecimiento y cebo de los corderos (Adaptado del Trabajo Fin de Carrera de Orduna J., 2008).

	Lote Control	Lote 5 %	Lote 10 %	Signif.
GMD lactación (g/d)	186	187	186	ns*
GMD cebo (g/d)	317	315	319	ns
PV sacrificio (kg)	26,6	26,3	26,5	ns
IC cebo (kg/kg)	3,2	3,2	3,1	ns

\*ns: no significativo.

Los corderos alimentados con lino no acumularon más grasa en sus depósitos y, por tanto, los parámetros relacionados con el desarrollo y metabolismo del tejido graso, es decir, el diámetro y número de adipocitos y actividad de las enzimas lipogénicas Glicerol-3-Fosfato-Deshidrogenasa, FAS, Isocitrato Deshidrogenasa y Glucosa6P-Deshidrogenasa, no presentaron diferencias para los tres grupos de corderos.

Sin embargo, si hubo diferencias en la composición de los ácidos grasos del tejido subcutáneo (tabla 6 como consecuencia de la inclusión de lino en la dieta. Se produjo un incremento de la cantidad de ácido linolénico (ALA, C18:3n3c9c12c15), del ácido vaccénico, C18:1t11, y del C18:2ω6t9t12. También se observó una disminución de los ácidos grasos de la familia ω-6, entre ellos, del ácido linoleico (LA, C18:2n6c9c12). Como consecuencia de aumento del ácido graso ALA (ω-3) y disminución del ácido graso LA (ω-6), el índice ω6/ω3 mostró una disminución significativa. No se observaron diferencias entre lotes en el contenido en CLA.

Tabla 6. Efecto de la dieta en la composición en ácidos grasos de la grasa subcutánea (%) en corderos de Raza Navarra (media y error estándar) (Adaptado de TFC de Solaun I., 2010).

Ácido graso	Control		Lino 5%		Lino 10%		Signif.*
	Media	ESM	Media	ESM	Media	ESM	
C18:0 (ác. esteárico)	13,31	0,46a	14,63	0,37b	14,63	0,26b	*
C18:1t11 (ác. vaccénico)	9,30	0,77a	11,23	0,66ab	13,71	1,13b	**
C18:2n6c9c12 (LA)	4,36	0,21a	3,00	0,19b	2,61	0,18b	***
C18:3n3c9,c12,c15 (ALA)	0,64	0,10a	1,10	0,09b	1,18	0,07b	***
9c11tCLA	0,10	0,01	0,11	0,01	0,13	0,02	ns
AGS	51,04	0,74a	53,36	0,58b	51,95	0,61ab	*
AGM	40,61	0,59	39,62	0,43	40,85	0,51	ns
AGP	5,83	0,26a	4,96	0,28b	4,97	0,19b	*
AGP/AGS	0,14	0,01a	0,13	0,01ab	0,12	0,00b	*
n6	4,94	0,22a	3,63	0,20b	3,48	0,16b	***
n3	0,89	0,11a	1,33	0,09b	1,49	0,07b	***
n6/n3	6,29	0,34a	2,81	0,08b	2,48	0,22b	***
CLA	0,29	0,02	0,26	0,02	0,31	0,02	ns

\*ns : no significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001

Con el presente trabajo, se pretende estudiar si la variación de ácidos grasos anteriormente citados como la significativa disminución del ratio  $\omega 6/\omega 3$  ha tenido influencia sobre las enzimas encargadas de la síntesis y acumulación de ácidos grasos.

#### 4.1.1. Sacrificio y toma de muestras.

El sacrificio de los animales tuvo lugar en el matadero comercial “La Protectora”, situado en Pamplona, los días 8, 15 y 22 de mayo de 2008.

Una vez sacrificados y eviscerados los corderos, se procedió a la toma de muestras de los diferentes depósitos grasos; subcutáneo (SC; base de la cola), pélvicorrenal (PR) e intramuscular (IM; a la altura de la décima costilla, del músculo *Longissimus Dorsi*).



Figuras 14, 15 y 16. Toma de muestras del depósito pelviorrenal, subcutáneo e intramuscular (TFC Diaz J., 2010).

En el momento de realizar el muestreo el personal deberá estar equipado con ropa adecuada; mono blanco, botas de goma y guantes de látex, para prevenir las posibles contaminaciones. Además, todo el material que vaya estar en contacto con las muestras (tijeras, pinzas, bisturís, etc.) habrá sido previamente esterilizado, para mantener las condiciones asépticas necesarias para la toma de muestras.

Para el estudio de la expresión génica de las enzimas lipogénicas, objeto de este trabajo, se obtuvieron 5 g de muestra aproximadamente y se congelaron en nitrógeno líquido a una temperatura de  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2. Metodología para el análisis de la expresión génica de las enzimas lipogénicas ACC, LPL y SCoAD.**

La PCR a tiempo real es, en la actualidad, la técnica más sensible para detección y cuantificación del ARNm. Su sencillez práctica, además de su combinación de velocidad, sensibilidad y especificidad, la han convertido en una de las técnicas más importantes para la cuantificación de ácidos nucleicos (Stephen *et al*, 2009).

La cuantificación de cDNA se realiza en términos relativos, ésta se basa en la comparación entre el nivel de expresión del gen a estudiar y un gen control, también llamado *housekeeping gene*.

El gen control, permite normalizar los valores de las muestras y evitar posibles errores debidos a: diferencias entre la calidad de ARN de los distintos tubos, a la eficiencia de Retrotranscriptasa Reversa, errores de pipeteo, etc.



En este trabajo el gen control utilizado ha sido la  $\beta$  actina, debido a que su expresión no varía con diferentes tratamientos, de forma que se puede utilizar como referencia. Además este hecho ya se ha comprobado en estudios realizados anteriormente.

Dentro de la qPCR hay varias técnicas, en este caso, se ha utilizado la basada en fluorocromos inespecíficos, que detectan la generación exponencial de ADN empleando un fluorocromo que se une a este. Exactamente se ha empleado el fluorocromo SYBR Green, que excitado mediante luz azul ( $\lambda_{\text{max}}= 488 \text{ nm}$ ) emite luz verde ( $\lambda_{\text{max}}=522 \text{ nm}$ ).

La cantidad de luz emitida por las moléculas es proporcional a la cantidad de ADN, a mayor cantidad de luz emitida mayor será la cantidad de ADN amplificado.

La utilización de SYBR Green tiene la ventaja de ser barato, fácil de utilizar y sensible. Sin embargo, su mayor inconveniente es su inespecificidad, debido a que no discrimina entre los productos específicos de la reacción y otros productos reacción como la contaminación o la formación de productos cortos de amplificación de los cebadores.

Para determinar los niveles de expresión de cada uno de los marcadores implicados en la síntesis de ácidos grasos insaturados, se ha utilizado el “*Metodo comparativo de Ct's*”.

El Ct es el número de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de fluorescencia significativo con respecto a la señal de base, podemos observarlo en la siguiente figura.

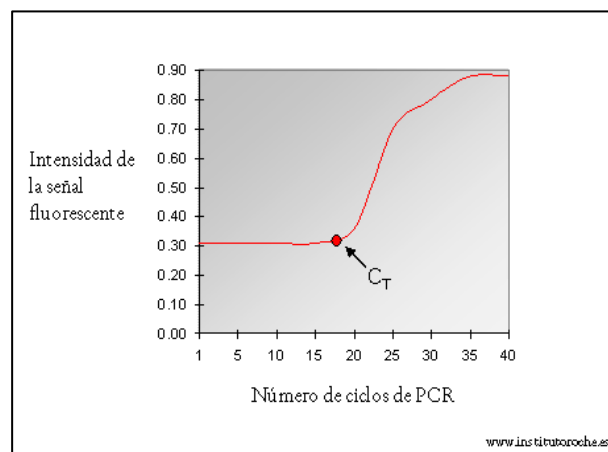


Figura 17. Gráfico de amplificación para determinar el Ct.

El *método comparativo de Ct's* se basa en la comparación de los Ct's de las muestras en estudio con los valores de los Ct's del gen control.

Este método es también llamado el "*Método de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$* ", en primer lugar, se calcula el valor del  $\Delta Ct$  es la diferencia entre el valor de Ct del gen problema y el valor de Ct de gen control o housekeeping ( $\Delta Ct = Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia}$ ).

Posteriormente se calcula el  $\Delta\Delta Ct$ , para ello, hay que tener en cuenta el valor de Ct del calibrador, valor que se utiliza para comparar la diferencia entre el Ct problema y Ct referencia frente a la diferencia del Ct calibrador y Ct referencia.

El calibrador puede ser un momento concreto (horas, días, etc.) o un tratamiento concreto, en este caso, se toma como referencia el grupo denominado control.

Por lo tanto, el  $-\Delta\Delta Ct$  se calcula de la siguiente forma:

$$-\Delta \Delta Ct = -(\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ calibrador}) = Q$$

Siendo,

$$\Delta Ct \text{ muestra} = Ct \text{ gen probl.} - Ct \text{ gen ref.}$$

$$\Delta Ct \text{ calibrador} = Ct \text{ gen calibr.} - Ct \text{ gen ref}$$

Finalmente, se eleva 2 a  $-\Delta\Delta Ct$ :

$$2^{-\Delta \Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ calibrador})}$$

Representando en un gráfico los distintos valores de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , podemos observar el efecto de los diferentes tratamientos en el nivel de expresión de los distintos marcadores.

A la hora de realizar la PCR a tiempo real existen dos alternativas en cuanto a las muestras de cDNA a utilizar.

Por un lado, se puede ejecutar la técnica partiendo de muestras individuales, en este caso 36 muestras de corderos para cada gen estudiado.

Por otro lado, la segunda alternativa sería realizar muestras colectivas o "pooles", es decir, una mezcla de muestras de cDNA provenientes de diferentes animales con la característica de haber recibido todos ellos el mismo tratamiento. En este caso es una mezcla

de la misma cantidad de 12 muestras de cDNA de los corderos que componen cada grupo o lote.

La utilización de muestras individuales tiene el inconveniente de la dificultad en el manejo de un número elevado de muestras y también el coste más elevado que supone frente a la utilización de muestras colectivas. Además, la utilización de muestras colectivas permite realizar un mayor número de repeticiones de cada “pool” de cDNA, ocho repeticiones de cada mezcla de cDNA frente a las tres repeticiones de las muestras individuales de cDNA.

Para que la elección sea la más apropiada se realiza una qPCR con 12 muestras individuales para el gen Acetil-CoA Carboxilasa y el lote lino 5 %, ambos seleccionados al azar, y otra PCR a tiempo real con muestras colectivas (mezcla con la misma cantidad de las 12 muestras que componen el lote).

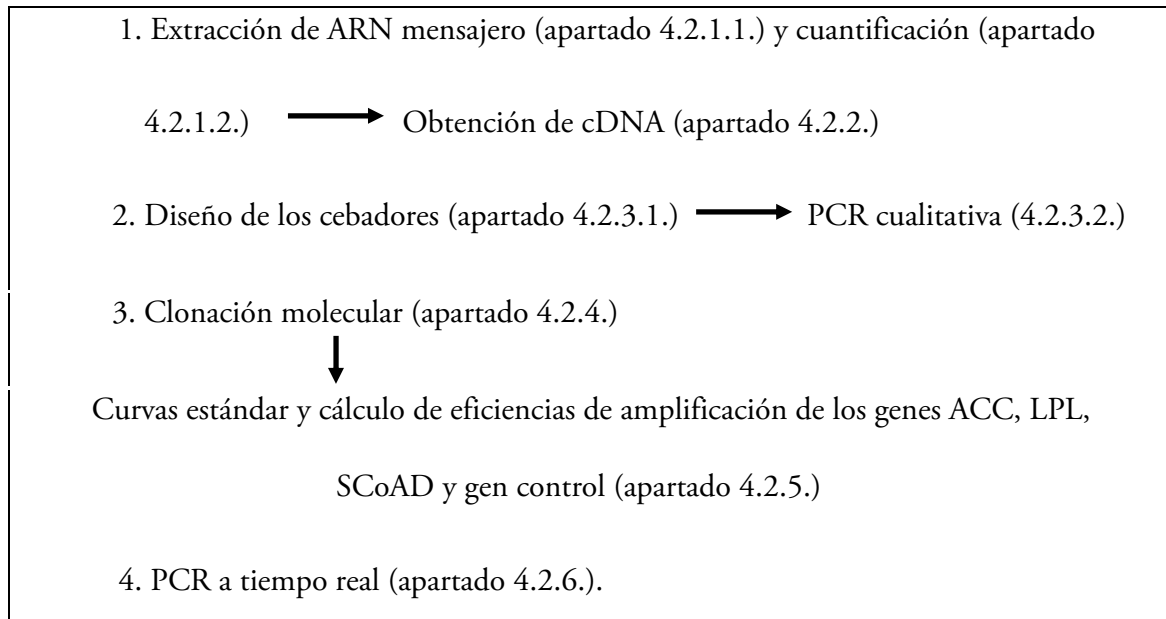
La elección de la alternativa más conveniente se realizará teniendo en cuenta el error estándar del resultado de la qPCR, los valores de Ct.

Como ya se ha citado para el cálculo de la expresión de las enzimas ACC, LPL y SCoAD (apartado 4.2.6.) es necesario comparar la expresión de estos genes (genes problema) con la expresión de un gen control. Para comparar la expresión del gen problema con el gen control, es necesario calcular la curva estándar y la eficiencia de amplificación de estos (apartado 4.2.5.), ya que, si la eficiencia de amplificación del gen problema y el gen control no es igual no se puede realizar la cuantificación de la expresión.

Además, antes de realizar las curvas estándar, es necesario realizar la clonación de los genes problema y control (apartado 4.2.4.) para posteriormente conocer el número de moléculas mediante la cuantificación del producto de la clonación.

Para llevar a cabo la clonación previamente se realiza la PCR cualitativa (apartado 4.2.3.2.), para ello, se debe realizar un diseño de cebadores (apartado 4.2.3.1.), extracción de ARN mensajero (apartado 4.2.1.1.) y obtención de cDNA a partir del ARNm (apartado 4.2.2.).

A continuación se presenta un esquema de la metodología a seguir para el análisis de la expresión génica de las enzimas ACC, LPL y SCoAD:



#### 4.2.1. Obtención de ARNm a partir de tejido subcutáneo.

##### 4.2.1.1. Extracción de ARNm de tejido subcutáneo.

La extracción de mRNA de tejido se realizó utilizando un kit de extracción comercial, RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen).

El proceso de extracción consta de cuatro fases diferenciadas, la homogeneización, la extracción de mRNA, la purificación y elución (Sambrook *et al*, 1989).

A la hora de trabajar con RNA, es necesario tomar las máximas precauciones para evitar la contaminación con RNAsas y la degradación del RNA. Para conseguir un ambiente libre de RNAsas se tratará todo el material, previamente esterilizado, con RNase ZAP (Sigma), agente que elimina las RNAsas.



Figura 18. Material esterilizado y tratado con RNase ZAP.

También se usarán guantes durante todo el proceso y para evitar la degradación durante la manipulación, la extracción se realizará en encima de un bloque de poliestireno que contiene hielo.

En la fase de la homogeneización se produce la lisis celular, es decir, la rotura de la membrana plasmática de la célula debido a una serie de alteraciones físico-químicas, de tal forma que el contenido celular (RNA total, DNA, proteínas...) es liberado al medio.

Para llevar a cabo este procedimiento, se deben pesar 100 mg de tejido graso como máximo, posteriormente éste es homogenizado en un mortero (anteriormente enfriado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) con nitrógeno líquido hasta quedar en forma de polvo. Podemos ver es proceso en las siguientes figuras:



Figura 19. Troceado de la muestra con bisturí. Figura 20. Homogeneizado con nitrógeno líquido.



Figura 21. Muestra en forma de polvo.

Después, se traspasa la muestra a un eppendorf de 2 ml, se añade 1 ml de QIAzol Lysis Reagent y se deja reposar 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de las nucleoproteínas.

La segunda fase, la extracción, es la fase en la que el RNA total es separado del resto de moléculas como DNA, proteínas, lípidos, etc.

Una vez transcurridos los 5 minutos, se añaden 200 µl de cloroformo, se tapa el eppendorf fuertemente y se agita vigorosamente durante 15 segundos. Se deja reposar durante 2-3 mín. a temperatura ambiente.

A continuación, se centrifuga a 12.000 g a 4 °C durante 15 minutos. Tras la centrifugación, se obtienen tres fases: una fase superior acuosa en la que se encuentra el RNA, una fase intermedia (blanca) que contiene la grasa y por último, una fase inferior (roja) donde se encuentran las proteínas y restos celulares.

Para la purificación del RNA extraído se realizan los siguientes pasos:

1. Se transfiere con la ayuda de una pipeta la fase acuosa superior del eppendorf, 600 µl aproximadamente, a un nuevo eppendorf con cuidado si tocar la interfase, se añade un volumen de etanol al 70% y se agita en el vortex.
2. Se traspasa la muestra a una columna de 2 ml, se centrifuga durante 30 segundos a 8.000 g y posteriormente se desecha el eluido.

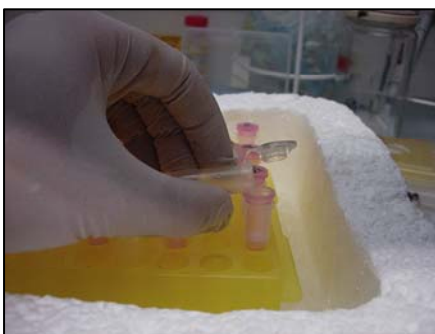


Figura 22. Trasfiriendo la muestra a una columna.



Figura 23. Desechando el eluido.

3. A la fase acuosa trasferida se le añade 700  $\mu\text{l}$  de Buffer RW1 (reactivo del kit RNeasy Lipid Tissue Mini Kit de Qiagen) y se centrifuga (8.000 g y 4°C) durante 30 segundos. Se desecha el eluido.
4. Se añaden 500  $\mu\text{l}$  de Buffer RPE a la columna, se centrifuga durante 15 segundos a 8.000 g y se desecha el eluido.
5. Se vuelve a repetir el paso anterior pero la duración de la centrifugación será de 2 minutos.
6. La muestra se pone en una columna en un nuevo tubo de 2 ml y se centrifuga a máxima velocidad durante 1 minuto. Este paso es opcional.

Finalmente se procede a la elución del RNA, para ello, se coloca la columna encima de un eppendorf de 1,5 ml y se añaden 50  $\mu\text{l}$  de agua-DEPC (agua tratada con agente que desactiva las RNAsas del medio) y se centrifuga durante 1 minuto a 8.000 g. Si no se utiliza el RNA extraído en el momento se debe congelar a -80°C.

#### 4.2.1.2. Cuantificación del ARNm total.

La determinación de la concentración de ARN se efectúa por medio de la densidad óptica (DO) en 260 nm ( $A_{260}$ ), ésta corresponde aproximadamente a 50 ng/ $\mu\text{l}$  de ARN.

Para realizar la cuantificación es necesario hacer previamente una dilución, en este caso será una dilución 1:25, es decir, 2  $\mu\text{l}$  de la muestra de ARN se diluyen en 48  $\mu\text{l}$  de agua DPEC. De esta forma, obtenemos directamente la concentración de ARN, expresada en ng/ $\mu\text{l}$ , de la muestra.

A la hora de cuantificar se debe tener en cuenta otro parámetro importante, el cociente  $A_{260}/A_{280}$ , parámetro indicativo de la pureza de la muestra. Una muestra de ARN pura presenta una relación  $A_{260}/A_{280}$  de 1,8 o superior, en cambio, los valores inferiores a 1,8 indican presencia de proteínas que absorben a 280 nm.

El valor del cociente  $A_{260}/A_{280}$  óptimo para la posterior utilización de las muestras de ARN en la PCR a tiempo real debe estar entre 1,8 y 2,0.

#### 4.2.1.3. Tratamiento con DNAsas para muestras de ARNm.

Para evitar la posible interferencia del ADN contaminante en el ARN obtenido se realiza el tratamiento con DNasa utilizando el Kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega).

Las condiciones de la reacción de digestión de DNasas, teniendo en cuenta el protocolo del Kit, son las siguientes:

*Reactivos*

ARN en agua o Buffer TE	1-8 µl
Buffer RQ1 RNase-Free DNase 10X	1 µl
RQ1 RNase-Free DNase	1 unidad/µg ARN
Volumen final con agua DPEC	10 µl

Hay que tener en cuenta que en el caso de cantidades inferiores a 1 µg/µl, la cantidad de enzima a utilizar será de una unidad.

Para que tenga lugar la reacción de digestión de DNasas, se incuban las muestras a 37 °C durante 30 minutos. Trascurrido este tiempo, se añade 1 µl de RQ1 DNase Stop Solution (esta cantidad corresponde a una cantidad de RNA entre 1-8 µl) y se incuba 10 minutos a 65 °C.

Tras el tratamiento con DNasas es necesario realizar una nueva cuantificación del ARN.

**4.2.2. Obtención de cDNA a partir de ARNm por medio de la reacción de la transcriptasa inversa.**

Para la obtención de cDNA a partir de ARNm se utiliza la enzima denominada *Transcriptasa Reversa*, que sinteriza ADN de doble cadena partiendo de ARN.

Las condiciones para la reacción seguidas en este trabajo son las siguientes (manual ImProm-II™ Reverse Transcription System de Promega):

<i>Reactivos</i>	<i>µl/reacción</i>
Oligo dT Primer (500 µg/ml)	1
dNTPs (10mM)	1



RT Buffer 5X*	4
DTT (0,1 M)	2
RNase out (40 unidades/ $\mu$ l)	1
M-MLV RT (200 unidades/ $\mu$ l)	1
H <sub>2</sub> O DPEC	-
ARN (1500 ng/ $\mu$ l)	-
	20 $\mu$ l

\*Buffer 5X: 250 mM Tris-HCl (pH 8,3 a T<sup>a</sup> ambiente); 375 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>.

A continuación, se incuban las muestras a 42 °C durante una hora, después, se inactiva la enzima en hielo durante 10 minutos y por último se cuantifica el cDNA obtenido de la misma forma que se realiza con el ARN, aunque en este caso el agua que se empleará será agua de Tipo I en lugar de agua DPEC.

#### 4.2.3. Amplificación cualitativa de marcadores a partir de cDNA.

##### 4.2.3.1. Diseño de los cebadores para la PCR.

El diseño de los cebadores o primers para la PCR tal vez sea el parámetro más crítico en la reacción, debido a que un mal diseño determina que la reacción no funcione.

Un cebador es un oligonucleótido corto que se sintetiza *in vitro*, se diseñan como secuencias complementarias de una determinada región de ADN diana que se desea detectar.

Los cebadores utilizados en esta experiencia fueron diseñados anteriormente, únicamente se ha verificado su correcto funcionamiento mediante una PCR cualitativa.

A continuación podemos ver las características de los cebadores utilizados:

Tabla 7. Características de los cebadores utilizados en presente trabajo.

Nombre del gen	Secuencia	Longitud del producto amplificado (pb)
<b>β actina</b>		
(Número de acceso: U39357)		
Iniciador hacia delante (Forward)	CTC ACG GAG CGT GGC TAC A	
Iniciador reverso (Reverse)	GCC ATC TCC TGC TCG AAG TC	107
<b>Acetil-CoA Carboxilasa (ACC)</b>		
(Número de acceso: X80045)		
Forward	ATG ACC TTA ACA GCC GCA GAG T	
Reverse	CTA TTA CAC AGC CCG GGT CAA G	82
<b>Lipoprotein Lipasa (LPL)</b>		
(Número de acceso: NM_001009394)		
Forward	TCA TCG TGG TGG ACT GGC T	
Reverse	CAT CCG CCA TCC AGT TCA TA	111
<b>Stearoyl-CoA Desaturasa (SCoAD)</b>		
(Número de acceso: NM_001009254)		
Forward	GAG TAC CGC TGG CAC ATC AA	
Reverse	CTA AGA CGG CAG CCT TGG AT	103

#### 4.2.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR cualitativa).

En el presente trabajo, la reacción en cadena de la polimerasa se ha utilizado, por un lado, para comprobar el correcto funcionamiento de los cebadores diseñados, y por otro, con el objeto de obtener el producto de PCR para la posterior clonación de los cebadores y su utilización en la PCR a tiempo real.

Las condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa utilizadas para este trabajo, son las indicadas por Arana *et al*, (2006):

<i>Reactivos</i>	<i>μl/reacción</i>
Tampón 10X	2,5
Cl <sub>2</sub> Mg (50 mM)	0,75
dNTPs (10mM)	0,5

Primer Forward (10 $\mu$ M)	0,8
Primer Reverse (10 $\mu$ M)	0,8
Tap polimerasa (5 u/ $\mu$ l)	1,25
H <sub>2</sub> O tipo I	16,4
cDNA	<u>2</u>
	<b>25 <math>\mu</math>l</b>

Todo el procedimiento de la PCR se lleva a cabo en la cabina de flujo con luz ultravioleta (permanecerá encendida durante 20 minutos antes de realizar la PCR), ya que, dicha técnica es muy sensible a la contaminación. Además, todos los reactivos y muestras permanecerán, durante el proceso, en una caja de poliestireno que contiene hielo.

Una vez apagada la luz ultravioleta, primeramente se realiza una mezcla de reactivos, teniendo en cuenta que será la enzima la última en añadir, debido a que hasta este momento deberá estar a una temperatura de -20°C.

Posteriormente, se pipetea 23  $\mu$ l de la mezcla de los reactivos y 2  $\mu$ l de cDNA (diluido a una concentración entre 40-100  $\mu$ l/ml) en los microtubos de PCR y se colocan los microtubos en el termociclador (pcr perkin elmer 2400/thermo hybaid modelo px2) con la siguiente programación:






- Desnaturalización inicial del ADN: 5 minutos a 94 °C.
- 40 ciclos de amplificación:
  - Fase de desnaturalización: 30 segundos a 94 °C.
  - Fase de anillamiento: 30 segundos a 60 °C.
  - Fase de extensión: 30 segundos a 72 °C.
- Extensión final: 10 minutos a 72 °C.

#### 4.2.3.3. Electroforesis de DNA en gel de agarosa.

La electroforesis de ADN se realiza, por un lado, para comprobar el correcto funcionamiento de la técnica de PCR, ya que, si no ha sido correctamente diseñada, se habrá producido la amplificación del fragmento de ADN en estudio y se podrá observar la banda correspondiente en el gel de agarosa. Por otro lado, se podrá cortar la banda de ADN en el gel de agarosa para su posterior clonación.

El método consiste en someter la muestra de ADN, que estará dentro de la matriz de agarosa, a una corriente eléctrica que hará que la muestra se desplace. Este movimiento está en función de la corriente aplicada, el tiempo de migración y el tamaño y carga de las cadenas de ADN. Tiñendo con Syber Safe (marcador de ácidos nucleicos) se puede visualizar el ADN en un transiluminador de luz ultravioleta.

El procedimiento para realizar la electroforesis es la siguiente (Sambrook *et al*, 1989):

-  Pesar 1 g de agarosa en un erlenmeyer y añadir 50 ml de tampón TBE 0,5X (54 g/l Tris; 27,5 g/l ácido bórico; 3,72 g/l EDTA).
-  Calentar hasta ebullición en el microondas y dejar enfriar agitando suavemente.
-  Añadir 2,5 µl de SYBR Safe (marcador de ácidos nucleicos de Invitrogen) y mezclar bien.
-  Verter sobre el molde con el peine/s previamente colocado/s, cuando haya solidificado, se sumerge el gel en buffer TBE 0,5X en una cubeta de electroforesis y se quita el peine para cargar las muestras.
-  Carga de las muestras: se pipetea 4 µl de tampón de carga (1,5 g Ficoll 400 y 0,025 g Xylene cyanol FF) en un trozo de parafilm, se mezclan 12 µl de producto de PCR y se pipetea dentro del pocillo del gel, como observamos en la figura --. También se cargan 2,5 µl de marcador de peso molecular (100 pb).

- Se conecta la fuente de alimentación a 100 V hasta que la muestra se desplace correctamente y posteriormente se realiza la fotografía del gel.

#### 4.2.4. Clonación.

La clonación molecular es la inserción de un segmento de ADN ajeno dentro de un vector que se replica en un huésped específico.

El proceso de clonación, en general, consta de varias fases. Una vez aislado el segmento de ADN, se procede a la ligación insertando el fragmento en un vector de clonación (fago). Posteriormente, se introduce la secuencia formada dentro de las células quimiocompetentes y estas se hacen crecer en un medio de cultivo adecuado. Por último, se procede a la extracción del plásmido y separación del inserto y plásmido mediante la enzima de restricción Eco RI.

Seguidamente se indica el procedimiento operativo seguido en laboratorio para llevar a cabo el proceso de la clonación mediante la utilización del kit comercial NucleoSpin Extract II:

##### Extracción de la banda

- Cortar el gel

Con la ayuda de un bisturí se corta el trozo de gel de agarosa que contiene la banda de ADN, iluminándolo con la luz UV. Se introduce el trozo de banda en un eppendorf nuevo y se determina su peso.

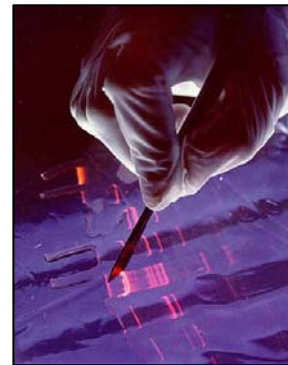


Figura 24. Corte de la banda de ADN.

- Lisis del gel

Por cada 100 mg de agarosa se añaden 200  $\mu$ l del Buffer NT (reactivo del kit), se incuba durante 5-10 minutos a 50 °C y agitando en el vortex cada 2-3 mín., con el fin de disolver el gel.

- Unión del ADN

Se hace pasar la muestra por una columna (2 ml), se centrifuga durante 1 minuto a 11.000 g y después de descartar el eluído.

- Limpieza de la membrana de sílice


Para la limpieza se añaden 600  $\mu$ l de buffer NT3 (reactivo del kit NucleoSpin Extract II) a la columna, se centrifuga a 11.000 g, 1 minuto, se descarta el eluído y se vuelve a colocar la columna en el eppendorf.

- Secado de la membrana de sílice

Se centrifuga durante 2 minutos a 11.000 g para eliminar el buffer NT3, asegurando de que la columna no entra en contacto con el eluído.

- Elución del DNA


La columna es traspasada a un nuevo eppendorf de 1,5  $\mu$ l, se añaden 30  $\mu$ l de buffer de elución NE (reactivo del kit NucleoSpin Extract II), se incuban las muestras 10 mín. y se centrifuga (11.000 g-1 mín.).

-  Ligación con el vector

La ligación del vector y el inserto se realiza mediante el Kit PGEMT easy.

Se añaden 5  $\mu$ l del buffer 2x Rapid Ligation, 0,5  $\mu$ l del vector PGEMT (50 mg/ $\mu$ l), previamente agitado con suavidad, 4  $\mu$ l del producto de PCR y finalmente, 0,5  $\mu$ l de T<sub>4</sub> DNA Ligasa (3 unidades/  $\mu$ l), que hasta este momento habrá permanecido a una temperatura de -20 °C.

Para que se de la reacción se incubaba durante 3 horas a temperatura ambiente, para luego realizar la transformación.

-  Transformación mediante tratamiento Heat-Shock

Se descongelan, siempre en hielo, 200  $\mu$ l de células quimiocompetentes, se añaden 4  $\mu$ l de la ligación, y después de mezclarlo dando golpecitos con la mano, se incubaba 20 minutos a 42 °C.

Transcurrido este tiempo, se procede al heat-shock (2 mín.-42 °C), para volverlo a incubar otros 2 minutos a 4 °C. Después, añadir 800 µl de LB (medio de cultivo) e incubar 50 minutos a 37 °C y 300 rpm.

A las placas de LB sólido con el antibiótico (ampicilina), se añaden 100 µl de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido, inductor de la β-galactosidasa), 30 µl de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido, indicador de aquellas células que expresan la enzima β-galactosidasa, codificada en el gen *lacZ* del operón lac) y 15 µl de ampicilina, todo ellos previamente atemperados, y se siembran 100 µl de la mezcla anteriormente realizada.

El volumen restante de este último, se centrifuga (2 mín.-5.000 rpm), se tira la mayor parte del sobrenadante y se resuspende el precipitado o pellet. Se vuelve a sembrar este último en otra placa, de esta manera, obtenemos una segunda placa de la muestra concentrada (para asegurar que no falle la ligación). Como control negativo, se utilizará una placa con solamente ampicilina.

Para finalizar, la siembra se incuba a 37 °C durante 24 horas.

#### Paso de las colonias a medio líquido

Tras las 24 horas de incubación, se introducen las placas en el frigorífico durante dos horas para intensificar la coloración.

A continuación, en la campana y utilizando el asa de siembra, se raspa una colonia de color blanco-transparente y se introduce en un tubo con medio LB atemperado a 37 °C, se añaden 9 µl de ampicilina a los tubos. Posteriormente, se incuba toda la noche a 37 °C y 180 rpm.

Se comprueba el crecimiento bacteriano mediante la turbidez de los tubos, si es así, se procede a realizar la extracción del plásmido. Como disponemos de más de un tubo de la misma muestra, una de ellas se guarda para realizar el procedimiento, ya descrito, una segunda vez (resiembra en placas de LB sólido), de esta forma, se obtiene un mayor número de copias del fragmento de DNA (después del crecimiento de la resiembra, se realizará el mismo proceso que se explica a continuación).

## Extracción del plásmido

La extracción del plásmido se realiza mediante el Kit plasmidPrep Mini Spin, teniendo en cuenta el protocolo del kit se realizan los siguientes pasos:

- Verter 2 ml del cultivo de bacterias crecidas en un eppendorf y centrifugar 30 segundos a 16.000 g. Repetir el paso con el resto del cultivo.
- Quitar el sobrenadante y añadir 200 µl de buffer de lisis (tipo 7, Kit plasmidPrep Mini Spin), para posteriormente resuspender el precipitado con la pipeta.
- Añadir 200 µl del buffer de lisis (tipo 8, Kit plasmidPrep Mini Spin) e invertir el eppendorf. Después, añadir 400 µl del buffer de lisis (tipo 9, Kit plasmidPrep Mini Spin) e invertir el eppendorf de nuevo.
- Se centrifugan los eppendorf (4 mín.-16.000 g) y se transfiere el sobrenadante a una columna. Centrifugar 30 segundos a 16.000 g.
- Tras quitar el eluido, se añaden 400 µl del Buffer Wash (tipo 1, Kit plasmidPrep Mini Spin), se centrifuga (1 mín.-16.000 g).
- Se transfiere la columna a un nuevo eppendorf (1,5 ml), se añaden 50 µl del buffer tipo 4 y se deja 5-10 minutos a T<sup>a</sup> ambiente.
- Finalmente, se centrifuga durante 1 minuto a 16.000 g y obtenemos el DNA purificado.

## Comprobación de la existencia del inserto en el plásmido extraído

En microtubos se hace la siguiente mezcla y después se incuba a 37 °C:



### *Reactivo*

Eco RI	1 µl
10 X Buffer	2 µl
DNA	5 µl
Agua miliQ	12 µl

Tras la incubación, se añaden 4 µl de Loading Buffer (1,5 g Ficoll 400 y 0,025 g Xylene cyanol FF, tampón de carga del gel de agarosa) para parar la reacción enzimática.

Para comprobar que la clonación de forma satisfactoria, se realiza un gel de agarosa con el producto de esta última reacción y se observa en un transiluminador de luz ultravioleta (UV).

#### **4.2.5. Curvas estándar y análisis de eficiencia.**

Una vez realizada la cuantificación, se procede a la cuantificación del producto de la clonación, para después calcular el número de moléculas mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Nº moléculas/µl} = [\text{ADN}] (\text{ng/µl}) \times 1 (\text{g})/10^9 \times 1 (\text{mol})/ \text{PM} \times \text{Nº de Avogadro}/1(\text{mol})$$

[ADN] es la concentración de ADN obtenida de la cuantificación anterior, al número de Avogadro, es el número de moléculas que hay en un mol y PM es el peso molecular el plásmido más el inserto.

Para el cálculo de este último, se multiplica el número de bases del plásmido, en este caso 3015 pb, por el peso medio de una base nitrogenada (326,95 g/mol) y se suma el producto del tamaño del inserto (lo conocemos del diseño de cebadores) y el peso medio de una base nitrogenada.

Una vez conocido el número de moléculas, se realizan diluciones seriadas 1:10, desde el número de moléculas obtenido hasta  $10^0$ . Es decir, normalmente partimos de un número de moléculas de  $10^{10}$ , para realizar la primera dilución se cogen 10 µl del producto de la clonación y 90 µl de ARNt (ARN transferente), de tal forma que obtenemos un número de moléculas  $10^9$ . Sucesivamente se realizan diluciones seriadas hasta llegar a un número de moléculas  $10^0$ .

A continuación, se realiza una PCR cuantitativa para obtener las curvas estándar de cada uno de los marcadores. Para ello, primeramente se realiza un mix de reacción que contiene 0,6 µl del cebador Forward, 0,6 µl del cebador Reverse, 8,8 µl de agua miliQ y 5 µl de SYBR Green PCR master Mix (Applied Biosystems).

Posteriormente, se pipetea 15 µl del mix en la placa (placa de 96 pocillos MicroAmp Optical 96-Well reaction plate), en la campana libre de ADN. Seguidamente se añaden 5 µl en cada pocillo de las diluciones de los plásmidos purificados, las diluciones a utilizar serán desde  $10^6$  a  $10^0$ , en este caso el pipeteo se realizará en la campana específica para ello.

Hay que tener en cuenta, que el número de pocillos a utilizar por cada marcador será 24, ya que, se realizan triplicados de cada dilución, para evitar los errores de pipeteo y hay 7 diluciones. La octava fila se utilizará para el blanco.

Tras la preparación de la placa se procede a introducirla en el termociclador (ABI PRISM 7900 HT, Applied Biosystems) para que tenga lugar la reacción de amplificación.

Las condiciones de amplificación serán las siguientes:

- Etapa inicial: 2 minutos a 50 °C y 10 minutos a 95 °C.
- 40 ciclos de amplificación: 15 segundos a 95 °C y 1 minuto 60 °C.
- Etapa de disociación: 15 minutos a 95 °C, 15 mín. a 60 °C y 15 mín a 95 °C.

Terminada la amplificación, se comprueba que no se hayan producido amplificaciones indeseadas, esto es, picos extraños en la *curva de disociación* facilitada por el programa SDS2.2.2. En la siguiente figura se ilustra como debe ser la curva de disociación correcta (rosa-azul claro) y la curva de disociación de amplificaciones indeseadas (en azul oscuro).

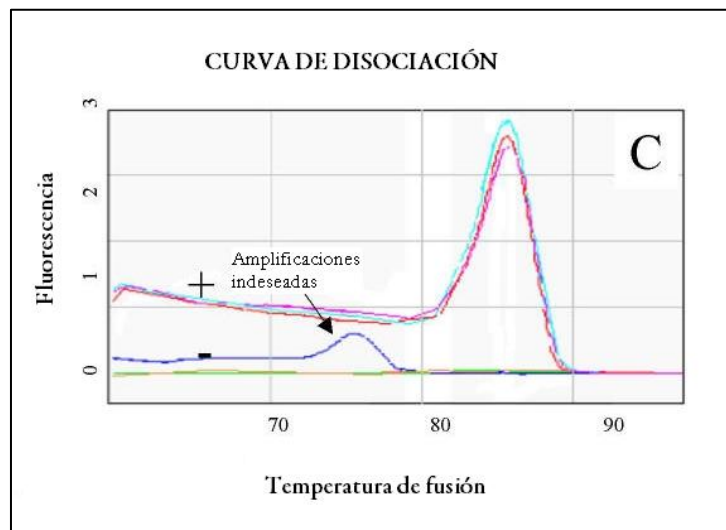


Figura 25. Curvas de disociación de diversas amplificaciones.

Mediante otro programa informático, Microsoft Office Excel, se realizan las curvas estándar de los marcadores y el gen control, representando los valores medios de los Ct's frente a las diferentes diluciones. A continuación se presenta un ejemplo de curva estándar:

Las características ideales de las curvas deben ser las siguientes: -3,34 de pendiente y un índice de correlación,  $R^2$ , mayor que 0,97.

Finalmente, se calculan las eficiencias de amplificación utilizando la fórmula que se presenta a continuación:

$$\% \text{ EFICIENCIA} = [(10^{-1/s}) - 1] \times 100 \text{ siendo, } s \text{ la pendiente de la curva estándar.}$$

#### 4.2.6. Procedimiento operativo para la amplificación de cDNA de los marcadores mediante la PCR a tiempo real.

En la práctica, la PCR a tiempo real se utilizan placas de 96 pocillos (MicroAmp Optical 96-well reaction plate, Applied Biosystems), en cada uno de los pocillos tiene lugar la reacción de amplificación. Para evitar posibles errores de pipeteo se repeticiones de los distintos marcadores, en este caso, han sido 8 repeticiones.

Primeramente, en la campana libre de DNA se realiza el mix, compuesto por:

<i>Reactivos</i>	<i>μl/reacción</i>
Cebador Forward (5 μM)	0,6
Cebador Reverse (5 μM)	0,6
Agua miliQ	8,8
SYBR Green	5

Se pipetea 15 μl del mix, en la campana libre de ADN, y posteriormente, en la campana para utilizar con ADN, 5 μl de cDNA, con una dilución 1:3, en cada uno de los pocillos.

Cada vez que se analiza un gen problema también se analiza el gen control, la β actina, para normalizar los resultados.

Para la reacción de amplificación, se programan las siguientes condiciones en el termociclador (ABI PRISM 7900 HT, Applied Biosystems): etapa inicial, 2 minutos a 50 °C y 10 minutos a 95 °C; 40 ciclos de amplificación, 15 segundos a 95 °C y 1 minuto 60 °C y la etapa de disociación, 15 minutos a 95 °C, 15 mín. a 60 °C y 15 mín a 95 °C.

#### **4.2.7. Análisis estadístico.**

Para el estudio estadístico de los valores de expresión génica de las enzimas estudiadas se utilizará el programa informático SPSS Statistics 17.0.

En primer lugar se realizará un análisis descriptivo global, donde se observaran las media, desviación estándar y error estándar, de los valores de niveles de expresión de las enzimas Acetil-CoA Desaturasa, Lipoprotein Lipasa y Stearoyl-CoA Desaturasa, en el depósito subcutáneo.

Posteriormente, se procede al análisis de varianza de un factor, test de ANOVA de un factor, cuyo modelo es el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + L_i + e_{ij}$$

Donde:

$Y_{ij}$ : parámetros medios.

$\mu$ : valores de  $\Delta C_t$ .

$L_i$ : efecto de la dieta ( $i = 1$ , lote control;  $i = 2$ , lote lino 5 %;  $i = 3$ , lote lino 10 %).

$e_{ij}$ : error residual aleatorio.

Se completará es estudio con comparaciones múltiples post hoc, mediante el procedimiento HSD de Tukey.

El nivel de significación a utilizar será del 5% ( $P < 0,05$ ).

# RESULTADOS

## 5. RESULTADOS

### 2.1. Puesta a punto de la técnica para el estudio del efecto de la dieta en el nivel de expresión génica de enzimas lipogénicas Acetil-CoA Carboxilasa, Lipoprotein Lipasa y Esteroil-CoA Desaturasa.

Uno de los objetivos del presente trabajo fin de carrera es poner a punto la técnica para llevar a cabo el estudio del efecto de la dieta en el nivel de expresión génica de tres enzimas lipogénicas implicadas en la síntesis y acumulación de ácidos grasos insaturados del depósito subcutáneo de ovino.

A continuación, se presentan los resultados de la puesta a punto de la técnica que posteriormente se ha empleado para realizar el estudio anteriormente citado.

#### 2.1.1. Extracción de ARNm y obtención de cDNA a partir de ARNm

Una vez realizada la extracción de ARN mensajero de tejido subcutáneo, se realizó la cuantificación el resultado es el siguiente:  $357,82 \pm 73,75$  ng/ $\mu$ l de ARN mensajero.

Posteriormente se realizó la reacción de la transcriptasa inversa obteniendo una concentración de cDNA de  $378,75 \pm 76,6101402$  ng/ $\mu$ l de cDNA.

#### 2.1.2. Amplificación cualitativa de marcadores a partir de cDNA y clonación.

##### 2.1.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR cualitativa)

A continuación se muestran los resultados de la PCR cualitativa, realizada para comprobar el correcto funcionamiento de la técnica con los cebadores anteriormente diseñados:

- $\beta$  actina

En la figura 26 se ilustra el producto de amplificación de la  $\beta$  Actina, obtenido tras la PCR cualitativa.

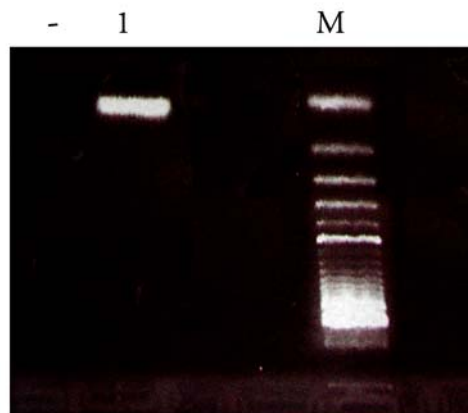


Figura 26. Amplificación del gen  $\beta$  actina. -: control negativo; línea 1: fragmento de cDNA de 107 pb; M: marcador de peso molecular (100 pb).

El producto de amplificación tras la PCR cualitativa es correcto, ya que, la banda observada coincide con el número de pares de bases de los cebadores diseñados, en este caso 107 pb.

- Acetil-CoA carboxilasa (ACC) y Lipoprotein Lipasa (LPL)

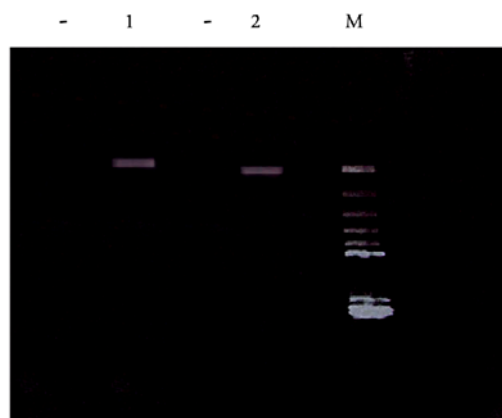


Figura 27. Amplificación del gen ACC y LPL. -: control negativo; línea 1: fragmento de cDNA de 82 pb (ACC); línea 2: fragmento de cDNA de 111 pb (LPL); M: marcador de peso molecular (100 pb).



- Estearoil-CoA Desaturasa (SCoAD)



Figura 28. Amplificación del gen SCoAD -: control negativo; línea 1: fragmento de cDNA de 103 pb; M: marcador de peso molecular (100 pb).

#### 2.1.2.2. Clonación.

La clonación es la técnica que permite amplificar una secuencia de ADN, para ello se realiza la inserción del segmento ha amplificar dentro de un vector que se replica en un huésped específico. En este caso el producto de PCR fue clonado utilizando el vector PGEMT (Promega).

Seguidamente se presentan los resultados referentes a dicha clonación.

- $\beta$  actina.

La figura 29 muestra la clonación satisfactoria de la  $\beta$  actina, que fue identificada como colonia número 1.

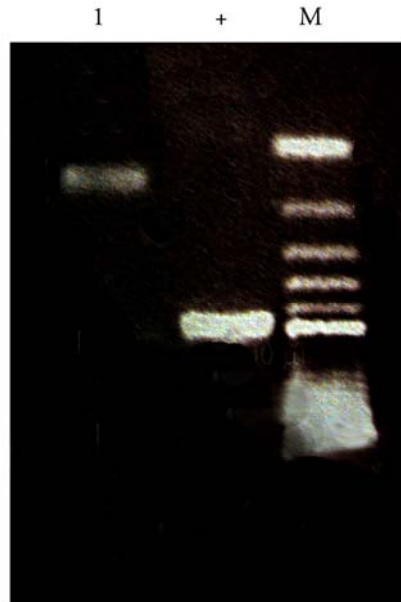


Figura 29. Amplificación del gen  $\beta$  actina. Línea 1: fragmento de cDNA de 107 pb; +: control positivo; M: marcador de peso molecular (100 pb).

- Acetil-CoA Carboxilasa y Lipoprotein Lipasa

Las figura 30 expone el resultado de la clonación del gen ACC y LPL.

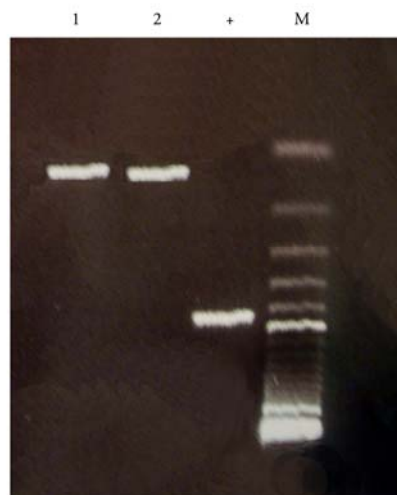


Figura 30. Amplificación del gen ACC y LPL. Línea 1: fragmento de cDNA de 82 pb (ACC); línea 2: fragmento de cDNA de 111 pb (LPL); ; +: control positivo; M: marcador de peso molecular (100 pb).

- SCoAD

Los resultados referentes a la clonación del gen SCoAD se presentan en la figura 31.



Figura 31. Amplificación del gen SCoAD. Línea 1: fragmento de cDNA de 103 pb; +: control positivo; M: marcador de peso molecular (100 pb).

### 2.1.2.3. Curvas estándar y análisis de eficiencia.

Una vez realizada la clonación, se procedió a cuantificar el producto de clonación, el resultado de dicha cuantificación se presenta en la siguiente tabla:

Tabla 8. Cuantificación del producto de la clonación.

Gen	Absorbancia	$A_{260}/A_{280}$	Concentración final cDNA (ng/ $\mu$ l)
$\beta$ ACTINA	0,26	1,97	320,73
ACC	0,21	1,56	129,55
LPL	0,22	1,80	29,17
SCoAD	0,23	1,86	287,69

Posteriormente, se calculó el número de moléculas, cuyos valores se muestran en la tabla número 9.

Tabla 9. Número de moléculas obtenidas tras la clonación.

Gen	Número de copias
$\beta$ ACTINA	$9,7 \cdot 10^{10}$
ACC	$8,59 \cdot 10^9$
LPL	$3,85 \cdot 10^{10}$
SCoAD	$8,4 \cdot 10^{10}$

Los resultados referentes a las curvas estándar de los cuatro genes se exponen en los siguientes gráficos:

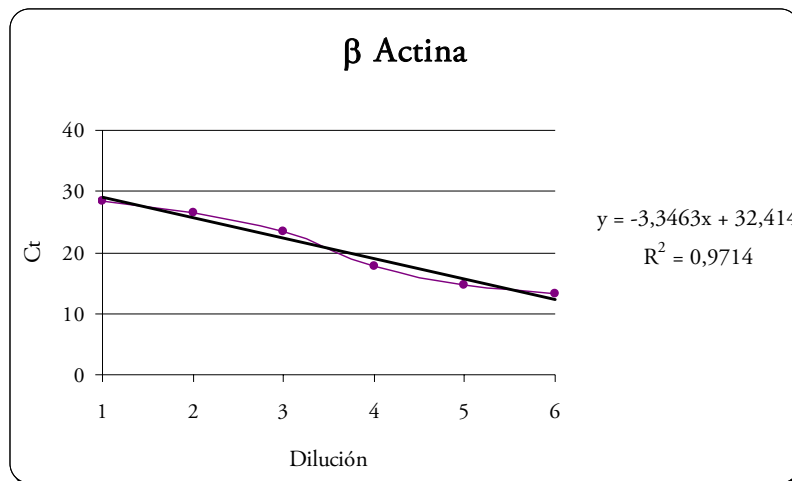


Figura 32. Curva estándar del gen  $\beta$  actina.

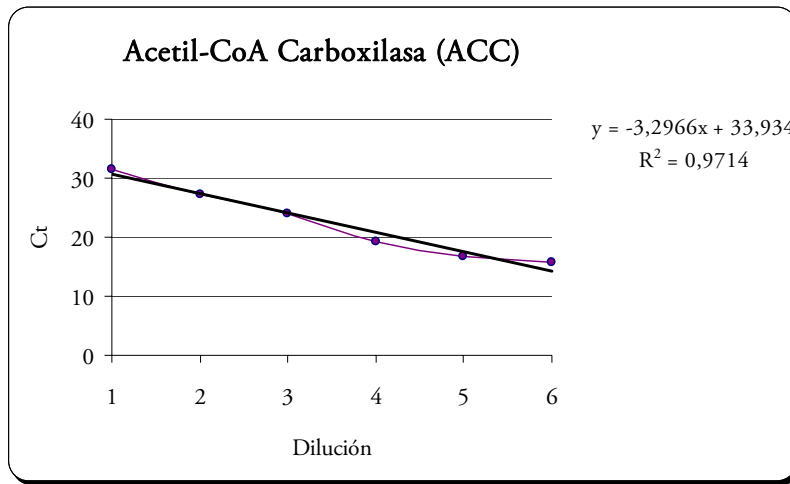


Figura 33. Curva estándar del gen Acetil-CoA Carboxilasa (ACC).

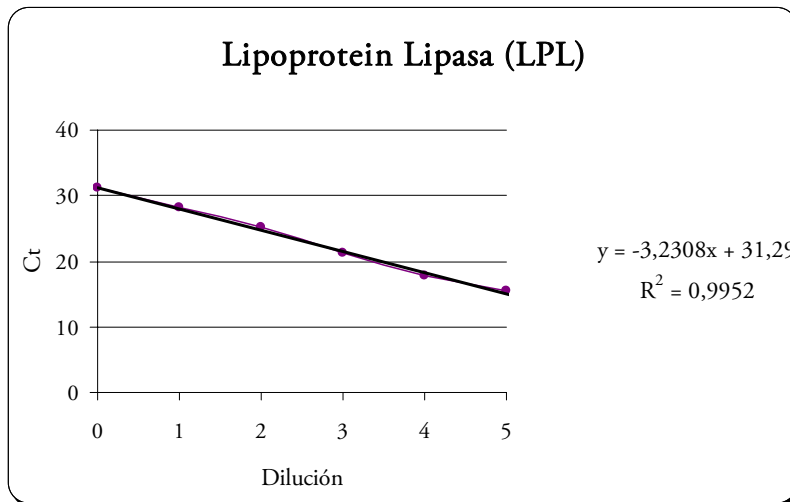


Figura 34. Curva estándar del gen Lipoprotein Lipasa (LPL).

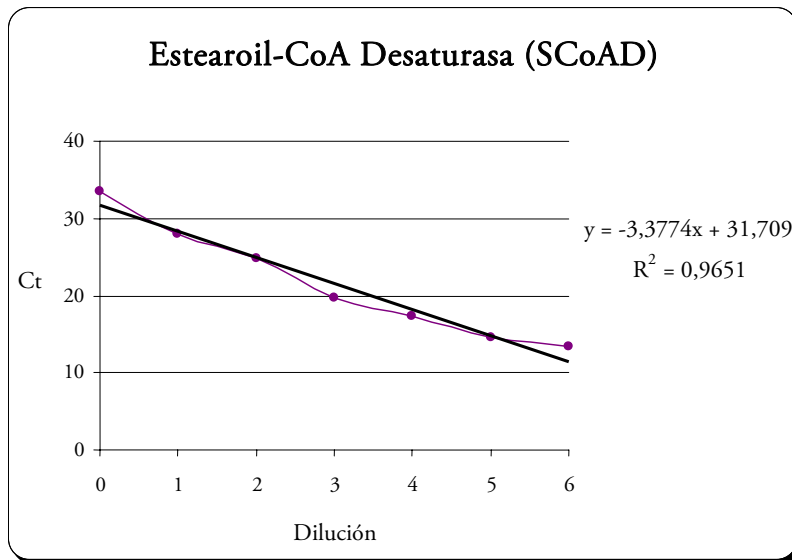


Figura 35. Curva estándar del gen Esteroil-CoA Desaturasa.

En la tabla10 se ilustra las eficiencias de amplificación de la qPCR.

Tabla 10. Eficiencias de amplificación de la PCR a tiempo real.

Gen	R <sup>2</sup>	Pendiente	Eficiencia (%)
$\beta$ ACTINA	0,97	-3,35	98,84
ACC	0,97	-3,30	100
LPL	0,99	-3,23	100
SCoAD	0,97	-3,38	97,63

En la tabla se observa que las eficiencias de amplificación del gen control y los genes problema, ACC, LPL y SCoAD, son muy parecidos, por lo que se cumple una condición

necesaria para realizar la cuantificación de la expresión génica tomando como referencia la  $\beta$  actina.

## 2.2. PCR a tiempo real con muestras individuales y con muestras colectivas o “pooles”

Las muestras colectivas o “pooles” son una mezcla de la misma cantidad de cDNA de muestras provenientes de diferentes animales con la característica de haber recibido todos ellos el mismo tratamiento. En este caso es una mezcla de 12 muestras de cDNA de los corderos que componen cada grupo o lote.

La media de los valores de Ct’s de las muestras individuales del gen ACC y lote lino 5% es 23,62 y el error estándar 0,53.

Las muestras colectivas han presentado un valor medio de  $24,19 \pm 0,25$ .

A continuación se presenta la representación gráfica de los valores de Ct de ambos tipos de muestras:

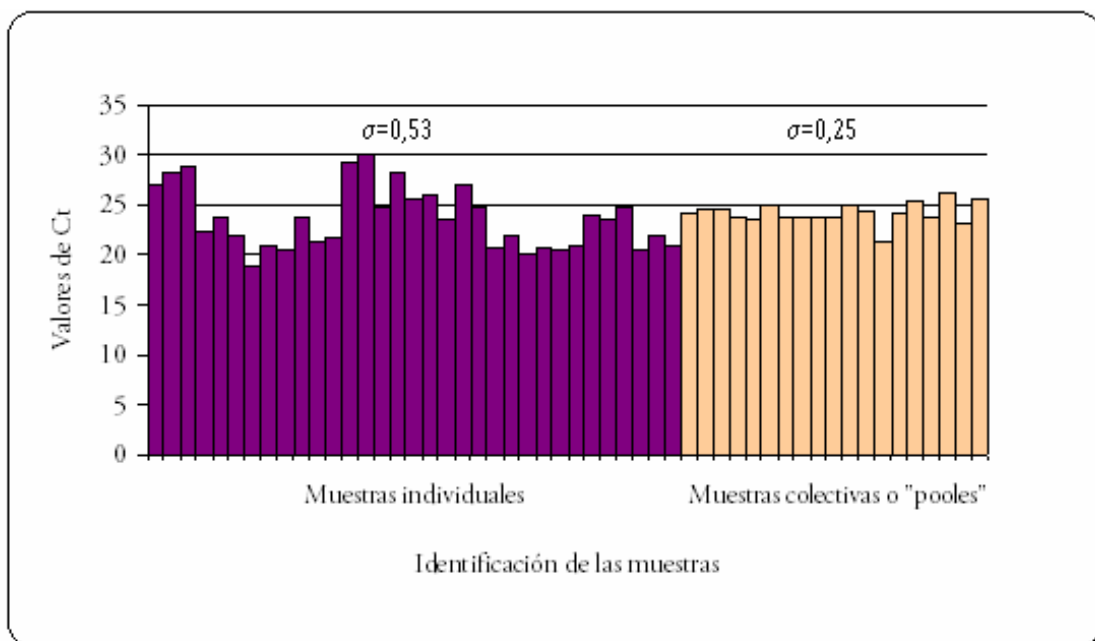


Figura 36. Representación gráfica de los valores de Ct de las muestras individuales y las muestras colectivas.

Como se observa en dicha figura, la variabilidad de los datos de Ct es mayor en la qPCR realizada con muestras individuales que la realizada con las muestras colectivas.

Asimismo, si analizamos los valores del error estándar de las muestras este valor es de 0,53 en el caso de las muestras individuales, mientras que para las muestras colectivas el error estándar presenta un valor de 0,25, aproximadamente la mitad que en la otra alternativa.

Por ello, se decidió realizar el estudio de la expresión génica de las enzimas utilizando muestras colectivas o “pooles”.

## **2.3. Efecto de la dieta en el nivel de expresión génica de enzimas lipogénicas Acetil-Coa Carboxilasa, Lipoprotein Lipasa y Estearoil-CoA Desaturasa.**

### **2.3.1. Acetil-CoA Carboxilasa**

La figura 37 ilustra gráficamente los niveles de expresión ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) de la Acetil-CoA Carboxilasa para los diferentes tratamientos estudiados. Se puede observar que el nivel de expresión es mayor en el grupo control y grupo lino 5%, sin que existan diferencias significativas entre ellas, mientras que el nivel de expresión del grupo lino 10% es significativamente menor ( $P < 0,05$ ).



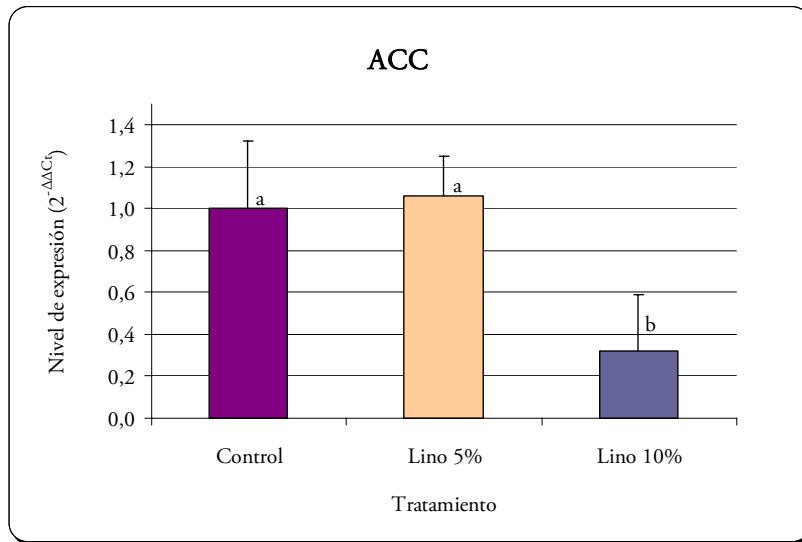


Figura 37. Representación gráfica de la expresión del gen Acetil-CoA Carboxilasa (ACC) para cada tratamiento. Los datos expresan la media de tratamiento y las barras el error estándar. *a* y *b* indican los diferentes subconjuntos homogéneos ( $P < 0,05$ ).

### 2.3.2. Lipoprotein Lipasa

La figura 38 ilustra las diferencias significativas entre los diferentes grupos que difieren en la cantidad de lino aportado en la alimentación de los corderos. Se observa que tanto con un aporte del 5% de lino como del 10% la expresión del gen LPL aumenta significativamente respecto al grupo control.

Es de destacar que con una inclusión de lino al 5% la expresión de la LPL aumenta de forma muy significativa.

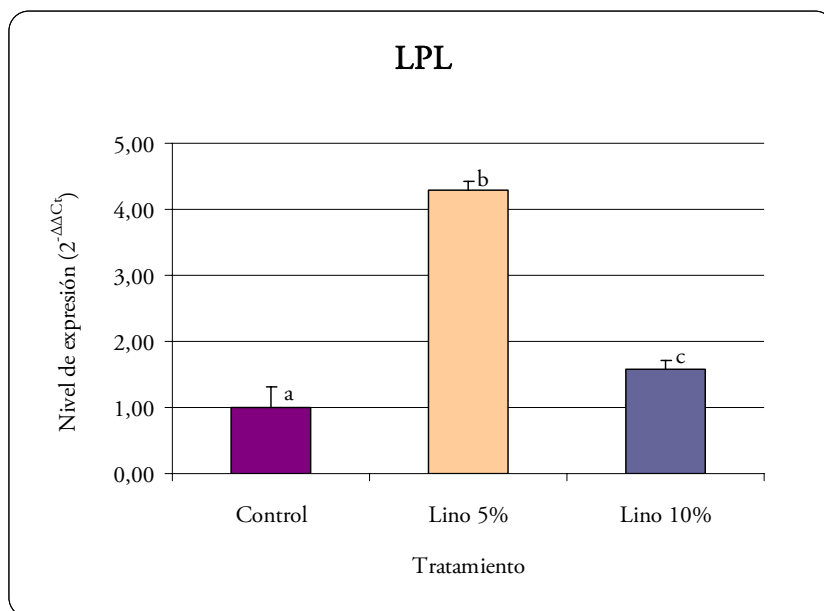


Figura 38. Representación gráfica del nivel de expresión del gen Lipoprotein Lipasa (LPL) para cada tratamiento. Los datos expresan la media de tratamiento y las barras el error estándar. *a*, *b* y *c* indican los diferentes subconjuntos homogéneos ( $P < 0,05$ ).

### 2.3.3. Esteroil-CoA Desaturasa

Los niveles de significación estadística muestran que la diferencia en el tratamiento del grupo control y grupo de 5% de lino, no conlleva un efecto en el nivel de expresión génica del gen SCoAD.

En cambio, si que existen diferencias significativas, con un nivel de significación inferior al 0,1% ( $P < 0,001$ ), en la expresión del gen Esteroil-CoA Desaturasa entre los grupos control vs. lino 10% y los grupo lino 5% vs. lino 10%.

En la figura 39 se muestra la representación gráfica de la expresión del gen SCoAD para cada uno de los lotes estudiados.

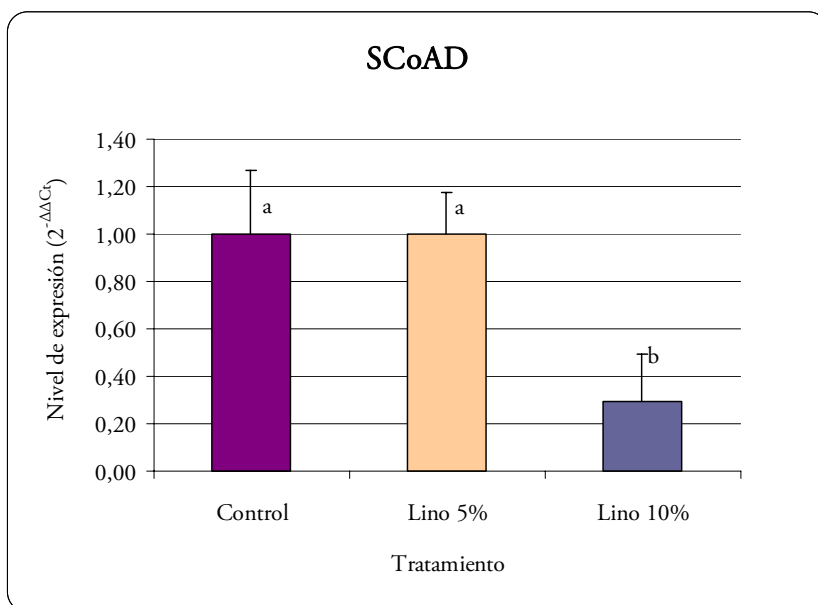


Figura 39. Representación gráfica de la expresión del gen Estearoil-CoA Desaturasa (SCoAD) para cada tratamiento. Los datos expresan la media del tratamiento y las barras el error estándar. *a* y *b* indican los diferentes subconjuntos homogéneos ( $P < 0,05$ ).

Por último se muestra la representación gráfica referente al nivel de expresión de los tres genes estudiados, Acetil-CoA Carboxilasa, Lipoprotein Lipasa y Estearoil-CoA Desaturasa, se muestra en la figura 40.

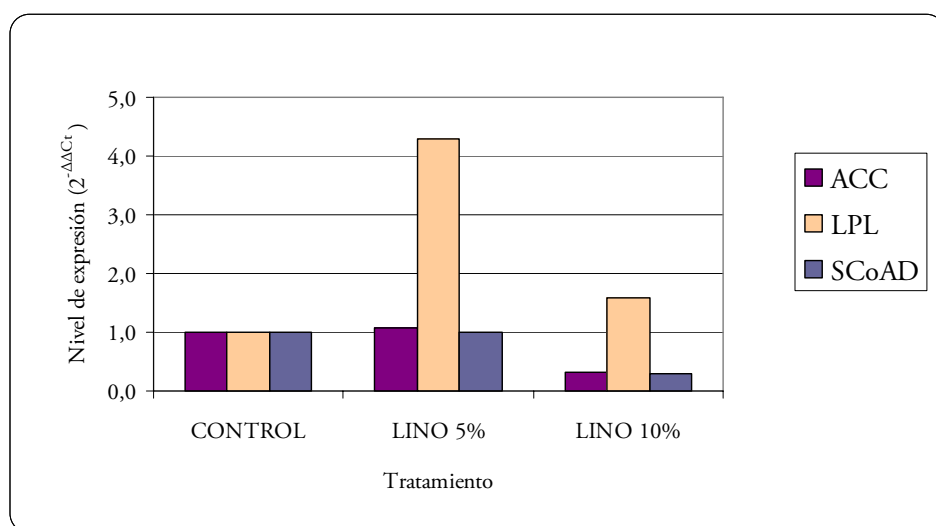


Figura 40. Nivel de expresión de los genes ACC, LPL y SCoAD para los diferentes tratamientos.

El incremento del porcentaje de lino en la alimentación de los corderos provoca una disminución en la expresión génica de la enzima ACC, enzima encargada de la síntesis de

ácidos grasos “de novo”. Esta disminución es significativa cuando el aporte de lino en la dieta es del 10%.

En la representación grafica podemos observar cómo la inclusión de lino en la dieta incrementa la expresión génica de la enzima encargada de la captación desde la sangre de los ácidos grasos, ya que, existen diferencias entre el lote alimentado con un porcentaje de lino del 5% y el lote 10% respecto al lote control, siendo esta diferencia muy significativa en el caso del grupo lino 5%.

La expresión génica de la desaturasa de ácidos grasos, SCoAD, también presenta una disminución cuando la cantidad del lino aportado supone un 10% de la alimentación de los corderos.

# DISCUSIÓN

## 6. DISCUSIÓN

### 6.1. Acetil-CoA Carboxilasa

La inclusión de lino extrusionado en la dieta de los corderos disminuye (figura 37 del apartado 5.3.1 de Resultados) la expresión génica de la enzima relacionada con la síntesis de ácidos grasos *de novo*. Esto puede ser consecuencia del aumento de los AGPI provenientes de la dieta rica en lino, como el ácido alfa linolénico, como se ha comprobado en el trabajo de Solaun, (2010), que inhiben la actividad de la enzima ACC, impidiendo la síntesis *de novo* de los ácidos grasos.

Sandeep et al. (2010) realizaron un estudio sobre el efecto de la dieta en la expresión de las enzimas Acetil-Coa Carboxilasa, Lipoprotein Lipasa y Esteroil-CoA Desaturasa, asociadas con la síntesis y metabolismo de los ácidos grasos en ganado bovino. En la experiencia estudiaron el efecto de la inclusión en la dieta de diferentes tipos de alimentos: P: sólo pasto, PO: pasto y aceite de maíz (rica en ácido linoléico), C: concentrado (maíz y soja) y PC: pasto y grano de maíz. La expresión de la ACC disminuyó en los animales alimentados con concentrado o maíz grano o aceite en combinación con pasto respecto a los animales alimentados solamente con pasto. Según Chilliard et al. (2004) la hierba verde y fresca es la principal fuente de C18:3  $\omega$ -3 (ALA), por lo tanto, esto podría explicar la menor expresión de la ACC en animales alimentados con pasto debido a su mayor contenido en AGPI.

Resultados similares observaron Hii et al. (1995), que llegaron a la conclusión de que los AGPI activan las cascadas de fosforilación en el hígado de rata, la fosforilación inactiva la enzima ACC por lo que se puede explicar así la disminución de su expresión al aumentar los AGPI en la dieta.

Geetha et al. (2000) también estudiaron el efecto de la inclusión en la dieta de ácidos grasos poliinsaturados en la expresión génica de la enzima ACC en la glándula mamaria. Los autores encontraron que el incremento en la concentración de ácido vaccénico (TVA) y ácido oleico inhiben a la enzima ACC de la glándula mamaria, provocando una disminución en la expresión génica de esta. También observaron que el ácido vaccénico provoca una mayor inhibición de la enzima que el ácido oleico cuando se utilizan en la dieta.

Sin embargo, hay autores que no han encontrado diferencias significativas en la expresión génica de la Acetil-CoA Carboxilasa al incorporar ácidos grasos a la dieta.

Bernar et al. (2005) no observaron diferencias significativas en la expresión génica de esta enzima en la glándula mamaria en cabras alimentadas con lino. Estudiaron el efecto de la inclusión del lino, un 11,2% de lino, frente al lote control que no contenía lino. Aunque la disminución de la expresión en el lote 11,2% de lino no sea estadísticamente significativa si se observa una tendencia a la baja respecto al grupo control. Las diferencias respecto a este trabajo pueden ser debidas a diferencias entre especies y tejido.

Al analizar los resultados del porcentaje de lino en la ración y la expresión de esta enzima en este trabajo y al comparar los valores el lote control con el lino 5% y 10%; 1, 1,06 y 0,32, respectivamente, (figura 37 del apartado 5.3.1 de Resultados del presente trabajo) parece que sería necesario una determinada concentración de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en el tejido para que la expresión de la enzima ACC disminuya de forma significativa.

## 6.2. Lipoprotein Lipasa

El aumento de la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados provenientes de la dieta, mediante la inclusión del lino, provoca un incremento en la absorción de los ácidos grasos, como lo demuestra la mayor cantidad de ácido alfa-linolénico acumulado en la grasa (Solaun, 2010), por lo que podría incrementar la expresión génica de la enzima encargada de la captación desde la sangre de los ácidos grasos provenientes de la dieta.

Otros autores también han estudiado de la dieta en la expresión génica de la enzima Lipoprotein Lipasa, por ejemplo, Murrieta *et al*, (2006) realizaron una experiencia en

ganado bovino estudiando el efecto de la inclusión de ácido linoléico en la dieta en la expresión del gen LPL. Según estos autores, la expresión de la LPL tiende a ser mayor ( $P=0,09$ ) en vacas alimentadas con semilla de cártamo (13,5%), rica el ácido linoléico, en comparación al control (12,5% maíz, 6,5% cártamo). Tanto en este estudio como en el presente trabajo se ha observado un aumento de la expresión de la enzima al variar la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados incorporados en la dieta, las diferencias pueden ser debidas a la especie, naturaleza del alimento y el tejido estudiado.

Sandeep et al. (2010) estudiaron el efecto de la dieta en la expresión génica de la Lipoprotein Lipasa en ganado bovino. En la experiencia estudiaron, entre otras cosas, el efecto de diferentes tipos de alimentación sobre la expresión de la enzima, un grupo de animales fue alimentado con pasto mientras el otro recibió una alimentación a base de concentrados. Observaron como la expresión de la enzima era mayor en el caso del grupo de animales alimentados con pasto ( $P<0,01$ ) en comparación a los alimentados concentrado. Este aumento podría ser debido a que el pasto contiene gran cantidad de ácidos grasos de cadena larga, al aumentar estos en la dieta de los animales la expresión de la enzima LPL aumenta, debido a que es la enzima encargada de la captación desde la sangre de ácidos grasos provenientes de la dieta. Los concentrados, ricos en almidones, producen gran cantidad de ácidos grasos volátiles en el rumen y la cantidad de ácidos grasos en la sangre será menor, por ello, podría ser que la LPL no presente un aumento en su expresión génica (Gerson *et al*, 1985).

### 6.3. Estearoil-CoA Desaturasa

La expresión génica de la desaturasa de ácidos grasos se ha visto disminuida en los corderos alimentados con lino (figura 39 del apartado 5.3.3 de Resultados), rico en ácido linoléico, seguramente como consecuencia de una mayor acumulación de este ácido graso insaturado en la grasa, es decir, se produce una inhibición de las vías internas de síntesis de ácidos grasos mono- y poliinsaturados, debido al aumento de estos mediante la dieta. La retracción de la síntesis de ácidos grasos es mayor cuanto mayor es el grado de instauración de los ácidos grasos (Chilliard et al., 2004).

Parece ser que dicha inhibición podría darse a partir de un nivel, ya que, en la figura 39 del apartado 5.3.3 de Resultados, podemos observar como se produce una disminución



mayor en el grupo con un suplemento de lino del 10%, mientras que la disminución de la expresión de la enzima SCoAD es pequeña en los corderos alimentados con un suplemento de lino del 5%.

Bernard et al. (2005) observaron un resultado parecido al obtenido en el presente estudio después de estudiar el efecto producido sobre la expresión génica de la enzima SCoAD la utilización de lino en la dieta en cabras. La expresión génica de la enzima, disminuye de forma significativa ( $P < 0,05$ ) del tratamiento control ( $20,2 \pm 3,9$ ) al tratamiento ( $9,21 \pm 0,55$ ) con un 11,2% de lino, y en menor proporción con respecto al tratamiento con 3,6% de aceite de girasol ( $11,6 \pm 1,99$ ). Se percibe que el tipo de semilla oleaginosa y la proporción de éstas en la dieta también influyen en la expresión de la enzima.

Ntambi, (1992) constató que al utilizar dietas suplementadas con varios triglicéridos que contienen ácido linoléico ( $18:2n-6$ ), araquidónico ( $20:4n-6$ ) y linolénico ( $C18:2n-3$ ), la expresión de la enzima SCoAD se reduce, mientras que triglicéridos que contienen ácidos grasos saturados (p. e.  $C18:0$  o  $C16:0$ ) y monoinsaturados ( $C16:1$  y  $C18:1$ ) no producen un efecto considerable sobre la expresión de la enzima (Ntambi J. M., 1992).

En este sentido, Chilliard et al (2000), constataron que los ácidos grasos de cadena media-corta (número de carbonos menor que 18) son los que activan la enzima  $\Delta 9$ -Desaturasa encargada de la síntesis de ácidos grasos. En cambio, los ácidos grasos de cadena larga ( $>18$  carbonos) inhiben la actividad de la enzima.

En las estrategias alimentarias a parte de utilizar como fuente de alimento ácidos grasos de la serie n-3, también se utiliza el ácido linoléico conjugado, el CLA. Existen varios estudios que examinan el efecto de CLA en las enzimas lipogénicas.

Algunos autores han observado que la alimentación con suplemento en CLA afectan tanto a la actividad como a los niveles de ARNm (Lee et al., 1998, Choi et al., 2000 y Baumgard et al., 2002), mientras que otros, exponen la disminución de la actividad de la SCoAD directamente sin afectar a la expresión de los genes (Park et al., 2000, Choi et al., 2001).

Autores como Wyyn et al. (2006) han contemplado que la inclusión CLA protegido de la biohidrogenación ruminal (AGPI) en la dieta en diferentes porcentajes; bajo (2,5%), medio (5%) y alto (10%), produce una tendencia a la baja en la expresión génica de la enzima SCoAD ( $P=0,092$ ). La dieta baja en CLA presenta un aumento en la expresión de la enzima, sin embargo, comienza a disminuir cuando se aumenta el contenido en CLA de la dieta. Este resultado coincide con el resultado obtenido en este trabajo, parece ser que es necesaria una cierta concentración de ácidos grasos poliinsaturados provenientes de la dieta para observar una disminución en la expresión de la Esteroil-CoA Desaturasa.

En este trabajo se ha observado que el ácido linoléico conjugado se forma de forma endógena a partir del ácido vaccénico (TVA) por medio de la enzima Esteroil-CoA Desaturasa. Como se observó en el trabajo Solaun, I. (2010) (tabla 6 del apartado Material y métodos del presente trabajo), en el análisis de la composición de ácidos grasos hay mayor cantidad de TVA, por lo que, siendo este el sustrato de la enzima SCoAD, tendría que haber más cantidad de CLA, sin embargo, no ocurre así. Este hecho podría ser debido a que la enzima Esteroil-CoA Desaturasa está inhibida por los PUFA provenientes de la dieta.

Como resumen de los resultados de este trabajo estos indican que el aumento en la dieta de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (ALA, EPA, etc.) para incrementar los niveles de los AGPI en la carne y grasa produce ese incrementote estos ácidos grasos. Sin embargo, disminuyen la actividad de  $\Delta$ -9 Desaturasa, por lo que disminuye la síntesis de CLA, y como consecuencia, también se produce un decremento en su acumulación.

En futuros trabajos sería necesario tener en cuenta estos resultados a la hora de diseñar las dietas para alimentar a los corderos con objeto de modificar determinados ácidos grasos de la carne y grasa de los mismos.

# CONCLUSIONES

## 7. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en este Trabajo Fin de Carrera se extraen las siguientes conclusiones:

1. La inclusión del 10% de lino extrusionado en la dieta de los corderos disminuye la expresión génica de la enzima Acetil-CoA Carboxilasa, enzima relacionada con la síntesis de ácidos grasos “de novo”.
2. El lino en la dieta de corderos de raza Navarra, tanto al 5% como al 10%, incrementa la expresión génica de la enzima encargada de la captación desde la sangre de los ácidos grasos provenientes de la dieta, la enzima Lipoprotein Lipasa.
3. La expresión génica de la desaturasa de ácidos grasos Estearil-CoA Desaturasa, ha visto disminuida su expresión génica en los corderos alimentados con lino al 10%.
4. Las dietas ricas en ácidos grasos muy poliinsaturados, como el ácido alfa linolénico, podrían inhibir las rutas endógenas de síntesis y acumulación de ácidos grasos, aspecto a tener en cuenta en futuras investigaciones.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arana A., Soret B., Mendizabal J. A. y Purroy A., (2005). Medida del tamaño y número de adipocitos y de la actividad enzimática lipogénica. Monografías INIA. Serie Ganadera 3: 381-393.
- Arana A., Soret B., Mendizabal J. A., Egozcue J. y Purroy A., (2006). Activity and gene expression of the main lipogenic enzymes in growing lambs. Book of abstracts N° 12, Antalya, Turkey, 17-20 Septiembre.
- Bauman D.E., Baumgard L.H., Corl B.A., Griinari J.M., (2000). Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. Journal of Animal Science E-Supplement, 77:1-15).
- Bonnet M., Faulconnier Y., Flechet J., Hocquette, J.F., Leroux C., Langin D., Martin P. y Chilliard Y., (1998). Messenger RNAs encoding lipoprotein lipase, fatty acid synthase and hormone-sensitive lipase in the adipose tissue of underfed ewes and cows. Reprod. Nutr. Dev., 38: 297-307.
- Barber, M. C., Clegg, R. A., Travers, M. T. & Vernon, R. G., (1997). Biochem. Biophys. Acta.1347:101-126.
- Bas P., Berthelot V., Pottier E. y Normand J., (2007). Effect of level of linseed on fatty acid composition of muscles and adipose tissues of lambs with emphasis on *trans* fatty acids. Meat Science 77: 678-688.
- Bauman D.E., Baumgard L.H., Corl B.A. y Griinari J.M., (1999). Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. Proceedings of the American Society of Animal Science: 124-133.
- Baumgard L., H., Matitashvili E., Corl B. A., Dwyer D. A. y Bauman D. E., (2002). *Trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid decreases lipogenic rates and

expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cow. *J. Dairy Sci.*, 85. 2155-2163.

- Brouwer I. A., Katan M. B., Zock P. L., (2004). Dietary alpha-linolenic acid is associated with reduced risk of fatal coronary heart disease, but increased prostate cancer risk: a meta-analysis. *Journal of Nutrition* 134 (4): 919-22.
- Chilliard Y., Sauvant D. y Morand-Fehr P., (1979). Goat mammary, adipose and milk lipoprotein lipases. *Ann. Rech. Vet.*, 10: 401-403.
- Chilliard Y., Ferlay A., Mansbridge R. M. y Doreau M., (2000). Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, trans and conjugated fatty acids. *Ann Zootech*, 49: 181-205.
- Chilliard Y. y Ferlay A., (2004). Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Redrod. Nutric. Dev.*, 44: 467-492.
- Choi Y., Kim Y. C., Han Y. B., Park Y., Pariza M. W y Ntambi J. M., (2000). The trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid downregulates stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr.*, 130: 1920-1924.
- Choi Y., Han Y. B., Park Y., Pariza M. W y Ntambi J. M., (2001). Regulation of stearoyl-CoA desaturase activity by trans-10, cis-9 isomer of conjugated linoleic acid in HepG2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 284: 689-693.
- Chow K.C. y Lobb K., (2008). *Fatty Acid Classification and Nomenclature*.
- Clegg R. A., Barber M.C., Pooley L., Ernens I., Larondelle I. y Travers M. T. Milk fat synthesis and secretion: molecular and cellular aspects. *Livestock Production Science*. Volumen 70 (1-2): 3-14.
- Connor W. E., (2000). «Importance of n-3 fatty acids in health and disease». *American Journal of Clinical Nutrition* 71: 171S-5S.

- De Antonio F. Confederación de Cooperativas Agrarias de España, CCAE, (2008). Futuro del Sector ovino.
- De Blas C. (2004). Cambios en el perfil de ácidos grasos en productos animales en relación con la alimentación animal y humana. XX Curso de Especialización FEDNA. Barcelona. p. 79-100.
- De Deckere E. A., Cancer E. J., (1999). Possible beneficial effect of fish and fish n-3 polyunsaturated fatty acids in breast and colorectal cancer. *Prev.*, 8(3): 213-21.
- De la Torre A., Gruffat D., Duran D., Micol D., Peyron A., Scislowski V. y Bauchart D. (2006). Factors influencing proportion and composition of CLA in beef. *Meat Science*, 73 (2): 258-268.
- Diane H. Morris. Linaza-Un Producto Premier de Salud y Nutrición.
- DiMarco N. M., Bietz D. C. y Whitehurst G. B., (1981). Effect of fasting on free fatty acid, glycerol and cholesterol concentrations in blood plasma and lipoprotein lipase activity in adipose tissue of cattle. *J. Anim. Sci.*, 52: 75-82.
- Dobrzyń A. y Dobrzyń P. (2006) Stearoyl-CoA desaturase--a new player in skeletal muscle metabolism regulation. *J. Physiol. Pharmacol.* 57 (Suppl 10): 31-42.
- Duckett S. K., Pratt S. L. y Pavan E., (2009). Corn oil or corn grain supplementation to steers grazing endophyte-free tall fescue. II. Effects on subcutaneous fatty acid content and lipogenic gene expression. *Journal of Animal Science*, 87: 1120-1128.
- French P., O'Riordan E.G., Monahan F.J., Caffrey P.J. y Moloney A.P., (2003). Fatty acid composition of intramuscular triacylglycerols of steers fed autumn grass and concentrates. *Livestock Production Science*, 81, 307-317.
- Gago L., García E. y Benito J., (2007). Informe de vigilancia tecnológica sobre optimización de la presencia de compuestos funcionales en carne de bovino



mediante estrategias basadas en la alimentación. Círculo de innovación en biotecnología.

- Giacomini de Z. M.I., (2007). Efecto de los ácidos grasos *trans* sobre las lipoproteínas del plasma.
- Givens D. I., Cottrill B. R., Davies M., Lee P.A., Mansbridge R. J. y Moss A.R., (2000). Sources of n-3 polyunsaturated fatty acids additional to fish oil for livestock diets – a review. *Nutritional Abstracts and Reviews*, 70, 1-32.
- Goldberg I.J., (1996). Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J. Lipid Res.* 37: 693–707.
- Greetha C. J. y Herbein J. H. (2000). Healthier dairy fat using trans-vaccenic acid. *Nutrition and Food Science*, 30: 304-309.
- Hii C. S. T., Ferrante A., Edwards Y. S., Huang Z. H., Hartfield P. J., Rathjen D. A., Poulos A. y Murray W., (1995). Activation of mitogen-activated protein kinase by arachidonic acid in rat liver epithelial WB cells by protein kinase C-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.*, 270: 4201-4204.
- Instituto Técnico de Gestión Ganadero, ITG Ganadero, (2010). Raza Navarra.
- Immig, I., Van Nevel, C. y Demeyer, D.I., (1993) *Proceedings of the Society of Nutrition Physiology*, p. 59.
- Jeongseon K., Sun-Young L., Aesun S., Mi-Kyung S., Jungsil R., Han-Sung K., Keun Seok L., Seok-Won K.-Sook S., (2009). Fatty fish and fish omega-3 fatty acid intakes decrease the breast cancer risk: a case-control study. *BNC Cancer*: 9-216.
- Khanan R.C., Dhiman T.R., (2004). Biosynthesis of conjugated linoleic acid (CLA): a review. *Pakistan Journal of Nutrition*, vol. 3, 2: 72-81.
- Kiecolt-Glaser J. K., Belury M. A., Porter K., Beversdorf D. Q., Lemeshow S. y Glaser R. (2007). Depressive Symptoms, omega-6:omega-3 Fatty Acids, and Inflammation in Older Adults. *Psychosom Med.*, 69 (3): 217-24.

- Kris-Etherton PM, Taylor DS, Yu-Poth S, Peter Huth, Kristin Moriarty, Valerie Fishell, Rebecca L Hargrove, Guixiang Zhao, and Terry D Etherton, (2000). Polyunsaturated fatty acids in the food chain in the United States. *Am J Clin Nutr.*, 71(1 Suppl): 179S-188S.
- Lauritzen I., Blondeau N., Heurteaux C., Widmann C., Romey G. y Lazdunski M., (2000). Polyunsaturated fatty acids are potent neuroprotectors. *The EMBO Journal*, 19 (8): 1784-1793.
- Lee K. N., Pariza M. W. y Ntambi J. M., (1998). Conjugated linoleic acid decreases hepatic stearoyl-CoA desaturase mRNA expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 248: 817-821.
- Lehninger A.L., (2009). *Principios de Bioquímica*. Quinta Edición. Ediciones Omega S.A. Barcelona.
- Leonard, A. E., Pereira, S. L., Sprecher, H. & Huang, Y. S., (2004). *Prog Lipid Res.* 43: 36-54.
- Lind K., Ståhlberg A., Zoric N. y Kubista M. (2006). Combining sequence-specific probes and DNA binding dyes in real-time PCR for specific nucleic acid quantification and melting curve analysis. *Biotechniques*, 40(3): 315-9.
- Loor J. J. y Herbein J. H., (2003). Reduced fatty acid synthesis and desaturation due to exogenous trans10, cis12-CLA in cows fed oleic or linoleic oil. *American Dairy Science Association*, 86: 1354-1369.
- Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, MARM, (2009). *Caracterización del sector ovino y caprino en España*.
- Manso D. B., Bodas R., Castro T., Jimeno V. y Mantecon A. R., (2009). Animal performance and fatty acid composition of lambs fed with different vegetable oils. *Meat Science*, vol 83, 3: 511-516.
- Mach N., Devant M., Díaz I., Font-Furnols M., Oliver M. A., García J. A. y Bach A., (2006). Increasing the amount of n-3 fatty acid in meat from young Holstein bulls through nutrition. *Journal of Animal Science*, 84: 3039-3048.

- Murrieta C. M., Hess B. W., Scholljegerdes E. J., Engle T. E., Hossner K. L., Moss G. E. y Rule D. C., (2006). Evaluation of milk somatic cells as a source of mRNA for study of lipogenesis in the mammary gland of lactating beef cows supplemented with dietary high-linoleate safflower seeds. *J Anim Sci* 2006. 84: 2399-2405.
- Martínez J.R., Mataix J., Muriana F. G., Mata P., Gil A., Entrala A., Aranceta J., Polledo J.F. y Fontecha J. (2002). El libro blanco de los omega 3.
- Ntambi J. M., (1992). Dietary regulation of stearoyl-Coa desaturase 1 gene expresión in Mouse liver. *J. Biol. Chem.*, 267: 10925-10930.
- Ntambi J. M., Miyazaki M. y Dobrzyn A., (2004). Regulation of Stearoyl-CoA Desaturase Expresión. *Lipids*, vol. 39, nº 11.
- Park Y., Storkson J. M., Ntambi J. M., Cook M. E., Sih C. J. y Pariza M. W., (2000). Inhibition of hepatic stearoyl-CoA desaturase activity by *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid and its derivatives. *Biochem. Biophys. Acta*, 1486: 285-292.
- Penny M. Kris-Etherton, PhD, RD; William S. Harris, PhD; Lawrence J. Appel, MD, MPH, (2002). Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. For the Nutrition Committee, *Circulation*, 106: 2747-2757.
- Relling A.E., Mattioli G.A., (2003). Fisiología digestive y metabólica de los ruminates. Cátedra de Fisiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Plata.
- Stryer, L., Berg, J. M. y Tymoczko, J. L. Bioquímica.
- Smith, S., Witkowski, A. & Joshi, A. K., (2003). *Prog Lipid Res.*, 42 289-317.
- Scollan N., Hocquette J.F., Nuernberg K., Dannenberger D., Richardson I. y Moloney A., (2006). Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat Science*, 76: 17-33.

- Scollan N. D., Choi N. J., Kurt E., Fisher A. V., Enser M., y Wood J.D., (2001). Manipulating of fatty acid composition of muscle and adipose tissue in beef cattle. *British Journal of Nutrition*, 85: 115-124.
- 🖼 Simopoulos P. A. (2008). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 233 (6): 674-88.
- Sandeep J. J., Robbins K. R., Pavan E., Pratt S. L. Duckett S. K. y Rekaya R., (2010). Effect of diet supplementation on the expression of bovine genes associated with fatty acid synthesis and metabolism. *Bioinformatics and Biology Insights*, 4: 19-31.
- Solaun F. (2010). Efecto de la dieta en la composición de ácidos grasos en muestras de corderos de raza Navarra de tipo ternasco. Trabajo Fin de Carrera.
- Toral P.G., Frutos P. y Hervás G., (2009). Leche de oveja con más CLAs. Suplementación de la dieta de ovejas con distintas fuentes lipídicas.
- Travers M. T. y Barber M. C., (2001). Acetyl-CoA Carboxylase Gene structure-function relationship. *American Society of Animal Science*, 79: 136-143.
- Tume R. K., Thornton R. F. y Johnson G. W., (1983). Lipoprotein lipase of sheep and rat tissues. *Aust. J. Biol. Sci.*, 36: 41-48.
- Wood J.D., Richardson R. I., Nute G. R., Fisher A. V., Campo M. M., Kasapidou E., Sheard P. R. y Enser M., (2004). Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Science*, 66 (1): 21-32.
- Wynn R. J., Daniel Z. C. R. T., Flux C. L., Craigon J., Salter A. M. y Buttery P. J., (2006). Effect of feeding rumen-protected conjugated acid on carcass characteristics and fatty acid composition of sheep tissues. *J. Anim. Sci.* 84(12): 3440-3450.
- Zechner R., Strauss J., Frank S., Wagner E., Hofmann W., Kratky D., Hiden M. y Levak-Frank S., (2000). The role of lipoprotein lipase in adipose tissue

development and metabolism. Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. 24 (Suppl 4): S53-S56.

- <http://ifc.org.2006-International>
- <http://themedicalbiochemistrypage.org>
- <http://www.rlc.fao.org/es/prioridades/transfron/ppc/diagn.htm>