

**Universidad Pública de Navarra**

***Nafarroako Unibertsitate Publikoa***

**ESCUELA TECNICA SUPERIOR  
DE INGENIEROS AGRONOMOS**

***NEKAZARITZAKO INGENIARIEN  
GOI MAILAKO ESKOLA TEKNIKO***

**METABOLISMO DEL TEJIDO GRASO DE TERNEROS  
ALIMENTADOS CON FUENTES RICAS EN ÁCIDOS  
GRASOS POLIINSATURADOS**

presentado por

**JUAN MONTES SEGURA**

*aurkeztua*

**INGENIERO AGRONOMO  
NEKAZARITZA INGENIARITZA**

Octubre, 2012



Inmaculada Gómez Bastida, Ingeniera Agrónoma, y José Antonio Mendizábal Aizpuru, Profesor del Área de Producción Animal de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Pública de Navarra.

INFORMAN: Que el Trabajo Fin de Carrera titulado “Metabolismo del tejido graso de terneros alimentados con fuentes ricas en ácidos grasos poliinsaturados” que presenta el alumno Juan MONTES SEGURA, ha sido realizado en el Departamento de Producción Agraria bajo nuestra dirección, cumple las condiciones exigidas y autorizamos su presentación

Y para que así conste, firmamos el presente informe en Pamplona a 29 de Octubre de 2012.

Fdo: Jose Antonio Mendizábal Aispuru

Fdo: Inmaculada Gómez Bastida

## AGRADECIMIENTOS

No puedo terminar este trabajo, y la carrera, sin agradecer el apoyo recibido a todas aquellas personas que de una u otra forma me han ayudado: enseñándome, corrigiéndome y, sobre todo, apoyándome.

A José Antonio Mendizabal, director de este trabajo, por su seguimiento, interés y amabilidad, que siempre ha encontrado tiempo para atenderme.

A Inmaculada Gómez, codirectora de este trabajo, por su inestimable tiempo y paciencia corrigiéndome borradores y por ofrecerse siempre a ayudarme.

A Isabel, Cristina y Olaia, por enseñarme, ayudarme y amenizarme las largas horas de laboratorio.

A mi familia que me ha apoyado en todos mis exámenes, trabajos y este proyecto. Especialmente a mis padres a los que debo el haber llegado hasta aquí.

A mis amigos y compañeros de la universidad, por vuestro interés y ánimo.

A los 48 terneros sin los cuales esta experiencia no hubiera sido posible.

A todos vosotros, muchas gracias.

# ÍNDICE

## ÍNDICE

Índice.....	6
Abreviaturas.....	9
Índice de tablas.....	12
Índice de figuras.....	14
Resumen.....	17
1. Introducción.....	20
2. Revisión bibliográfica.....	23
2.1. Tejido graso: Desarrollo y metabolismo.....	24
2.1.1. Desarrollo del tejido graso.....	25
2.1.1.1. Tejido adiposo pardo.....	26
2.1.1.2. Tejido adiposo blanco.....	27
2.1.2. Crecimiento del tejido adiposo.....	28
2.1.3. Metabolismo del adipocito.....	29
2.1.3.1. El glicerol.....	31
2.1.3.2. Los ácidos grasos (AG).....	33
A) Vía extracelular.....	34
B) Vía intracelular.....	35
2.1.3.3. El triglicérido.....	37
2.2. Alimentación en rumiantes: Digestión y asimilación de nutrientes.....	39
2.2.1. Los carbohidratos.....	40

2.2.2. Las proteínas.....	42
2.2.3. Los lípidos.....	43
2.3. Los ácidos grasos.....	46
2.3.1. Definición y clasificación.....	46
2.3.2. Metabolismo y efectos de los ácidos grasos.....	47
2.3.2.1. Los ácidos grasos saturados.....	48
2.3.2.2. Los ácidos grasos insaturados.....	48
A) Los ácidos grasos monoinsaturados.....	49
B) Los ácidos grasos poliinsaturados.....	50
2.4. El lino y el ácido linoleico conjugado (CLA).....	54
2.4.1. El lino.....	54
2.4.1.1. Efecto del ácido linolénico sobre la salud humana.....	53
2.4.1.2. Efecto de la utilización de lino en las dietas de cebo de bovinos.....	56
2.4.2. El ácido linoleico conjugado (CLA).....	57
2.4.2.1. Efecto del ácido linoleico conjugado la salud humana.....	59
2.4.2.2. Efecto de la utilización de CLA en las dietas de cebo de bovinos.....	60
3. Objetivos.....	62
4. Material y métodos.....	64
4.1. Material animal.....	65
4.1.1. Animales y dietas.....	65

4.1.2. Sacrificio de los terneros y toma de muestras.....	68
4.2. Medida del tamaño y número de adipocitos.....	71
3.2.1. Medida del tamaño de los adipocitos.....	71
3.2.2. Medida del número de los adipocitos.....	72
4.3. Medida de la actividad enzimática lipogénica.....	73
4.3.1. Medida del rendimiento enzimático.....	73
4.3.2. Estudio de la actividad enzimática lipogénica.....	74
4.4. Análisis estadístico.....	75
5. Resultados.....	77
5.1. Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH).....	78
5.2. Sintetasa de ácidos grasos (FAS).....	79
5.3. Isocitrato deshidrogenasa (ICDH).....	81
5.4. Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH).....	82
6. Discusión.....	84
7. Conclusiones.....	89
8. Referencias bibliografía.....	91
Anexo: Métodos de trabajo.....	97



**ABREVIATURAS**

Acrp30	Adiponectina
ACS	Sintetasa Acetil-Coenzima A
ADP	Adenosín Difosfato
AG	Ácido Graso
AGV	Ácido Graso Volátil
ATP	Adenosín Trifosfato
ATP-CL	Adenosín Trifosfato – Citrato Liasa
CL	Semillas de lino trituradas (traducido del inglés)
CLA	Ácido linoleico conjugado
CLA	Ácido Linoleico Conjugado
CoA	Coenzima A
CoASH	Coenzima A
D	Depósito
DHA	Ácido Docosaheptaenoico
DVD	Diarrea Viral Bovina
E.E.	Error medio
EL	Semillas de lino extruidas (traducido del inglés)
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
FAS	Sintetasa de ácidos grasos (traducido del inglés)
G3PDH	Glicerol 3 Fosfato Deshidrogenasa
G6PDH	Glucosa 6 Fosfato Deshidrogenasa
GH	Hormona del crecimiento (traducido del inglés)
GMD	Ganancia Media Diaria
H1	Hipótesis alternativa

HDL	Lipoproteína de alta densidad
Ho	Hipótesis nula
IBR	Rinotraqueítis Infecciosa Bovina
ICDH	Isocitrato Deshidrogenasa
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IM	Intramuscular
L	Lote
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LxD	Lino x Depósito
MF	Masa fresca
MO	Microorganismos
MS	Masa seca
NADH	Dinucleótido Adenin Dinucleótido (forma reducida)
NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido Adenin Dinucleótido (forma oxidada)
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido fosfato (forma reducida)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido fosfato (forma oxidada)
NNP	Nitrógeno No Proteico
Ns	No significación
P	P-valor
PI3	Paramyxovirus 3
REL	Retículo Endoplasmático Liso
RER	Retículo Endoplasmático Rugoso
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación
SC	Subcutáneo
TNF $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral Alfa

TPI	Triosa Fosfato Isomerasa
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
$\Omega$ -3	Omega 3
$\Omega$ -6	Omega 6
$\Omega$ -9	Omega 9

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.-</b> Composición en ácidos grasos de alimentos típicos en dietas de rumiantes.....	44
<b>Tabla 2.-</b> Composición en ácidos grasos de las semillas de lino.....	54
<b>Tabla 3.-</b> Ingredientes y composición química de las dietas experimentales.....	66
<b>Tabla 4.-</b> Parámetros productivos, clasificación de la canal y pH último de la carne.....	69
<b>Tabla 5.-</b> Características y composición de la 10ª costilla.....	70
<b>Tabla 6.-</b> Medias del diámetro de los adipocitos por depósitos y lot3.....	71
<b>Tabla 7.-</b> Número de adipocitos por gramo de tejido adiposo.....	72
<b>Tabla 8.-</b> Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito grasa (D), lote x depósito (LxD) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), para la actividad de la enzima lipogénica glicerol 3 fosfato deshidrogenasa G3PDH.....	78.
<b>Tabla 9.-</b> Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito grasa (D), lote x depósito (LxD) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), para la actividad de la enzima lipogénica sintetasa de ácidos grasos FAS.....	79
<b>Tabla 10.-</b> Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito grasa (D), lote x depósito (LxD) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), para la actividad de la enzima lipogénica Isocitrato deshidrogenasa (ICDH).....	81

**Tabla 11.-** Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito graso (D), lote x depósito (LxD) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), para la actividad de la enzima lipogénica glucosa 6 fosfato deshidrogenasa  
G6PDH..... 82

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.-</b> Tipos de adipocitos.....	24
<b>Figura 2.-</b> Esquema del proceso de diferenciación del adipocito.....	25
<b>Figura 3.-</b> Morfología de un adipocito pardo.....	26
<b>Figura 4.-</b> Morfología del adipocito blanco.....	27
<b>Figura 5.-</b> Crecimiento de adipocitos por hiperplasia.....	29
<b>Figura 6.-</b> Crecimiento de adipocitos por hipertrofia.....	29
<b>Figura 7.-</b> Esquema del proceso de lipogénesis.....	30
<b>Figura 8.-</b> Estructuras químicas del glicerol y glicerol 3 fosfato.....	31
<b>Figura 9.-</b> Esquema de las rutas de síntesis del glicerol 3-P.....	32
<b>Figura 10.-</b> Estructura de los ácidos grasos saturados e insaturados.....	34
<b>Figura 11.-</b> Esquema del proceso de síntesis del ácido graso.....	35
<b>Figura 12.-</b> Estructura del triglicérido: Una molécula glicerol unido a tres ácidos grasos saturados.....	38
<b>Figura 13.-</b> Tipos de enlaces entre glucosas.....	40

**Figura 14.-** Metabolismo bacteriano de los azúcares y sus productos de desecho..... 41

**Figura 15.-** Esquema del ciclo del nitrógeno en el rumen..... 43

**Figura 16.-** Metabolismo de los lípidos en el rumen: los distintos sustratos y sus productos finales..... 45

**Figura 17.-** Clasificación de ácidos grasos..... 46

**Figura 18.-** Estructura química de los isómeros ácido oleico (cis) y ácido eláidico (trans)..... 47

**Figura 19.-** Diagrama de ácidos grasos de las series 3, 6 y 9..... 53

**Figura 20.-** Ácido linoleico y dos isómeros CLA..... 58

**Figura 21.-** Los terneros en el CITA..... 65

**Figura 22.-** El espectrofotómetro y el programa WinASPECT..... 74

**Figura 23.-** Valores medios y desviación típica de la actividad enzimática lipogénica de la enzima G3PDH en función de los depósitos grasos, subcutáneo e intramuscular, para cada lote de dieta realizado; Control, Lino, CLA y Lino+CLA..... 79

**Figura 24.-** Valores medios y desviación típica de la actividad enzimática lipogénica de la enzima FAS en función de los depósitos grasos, subcutáneo e intramuscular, para cada lote de dieta realizado; Control, Lino, CLA y Lino+CLA..... 80

**Figura 25.-** Valores medios y desviación típica de la actividad enzimática lipogénica de la enzima ICDH en función de los depósitos grasos, subcutáneo e intramuscular, para cada lote de dieta realizado; Control, Lino, CLA y Lino+CLA..... 82

**Figura 26.-** Valores medios y desviación típica de la actividad enzimática lipogénica de la enzima G6PDH en función de los depósitos grasos, subcutáneo e intramuscular, para cada lote de dieta realizado; Control, Lino, CLA y Lino+CLA..... 83



# RESUMEN

## RESUMEN

Los malos hábitos de vida en la sociedad actual (estrés, mala alimentación, etc), han favorecido el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y obesidad entre otros. Esta información no es desconocida para el consumidor, lo que ha provocado su interés por proveerse de alimentos que presenten, no solo una calidad organoléptica adecuada, sino a su vez una composición saludable que reduzca el riesgo de sufrir estas patologías.

En respuesta a esta nueva demanda el sector agroalimentario se adapta y evoluciona para facilitar al consumidor alimentos que cumplan estas propiedades. Por ello, es cada vez más frecuente la utilización de materias primas ricas con una composición rica en ácidos grasos poliinsaturados, como son el  $\Omega$ -3 y el ácido linoleico conjugado (CLA).

El presente trabajo se incluye dentro de un proyecto más amplio cuyo objeto es estudiar el metabolismo de los lípidos y su deposición en el animal y mejorar la calidad nutricional y organoléptica de la carne de vacuno mediante la adición de la semilla de lino y el ácido linoléico conjugado en las dietas de los terneros. Particularmente en este trabajo final de carrera se ha estudiado el efecto de la utilización de lino y/o CLA en las dietas de terneros frisonos sobre la actividad de cuatro enzimas lipogénicas relacionadas con el engrasamiento, así como las diferencias existentes entre los diferentes depósitos grasos (subcutáneo e intramuscular).

Para llevar a cabo dicho proyecto se seleccionaron 48 terneros de raza frisona, con un peso medio de  $125,7 \pm 16,54$  kg y se dividieron en 4 lotes (n=12) en función de la cantidad de lino y/o CLA aportado en el pienso:

- Dieta control: Pienso control
- Dieta Lino: Pienso enriquecido con un 10% de semillas de lino
- Dieta CLA: Pienso enriquecido con un 2% de CLA
- Dieta Lino+CLA: Pienso enriquecido con un 10% de semillas de lino y 2% de CLA.

Al alcanzar los terneros los 450 kg de peso estos fueron sacrificados. Tras el faenado se procedió a la toma de las muestras (5 gr/muestra) del músculo *Longissimus dorsi* y se guardaron en congelación (-80 °C) hasta su análisis. Las cuatro enzimas fueron la Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH), la Sintetasa de ácidos grasos (FAS), la Isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y la Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH), cuantificándose su actividad mediante espectrofotometría.

Los resultados indican que la actividad enzimática no se ha visto afectada de forma significativa ( $p>0.05$ ) por la dieta (adición de lino y/o CLA), pero sí lo ha hecho debido al efecto depósito (subcutáneo e intramuscular). En definitiva, se puede afirmar que la utilización de lino (10%) y/o CLA (2%) en las dietas de terneros frisones con objeto de mejorar la calidad nutricional y organoléptica de la carne, no conlleva cambios ni en el desarrollo ni en el metabolismo del tejido graso de los terneros.

# INTRODUCCIÓN

## 1. INTRODUCCIÓN

El sector vacuno español representa, en términos de renta fija, el 15,6% de la producción final ganadera y en torno al 5,8% de la Producción Final Agraria en 2011, lo que supone un aumento del 0,14% con respecto al ejercicio anterior del 2010. Con esto se mantiene una situación de equilibrio tras siete años de caída del sector vacuno, debida tanto a razones coyunturales (el encarecimiento de los precios de las materias primas para la alimentación animal) y estructurales (falta de recursos por parte de los ganaderos para mantener y renovar instalaciones) (MAAMA, 2011).

En los últimos tiempos, la población española en general ha ido abandonando los hábitos alimentarios propios de la dieta mediterránea con el consiguiente perjuicio para su salud (OESPS, 2011). Este hecho es popularmente conocido en la sociedad y por ello el consumidor demanda, cada vez más, alimentos no sólo sensorialmente atractivos sino a su vez integrados dentro de una dieta saludable. Dentro de este creciente interés se encuentra la preocupación por el contenido y tipo de grasas presentes en los productos cárnicos, incluido el vacuno (OMS, 2004).

Debido al elevado contenido de ácidos grasos saturados presentes en la carne de vacuno, grupos de consumidores optan por rechazarla al considerarla poco beneficiosa para la salud. Una vía para reducir la relación entre los ácidos grasos saturados e insaturados en la carne es variar la alimentación del animal a fin de mejorar su perfil lipídico.

En este contexto, el presente trabajo fin de carrera titulado “Metabolismo del tejido graso de terneros alimentados con fuentes ricas en ácidos grasos poliinsaturados” se incluye en un proyecto de investigación del Área de Producción

Animal titulado “Carne de vacuno enriquecida en  $\Omega$ -3 y CLA. Metabolismo lipídico y calidad de la grasa” (RTA2009-00004-C02-02), que estudiará el posible efecto que tiene sobre la calidad de la carne de los terneros frisonos alimentados con piensos enriquecidos en ácidos grasos poliinsaturados  $\Omega$ -3 y ácidos linoléicos conjugados (CLA). En este Trabajo Final de Carrera se estudia el efecto que ejerce la inclusión, en la dieta de los terneros frisonos, de semillas de lino y/o CLA sobre la actividad enzimática lipogénica del tejido graso.

# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. TEJIDO GRASO: DESARROLLO Y METABOLISMO

El tejido graso constituye el mayor reservorio energético de los animales y desempeña diversas funciones mecánicas, endocrinas y metabólicas. Está compuesto, en mayor parte, por células adiposas capaces de almacenar la energía excedente en forma de triglicéridos y movilizarla nuevamente al organismo en periodos de carestía calórica (René *et al.*, 2010)

Dicho tejido se distribuye por el organismo de forma heterogénea en función de su especie, edad, sexo y condición específica. Se compone mayoritariamente de adipocitos maduros, así como de lipoblastos (preadipocitos), fibroblastos, células endoteliales y sanguíneas (Moreno *et al.*, 2006). A continuación se muestra en una figura las diferencias morfológicas más generales.

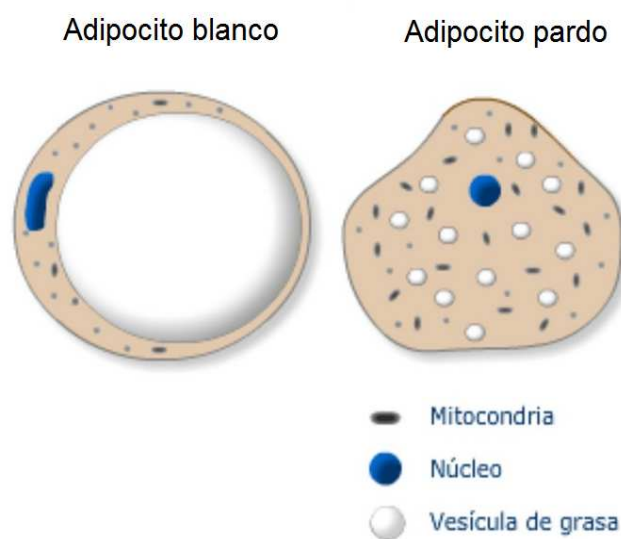


Figura 1.- Tipos de adipocitos.



Se distinguen dos grandes tipos de adipocitos en el tejido graso: Los adipocitos blancos (predomina en los animales adultos) y los adipocitos pardos (presente en animales hibernantes y neonatos). Ambos presentan diferencias en coloración, morfología, distribución, genes y función.

### 2.1.1. Desarrollo del tejido graso

El proceso de diferenciación celular que provoca la formación de adipocitos maduros es complejo. En su origen se forman a partir de una célula madre mesenquimatoso (multipotencial) que, bajo la influencia de agentes inductores (hormonas y proteínas específicas), experimenta cambios drásticos en su expresión génica, dotándose de enzimas lipogénicas y lipolíticas hasta diferenciarse, a priori en un adipoblasto (célula madre unipotente) de poca actividad, y a posteriori en un adipocito adulto plenamente funcional (Moreno *et al.*, 2006).

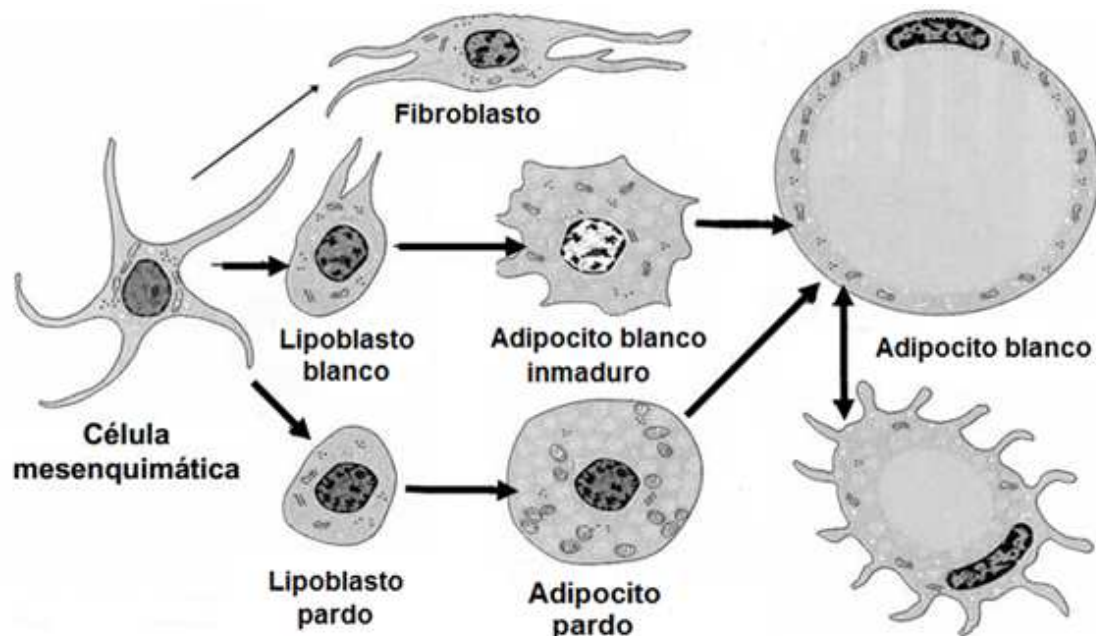


Figura 2.- Esquema del proceso de diferenciación del adipocito.

Todo el proceso de diferenciación está estrechamente ligado a los inductores específicos (insulina, glucocorticoides, GH, etc) que determinan la línea celular del preadipocito. Factores como la obesidad del sujeto o la temperatura del entorno influyen en la síntesis de estos agentes inductores, y por tanto en la proporción de adipocitos blancos y pardos del tejido adiposo. Ambos adipocitos, así como los tejidos que componen, presentan unas diferencias morfológicas y funcionales muy marcadas.

### 2.1.1.1. Tejido adiposo pardo

Su aspecto es glándular y se caracteriza por estar lobulado. Presenta poco tejido conectivo pero muy capilarizado con mucha inervación entre las células. Los adipocitos pardos que lo caracterizan son células especializadas con forma poligonal. El núcleo central es esférico con gruesos gránulos de cromatina. En el citoplasma hay poca presencia de organelas; algo de retículo endoplasmático liso y rugoso con un pequeño aparato de Golgi. Presentan gran cantidad de vacuolas lipídicas, rodeadas de numerosas mitocondrias redondas de gran tamaño con crestas juntas. El color pardo característico de estos adipocitos se debe a los numerosos citocromos internos de las mitocondrias (Gallegos *et al.*, 2007). La siguiente figura resume la morfología básica del adipocito pardo.

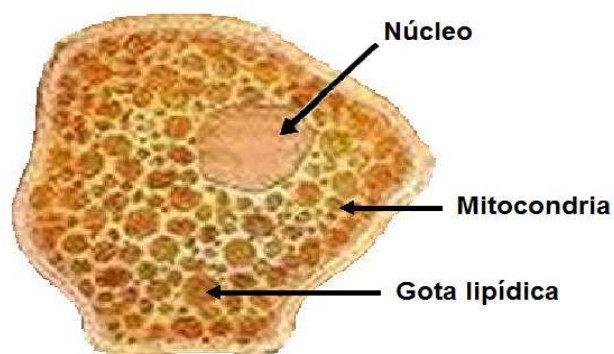


Figura 3.- Morfología de un adipocito pardo.

Estos adipocitos presentan una actividad termogénica muy elevada, siendo esta su principal función. La distribución multilocular de la grasa en el citoplasma le aporta una mayor superficie específica de reacción enzimática, esto junto a la abundancia mitocondrial, le permite dar una respuesta rápida a las necesidades calóricas y energéticas del organismo. Están muy presentes en los tejidos adiposos de animales aclimatados al frío y los neonatos, en estos últimos los adipocitos pardos acaban adquiriendo las características de los blancos con el tiempo.

### 2.1.1.2. Tejido adiposo blanco

Su aspecto es glandular, con mucha vascularización. Se distribuye mayormente como grasa subcutánea en el panículo adiposo (zona abdominal), mesenterio, zona retroperitoneal y periférica (extremidades); aunque su acumulación y distribución es función de factores como el sexo, edad, metabolismo y alimentación del individuo. Los adipocitos blancos propios de este tejido son esféricos y de gran tamaño, con diámetros entre los 10 y 100  $\mu\text{m}$ , en rumiantes pueden alcanzar los 2-3 nanolitros. Poseen una gran gota lipídica central, compuesta principalmente por triacilgliceroles, la cual conforma hasta el 80% de su volumen. Poca presencia de citoplasma y organelas; un núcleo lateral aplanado, mitocondrias, algo de retículo endoplasmático rugoso (RER), característico retículo endoplasmático liso (REL) que interviene en la síntesis lipídica y un pequeño aparato de Golgi. La siguiente imagen muestra la morfología de un adipocito blanco (Gallegos *et al.*, 2007).

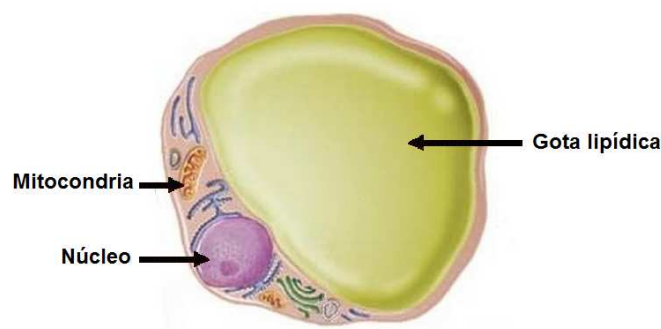


Figura 4.- Morfología del adipocito blanco.

Los adipocitos blancos presentan diversa funcionalidad:

- **Estructural:** cumple una importante función como sostén de los órganos. El tejido adiposo subcutáneo actúa como aislante térmico y, junto al intramuscular, como amortiguador de golpes (riñones, rodillas, etc). La grasa con función amortiguadora está dividida en cámaras por gruesos tabiques de tejido conectivo entre la piel y las fascias musculares.
- **Hormonal:** el tejido adiposo blanco es productor de sustancias de acción endocrina, paracrina y autocrina relacionadas con la regulación del peso corporal (leptina, Acrp30/AdipoQ), con efecto directo sobre el apetito y el gasto energético. Así mismo, tienen influencia sobre el sistema inmune (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6), estimulan la lipólisis e inhiben la lipogénesis; la función vascular (angiotensina e inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1), regulan el aporte de ácidos grasos del flujo sanguíneo al adipocito; el desarrollo de la resistencia a la insulina (resistina), la cual inhibe la insulina y por tanto la lipogénesis; función reproductora (estrógenos), estimulan la lipogénesis (Moreno *et al.*, 2006).
- **Energética:** constituye el mayor reservorio energético del organismo. La glucosa es absorbida del flujo sanguíneo por el adipocito, el cual tras una serie de reacciones (lipogénesis) lo acumula en forma de triglicéridos. Ante una situación de carestía energética se estimula la lipólisis, liberando a la sangre ácidos grasos (energía para las células).

### 2.1.2 Crecimiento del tejido adiposo

El crecimiento del tejido adiposo se produce por la combinación de dos procesos, hiperplasia e hipertrofia (Álvarez *et al.*, 2009).

- La hiperplasia es el aumento del número de adipocitos. Este proceso ocurre durante el periodo prenatal o en adultos con obesidad. Esta proliferación se produce en los preadipocitos, los cuales posteriormente irán diferenciándose en adipocitos maduros. La siguiente figura muestra este desarrollo.

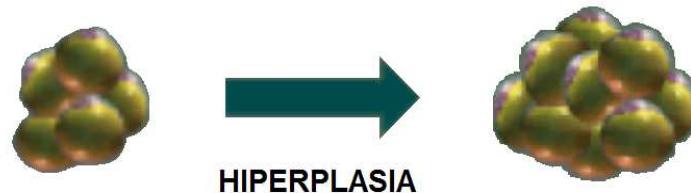


Figura 5.- Crecimiento de adipocitos por hiperplasia.

- La hipertrofia es el aumento del tamaño de los adipocitos. Es un crecimiento discontinuo por acumulación de triglicéridos que depende del balance de procesos de lipogénesis y lipólisis en el adipocito. A continuación se muestra de forma gráfica este desarrollo.



Figura 6.- Crecimiento de adipocitos por hipertrofia.

### 2.1.3. Metabolismo del adipocito

El tamaño del adipocito depende de la cantidad de triglicéridos acumulados en la gota lipídica, y esta del balance neto de los procesos de lipogénesis y lipólisis. La síntesis de triglicéridos es un proceso complejo desarrollado en la mitocondria y el citosol celular que emplea varias rutas y reacciones enzimáticas. Los triglicéridos se componen de una molécula esterificada de glicerol (glicerina) y tres ácidos grasos, en

su mayoría saturados, de cadena larga (>10 C). A continuación se muestra un esquema de la combinación de procesos que componen la lipogénesis y dan lugar a la síntesis del triglicérido (Hilda *et al.*, 2010).

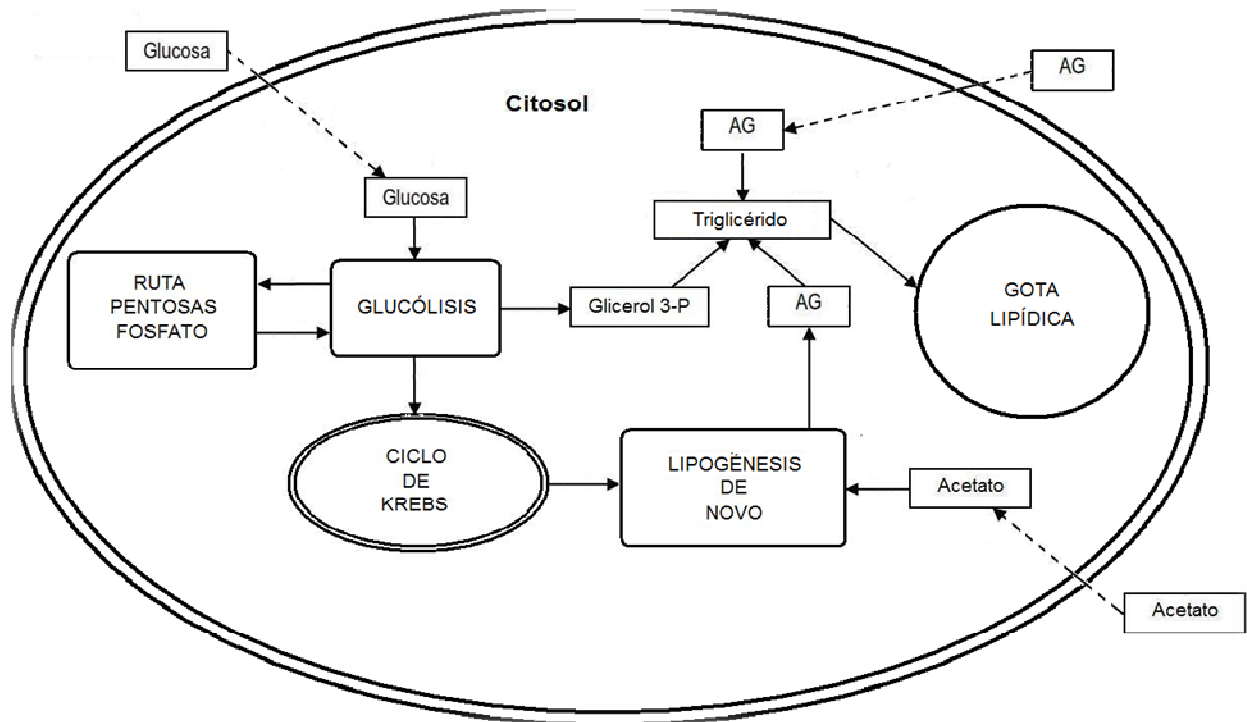


Figura 7.- Esquema del proceso de lipogénesis.

Mediante la aplicación de isótopos se demostró que, en el tejido adiposo, los lípidos de los depósitos grasos se recambian de forma constante, incluso existiendo equilibrio calórico, renovándose cada 2 – 3 semanas (Oosterveer *et al.*, 2011).

### 2.1.3.1. El glicerol

Es un alcohol de tres carbonos con grupos carboxilo, siendo la estructura base a la que se unen los ácidos grasos para formar el triglicérido en la lipogénesis. Esta molécula puede presentarse simplemente como glicerol, una glicina con tres grupos hidroxilos, o como glicerol 3 fosfato, con dos grupos hidroxilos y un grupo fosfato. La forma fosfatada es la obtenida por la glucólisis y la forma hidroxilada por la desesterificación de triglicéridos. En la siguiente figura se observa la diferencia estructural de ambas formas.

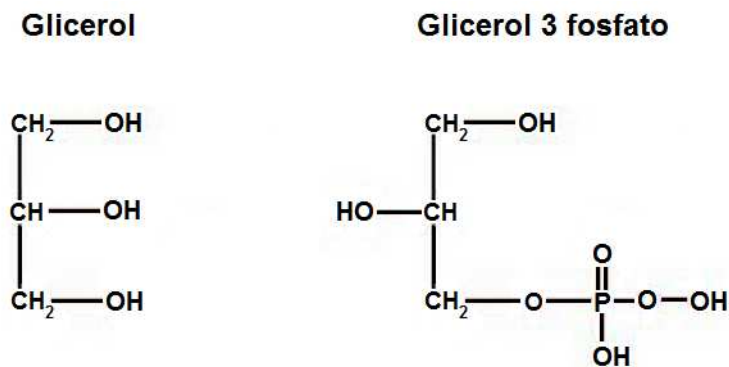


Figura 8.- Estructuras químicas del glicerol y glicerol 3 fosfato.

La principal fuente de glicerol para el adipocito procede de la degradación de la glucosa por las rutas de la glucólisis y la pentosa fosfato, estando ambas conectadas. Estas rutas se producen en el citosol e implican a dos de las enzimas estudiadas en el presente trabajo, la Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y la Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH). En el siguiente esquema se muestra el proceso de síntesis del glicerol 3-fosfato, con las dos rutas y enzimas mencionadas (Vernon *et al.*, 1980).

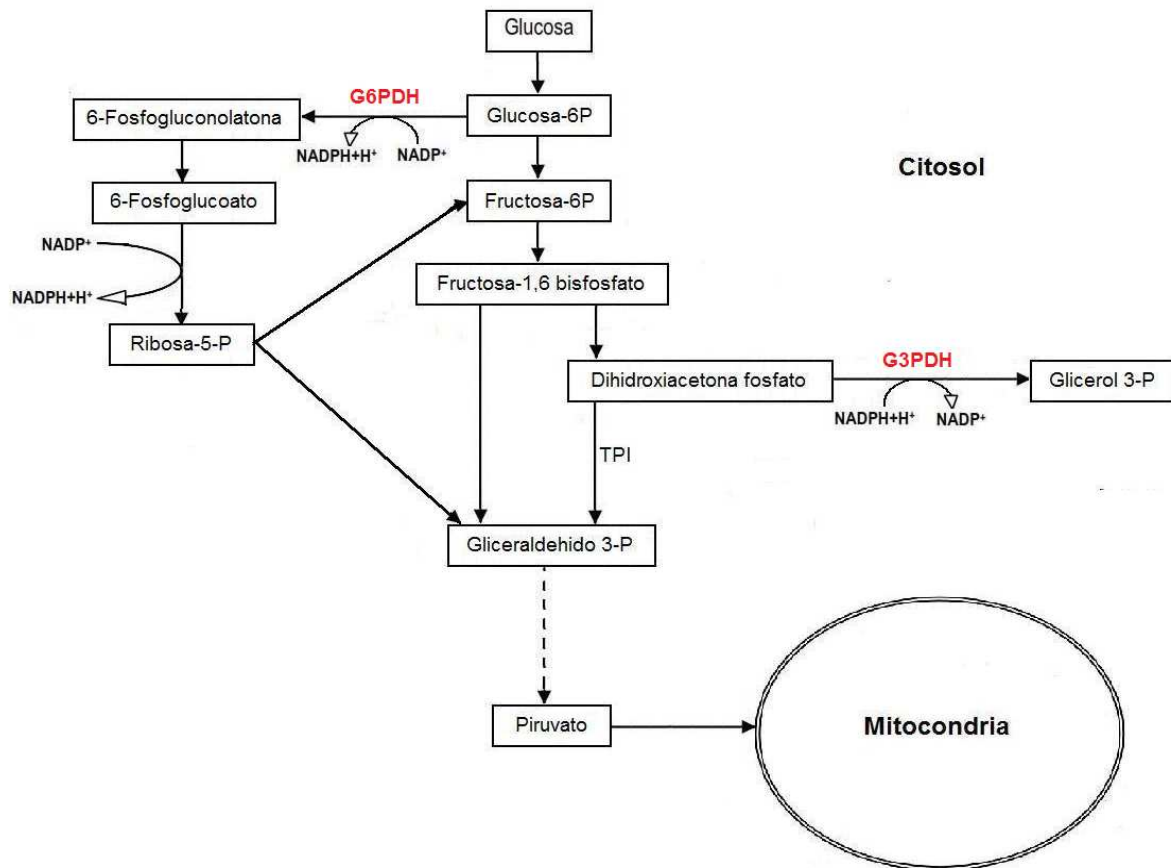
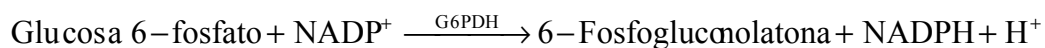


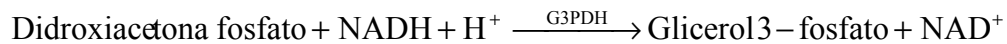
Figura 9.- Esquema de las rutas de síntesis del glicerol 3-fosfato.

Reacción enzimática de la G6PDH:



La glucosa entra del capilar al adipocito por la acción de la insulina. Dentro esta es fosforilada en glucosa 6 fosfato, siendo el sustrato básico de la glucolisis y la ruta de pentosa fosfato. Este producto glucosa 6 fosfato es deshidrogenado por la G6PDH en 6-fosfogluconolatonas, dentro de la ruta pentosa fosfato, sirviendo de sustrato a la siguiente reacción y suministrando poder reductor al adipocito en forma de NADPH + H<sup>+</sup>.



Reacción enzimática de la G3PDH:

Es la reacción final para la obtención del glicerol esterificado con un grupo fosfato y que compondrá el triglicérido. La dihidroxiacetona fosfato está integrada en la glucólisis, siendo la precursora del gliceraldehido-3-fosfato por la enzima triosa fosfato isomerasa (TPI), pero en los adipocitos y células hepáticas puede escindir-se del proceso y convertirse en glicerol 3 fosfato mediante la enzima G3PDH con oxidación de  $\text{NADH} + \text{H}^+$ .

**2.1.3.2. Los ácidos grasos (AG)**

Son cadenas hidrocarbonadas unidas por enlaces simples, ácido graso saturado, y alguno doble o triple, ácido graso mono/poliinsaturado, con longitudes de entre 1 y 30 carbonos. Aquellos ácidos grasos que contienen 6 carbonos o menos se clasifican terminológicamente como ácidos grasos volátiles (AGV).

Los AG son vitales para el metabolismo celular, conforman estructuras celulares como los fosfolípidos y aportan energía mediante su oxidación en la cadena respiratoria mitocondrial y el ciclo de Krebs. En la Figura 10 se muestra unas representaciones esquemáticas de la estructura de los ácidos grasos.

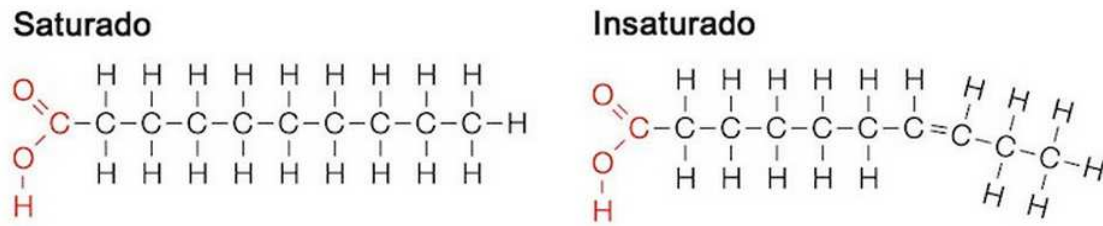


Figura 10.- Estructura de los ácidos grasos saturados e insaturados.

La obtención de los ácidos grasos puede darse por dos vías: extracelular, introducidos en el adipocito desde el flujo sanguíneo e intracelular, sintetizados por la célula a partir de otros compuestos precursores.

### A) Vía extracelular

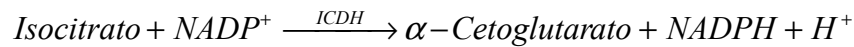
Los lípidos presentes en el flujo sanguíneo son transportados por diversos tipos de lipoproteínas. Los ácidos grasos volátiles (AGV) son transportados por las albúminas junto con otros ácidos de 12 carbonos o menos, el resto de ácidos más complejos se adhieren a otras lipoproteínas, como las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y quilomicrones, que los esterifican con glicerol transportándolos en forma de triglicéridos (Carriquiry *et al.*, 2008).

Para su liberación y posterior entrada al adipocito, una enzima adherida a la pared capilar, la lipoproteinlipasa, descompone los triglicéridos unidos a los VLDL y quilomicrones en glicerol y ácidos grasos, introduciéndose la mayoría de estos ácidos en el adipocito y empleándose para la formación de los triglicéridos (Benitez *et al.*, 2004).

El glicerol liberado al flujo sanguíneo se esterifica con los ácidos grasos restantes, adhiriéndose a las lipoproteínas, o llega al hígado y se incorpora a la gluconeogénesis (Rosario *et al.*, 2009).

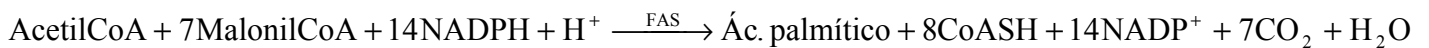


Reacción enzimática del ICDH:



Del ciclo de Krebs mitocondrial sale citrato al citosol. Este compuesto es empleado en varias rutas metabólicas y una de ellas provoca, tras dos deshidrataciones simultáneas, la degradación del citrato a isocitrato. Con la reacción de la ICDH se obtiene poder reductor en forma de NADPH + H<sup>+</sup> y el producto regresa dentro de la mitocondria incorporándose al ciclo de Krebs.

Reacción enzimática de la FAS:



El proceso de lipogénesis *de novo* puede resumirse en la anterior reacción, pero esta abarca una serie de reacciones secundarias y procesos previos e intermedios que, mediante la enzima FAS, culminan con la formación del ácido palmítico, un ácido graso saturado de 16 carbonos. El poder reductor NADPH + H<sup>+</sup> requerido para llevarse a cabo es grande y se obtiene de reacciones producidas por otras vías.

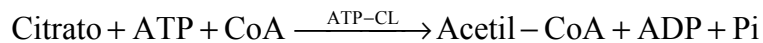
Es importante destacar que el Acetil CoA citosólico se obtiene por dos vías:

- El acetato proveniente del flujo sanguíneo se une a la coenzima A, formando el Acetil CoA mediante la sintetasa acetil-coenzima A (ACS).



Esta ruta es muy abundante en rumiantes, ya que el acetato es un ácido graso volátil que se obtiene de forma abundante de la dieta.

- El citrato originario de la mitocondria se une a la coenzima A, formando el acetil CoA mediante la ATP – citrato liasa (ATP-CL).



Tras el proceso descrito con la síntesis del ácido palmítico ya se podría realizar la formación del triglicérido en los adipocitos. Pero este ácido también suele emplearse como precursor de otros más complejos, de cadena más larga e insaturados, a partir de una serie de transformaciones internas en cadena del retículo endoplasmático liso llevado a cabo principalmente por las células hepáticas. El tratamiento del ácido palmítico mediante enzimas elongasas (añaden pares de carbonos hidrogenados a la cadena original) y desaturasas específicas (introducen la insaturación en enlaces determinados) realizado en cadena produce todos los ácidos grasos de la serie 9 ( $\Omega$ -9) que desempeñan funciones metabólicas importantes (Mataix *et al.*, 2010). Algunos de estos ácidos sintetizados pueden ser obtenidos también por la dieta, como el AG esteárico (C18:1) o el AG Erúcido (C22:1) y de igual manera todos ellos pueden ser empleados para la síntesis de triglicéridos en el adipocito o la obtención de AG más complejos realizando el proceso descrito.

### 2.1.3.3. El triglicérido

Tras los procesos descritos anteriormente el adipocito ya dispone de glicerina y ácidos grasos para formar el triglicérido. La síntesis consta de dos fases diferenciadas, la activación de los ácidos grasos y el ensamblaje al glicerol. La primera es la conversión de los ácidos en acil-CoA grasos por la acción de la Acil-CoA sintetasa. La segunda es la acilación del glicerol-3-fosfato, en orden de posición  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\alpha'$  (figura 12), con estos acil-CoAs grasos mediante enzimas transferasas. En la última etapa se

requieren fosfatasas que liberen el grupo fosfato del glicerol, posición  $\alpha'$ , y permitan la adición del tercer acil-CoA para formar el triglicérido. Una vez sintetizado es transportado y almacenado en la gota lipídica. A continuación se muestra la estructura química del triglicérido.

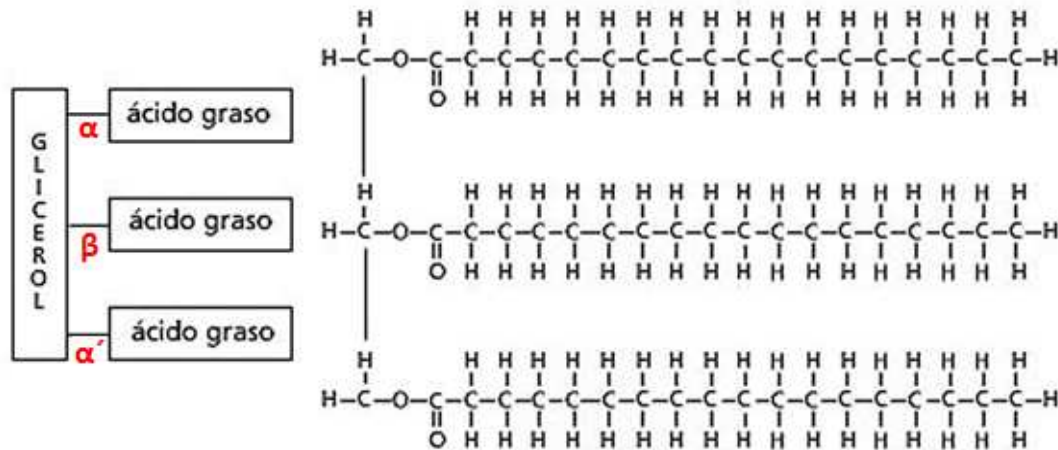


Figura 12.- Estructura del triglicérido: Una molécula glicerol unido a tres ácidos grasos saturados.

Esta acilación no se realiza con cualquier ácido graso; normalmente la primera posición del glicerol ( $\alpha$ ) es ocupada por un saturado, la segunda ( $\beta$ ) por un mono/poliinsaturado y la tercera ( $\alpha'$ ); indistintamente por uno u otro en caso de síntesis de triglicéridos, o por un grupo fosfatado en caso de síntesis de fosfolípidos. El tipo de ácidos grasos, así como su orden de posición, determinan las propiedades físico-químicas y biológicas del triacilglicérido o fosfolípido (Berriain *et al.*, 2009).

No se encuentra presente la enzima sintetasa acil-CoA para los ácidos grasos de cadena media (8 – 10 C) por lo que estos no pueden ser empleados para la síntesis de triglicéridos ni fosfolípidos, estos ácidos son oxidados en el hígado para uso energético o se emplean en la síntesis de leche.

## 2.2. ALIMENTACIÓN EN RUMIANTES: DIGESTIÓN Y ASIMILACIÓN DE NUTRIENTES

Los rumiantes presentan las mismas necesidades nutricionales que el resto de animales, dada su condición herbívora han desarrollado un sistema poligástrico para cubrir dichas necesidades a partir del consumo exclusivo de vegetales.

El alimento, basado en forrajes ricos en fibra y compuestos almidonados, está formado por agua y materia orgánica, siendo los carbohidratos, proteínas y lípidos sus grandes grupos químicos moleculares, aunque estos nutrientes no pueden ser utilizados directamente por el animal. Para su adecuada digestión y asimilación los rumiantes poseen una cámara fermentativa pre-gástrica (retículo, rumen y omaso) y una cavidad gástrica (el abomaso) con mucosa secretora e idéntica funcionalidad a la de los estómagos de monogástricos.

El alimento comienza su degradación con el proceso de rumia, que es la capacidad del rumiante para remasticar el alimento ingerido que se encuentre en el retículo-rumen mediante su regurgitación. Esta acción mecánica reduce el tamaño de las partículas pero no las hace disponibles para el animal todavía. Debido al escaso contenido energético de los vegetales el animal necesita consumir una gran cantidad de material.

En el rumen se lleva a cabo una digestión aloenzimática, siendo los microorganismos pobladores (bacterias, protozoarios y hongos de levadura) los que degradan y se alimentan, mediante procesos de fermentación anaeróbica, del alimento ingerido por el rumiante. Es complicado separar las rutas de digestión dada la intrincada red trófica que forman, donde gran variedad de microorganismos interdependientes compiten por un mismo sustrato y cuyos desechos son intermediarios metabólicos de otros. No obstante se pueden identificar los elementos

nutritivos obtenidos por el animal mediante esta simbiosis microorganismos-rumiante (Van Lier *et al.*, 2008).

### 2.2.1. Los carbohidratos

Los escasos azúcares solubles y almidones (glucosas de 6 carbonos unidas por enlaces  $\alpha$  1-4) son rápidamente consumidos como glucosa por los propios microorganismos. Sin embargo la digestión de la abundante celulosa y hemicelulosa hasta glucosa, para su posterior consumo bacteriano también, sólo puede llevarse a cabo mediante enzimas específicas de bacterias celulolíticas y hemicelulolíticas debido a los enlaces  $\beta$  1-4 que presentan. La siguiente figura muestra como se unen dos glucosas con enlaces  $\alpha$  y  $\beta$  para formar almidones o celulosas.

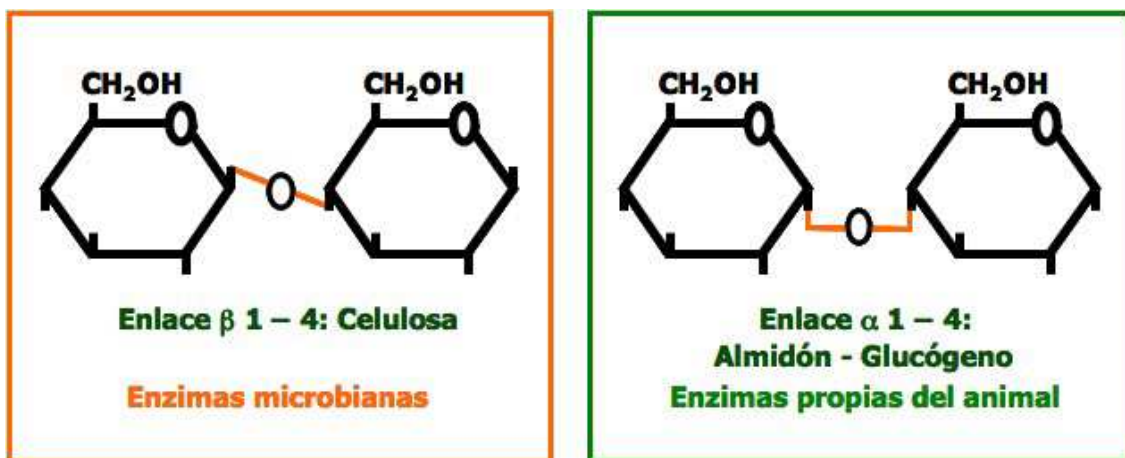


Figura 13.- Tipos de enlaces entre glucosas.

Esta capacidad del rumiante para aprovechar de forma indirecta la celulosa y la hemicelulosa es la clave de su supervivencia.

Este consumo bacteriano de glucosa produce como desecho metabólico grandes cantidades de ácidos grasos volátiles (AGV) y gas metano ( $\text{CH}_4$ ). Estos primeros son absorbidos en mayor parte por las paredes del retículo, rumen y omaso,



y transportados directamente hasta el flujo sanguíneo que lleva al hígado, el metano se pierde por eructación. Sólo alrededor del 5% es absorbido por el intestino delgado tras atravesar el abomaso. En la figura 14 se esquematizan las diferentes rutas de metabolización de azúcares llevadas a cabo por los microorganismos para la obtención de los AGV de desecho correspondientes.

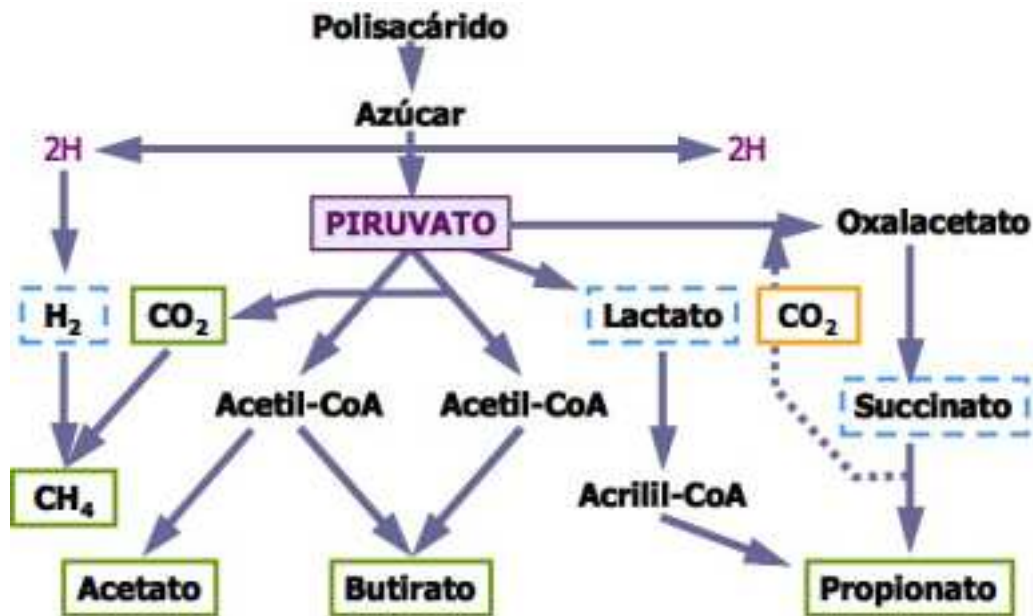


Figura 14.- Metabolismo bacteriano de los azúcares y sus productos de desecho (Regueiro *et al.*, 2008).

Los AGV absorbidos en mayor cantidad presentan cadenas muy cortas, estos son el acetato (2C), propionato (3C) y butirato (4C) (Lagurez *et al.*, 2009).

- El acetato se incorpora al flujo sanguíneo y no sufre modificaciones a su paso por el hígado, se emplea para la síntesis de ácidos grasos saturados de cadena larga (palmítico) en los adipocitos y células hepáticas.
- El propionato se utiliza en el hígado para producir glucosa y lactato, su síntesis es esencial dado que los microorganismos consumen casi la totalidad de los azúcares presentes en la dieta.

- El butirato a su llegada al hígado es transformado en cuerpos cetónicos o cetonas (acetoacetato y  $\beta$  hidroxibutirato), su función es suministrar energía especialmente a órganos como los riñones y el corazón.

Los microorganismos también metabolizan estos AGV como fuente de energía en su desarrollo, por lo que no todos los ácidos grasos volátiles liberados en el rumen son absorbidos y aprovechados por el animal.

### 2.2.2. Las proteínas

Los microorganismos del rumen utilizan los aminoácidos de las proteínas, rompiéndolas mediante proteasas (exoenzimas) y del nitrógeno no proteico (NNP) proveniente de la dieta para sintetizar sus propias proteínas y llevar a cabo su metabolismo. Para que los microorganismos proliferen deben disponer básicamente de fuentes de energía (azúcares) y elementos estructurales (aminoácidos provenientes de proteínas o NNP).

Si existe una baja concentración de compuestos nitrogenados en el rumen, estos se reciclan del riego sanguíneo en el hígado y llegan al rumen por vía salivar o epitelial en forma amoniacal ( $\text{NH}_3$ ). En caso contrario el amoníaco excesivo puede ser retirado del rumen también mediante su absorción por las paredes del rumen. Esta es una medida de seguridad llevada a cabo para sustentar la flora microbiana y el pH ruminal (Regueiro *et al.*, 2008). El ciclo de los compuestos nitrogenados en el rumiante se esquematiza en la figura 15.

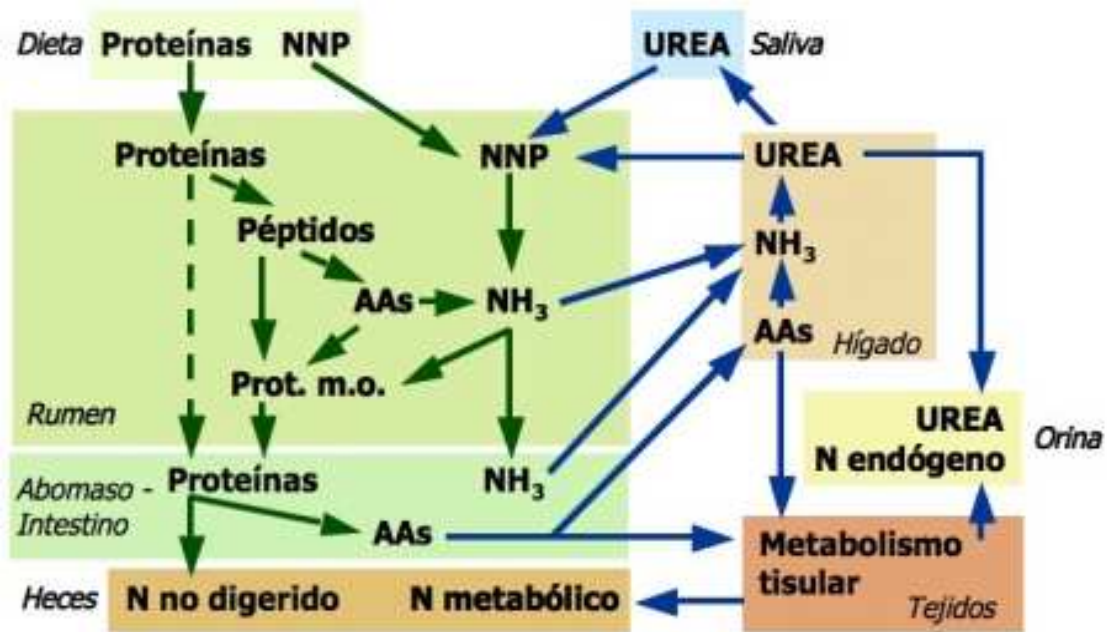


Figura 15.- Esquema del ciclo del nitrógeno en el rumen  
(Regueiro *et al.*, 2008).

El rumiante obtiene los aminoácidos requeridos mediante la digestión de estos microorganismos con los jugos gástricos del abomaso y la posterior absorción de sus compuestos nitrogenados en el intestino delgado. Los microorganismos del rumen se encuentran así en un continuo equilibrio de proliferación (cámaras pre-gástricas) y muerte (abomaso).

### 2.2.3. Los lípidos

Las plantas forrajeras contienen entre 3 – 15% de lípidos con distintos ácidos grasos que se pueden clasificar según su grado de hidrogenación (saturados, mono-insaturados o poli-insaturados) o la longitud de su cadena. A continuación se muestra una tabla con los contenidos y tipos de ácidos grasos presentes en algunos alimentos utilizados habitualmente en las dietas de rumiantes.

Tabla 1.- Composición en ácidos grasos de alimentos típicos en dietas de rumiantes (Church *et al.*, 1988).

ÁCIDOS GRASOS	Heno de alfalfa	Pasto de gramíneas	Semilla de soja	Maíz en grano
Mirístico (C14:1)	0.9	1.1	-----	-----
Palmítico (C16:0)	33.9	15.9	12.4	14.3
Palmitoleico (C16:1)	1.2	2.5	-----	0.1
Estearico (C18:0)	3.8	2.0	3.7	1.9
Oleico (C18:1)	3.0	3.4	25.4	39.0
Linoleico (C18:2)	24	13.2	50.6	43.5
Linolénico (C18:3)	31.0	61.3	7.9	1.1
<b>Contenido total AG, % del Extracto Etéreo</b>	<b>40</b>	<b>57</b>	<b>90</b>	<b>65</b>

Se puede observar que existe un predominio claro de ácidos grasos poliinsaturados en la dieta, sin embargo casi la totalidad de los lípidos (triglicéridos, fosfolípidos y galactolípidos) son rápidamente modificados en profundidad por los microorganismos del rumen mediante procesos anaeróbicos, siendo hidrolizados (hidrólisis de los enlaces ester con lipasas bacterianas) en glicerol, ácidos grasos y otros compuestos. Debido a la fermentación bacteriana el glicerol se transforma en ácido propiónico (propionato) y pasa a ser absorbido por las paredes del rumen, los ácidos grasos (AG), poli-insaturados en su mayoría, también se alteran en el fuerte ambiente reductor del retículo-rumen por la biohidrogenación bacteriana, hidrogenándose para dar lugar a ácidos grasos saturados (palmítico y estearico) o isómeros insaturados trans (eláidico, vaccénico, etc). De la degradación de los lípidos también se obtienen azúcares y alcoholes aminados que serán posteriormente modificados en el rumen. En la figura 16 se esquematiza el metabolismo de los lípidos en el rumen.

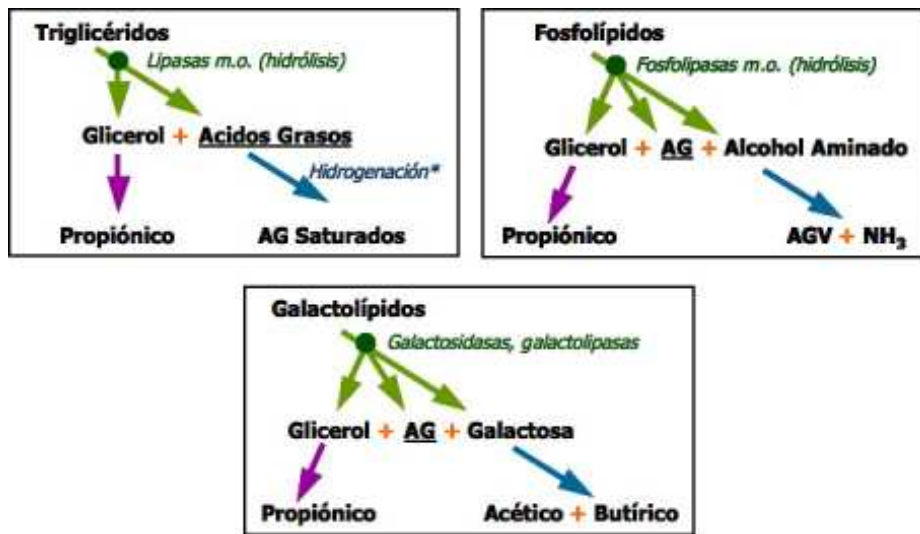


Figura 16.- Metabolismo de los lípidos en el rumen: los distintos sustratos y sus productos finales.

Con todo este proceso el animal absorbe por las paredes del rumen gran cantidad de AG saturados (esteárico y palmítico), insaturados trans (vaccénico, etc) y AGV (acético, propiónico y butírico), así como muchos ácidos grasos parcialmente hidrogenados (CLA) o que no han tenido tiempo de ser modificados (linolénico, linoleico, etc). Todos estos ácidos grasos del rumen son aprovechados por los microorganismos ruminales, que los metabolizan para sintetizarse nuevos ácidos grasos de cadena par (C14, C16 y C18), impar (C15 y C18), cadenas ramificadas pares (Acético + butírico adherido) y cadenas ramificadas impares (Acético + Valérico (5C) adherido), más tarde estos organismos son digeridos en el abomaso y sus AG absorbidos en el intestino delgado.

Los ácidos grasos esenciales ácido linolénico (C18:3,  $\Omega$ -3) y ácido linoleico (C18:2,  $\Omega$ -6) también son degradados en el rumen. Ambos se hidrogenizan a AG Vaccénico, pero el AG linoleico genera durante el proceso el isómero CLA como ácido intermedio, pudiendo ser absorbido también por la pared ruminal. El proceso de biohidrogenización culmina con la producción de ácido esteárico a partir del vaccénico. (Khanal *et al.*, 2004). Aunque debido al alto contenido de estos dos ácidos en la dieta y de que el proceso de hidrogenación en el rumen es de velocidad limitada, parte de los

ácidos grasos originales (AG linoleico y AG linolénico) puede ser absorbido sin modificaciones por la pared ruminal hasta el torrente sanguíneo.

## 2.3. LOS ÁCIDOS GRASOS

### 2.3.1. Definición y clasificación

Los ácidos grasos son largas cadenas hidrocarbonadas de estructura lineal con un grupo carboxil extremo (-COOH) muy activo para establecer uniones con otras moléculas. En función del tipo de uniones presentes entre los carbonos, el ácido graso se clasifica como saturado (solo enlaces simples) e insaturado (al menos un enlace doble o triple). Dentro de la categoría de insaturados se encuentran los monoinsaturados (un enlace doble o triple) y los poliinsaturados (dos o más enlaces dobles y/o triples).

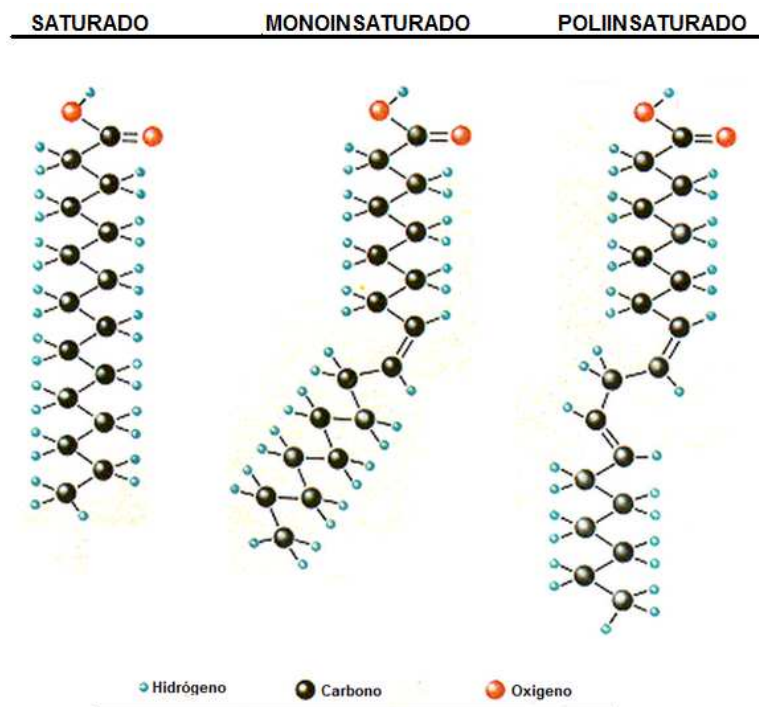


Figura 17.- Clasificación de ácidos grasos.

Existe otra categoría de clasificación dentro de los grupos de ácidos grasos insaturados, ello se debe a que los ácidos de estos grupos pueden formar isómeros, moléculas químicamente idénticas pero de conformación espacial dispar, llamados cis y trans. La cadena del isómero cis presenta una curva en el enlace doble/triple en forma de codo, mientras que la forma trans es recta en dichos enlaces. Este tipo de estructura determina las propiedades físico-químicas y biológicas del ácido graso.

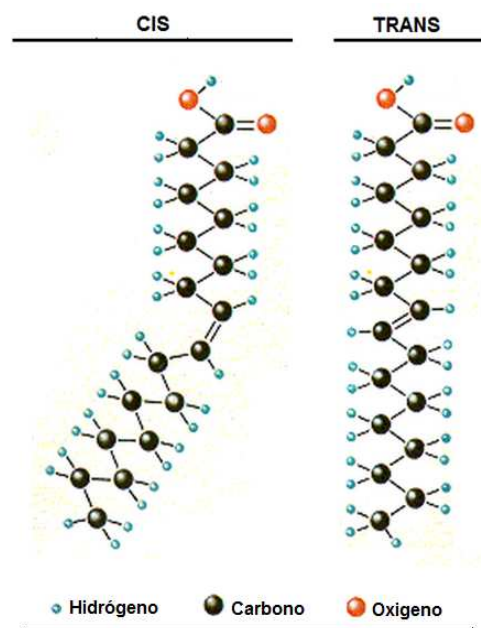


Figura 18.- Estructura química de los isómeros ácido oleico (cis) y ácido eláidico (trans).

### 2.3.2. Metabolismo y efectos de los ácidos grasos

Tanto nuestro organismo como el de los rumiantes requieren de ácidos grasos pertenecientes a los tres grupos mencionados, éstos desempeñan complejas y diversas funciones metabólicas de tipo energético (combustible para las células), estructural (elementos claves de los fosfolípidos de membrana) y de regulación (hormonas, coagulación sanguínea y contracción del músculo liso entre otras). Para nosotros su consumo en cantidades excesivas y/o desproporcionadas puede ocasionar diversas patologías, comprensible al tratarse de un elemento tan biológicamente básico y

multifuncional. A continuación se describen algunos de los efectos adversos y beneficiosos derivados de su ingesta.

### 2.3.2.1. Los ácidos grasos saturados

Los rumiantes los obtienen por la hidrogenación de los ácidos insaturados de la dieta y los humanos por alimentos de origen animal como la carne, los huevos o la leche.

Los ácidos grasos saturados de cadena corta y media no entrañan tanto riesgo para la salud como los de cadena larga, ya que en principio se asimilan y oxidan con facilidad. Sin embargo el consumo excesivo de ácidos grasos saturados de cadena larga, afectan negativamente a los fosfolípidos de las membranas plasmáticas (ocupan ambas posiciones  $\alpha$  y  $\beta$ ), reduciendo su fluidez e interfiriendo sus proteínas transportadoras. En tal caso cuando las lipoproteínas Colesterol-LDL (macromoléculas lípido-proteicas que captan, esterifican y transportan el colesterol, procedente de la dieta o sintetizado en el hígado, por la sangre hasta las células) llegan a los receptores de las lipoproteínas Colesterol-LDL de la membrana (vías de entrada del colesterol a la célula), estas no pueden introducir el colesterol de forma eficaz. Esta ralentización provoca la acumulación del Colesterol-LDL (colesterol malo) en las paredes vasculares, pudiendo provocar con el tiempo estenosis coronaria, aterosclerosis y demás enfermedades relacionadas (Farquharson *et al.*, 2004).

### 2.3.2.2. Los ácidos grasos insaturados

Son los ácidos predominantes en el mundo vegetal. En el estudio de los ácidos grasos insaturados se deben tener muy presente los isómeros, cis y trans, ya que presentan entre sí propiedades antagónicas a nivel biológico pese a su idéntica composición.



## A) Los ácidos grasos monoinsaturados

Los rumiantes no tienen dificultad en abastecerse de este tipo de ácidos grasos, dado que son componentes básicos de su dieta y la biohidrogenación del rumen no produce la saturación de todas las cadenas. Nosotros debido a nuestra condición omnívora debemos procurarnos una dieta equilibrada con vegetales que nos aporte estos elementos escasos en alimentos de origen animal.

Diferenciando las propiedades de los isómeros en los humanos, los ácidos grasos monoinsaturados cis no muestran la problemática de los saturados. En este grupo destaca el AG Octadecaenoico u Oleico (C18:1, cis- $\Delta$ 9,  $\Omega$ -9), muy presente en alimentos como las nueces o el aceite de oliva, con numerosos estudios realizados en diversas áreas de la biología que reflejan los beneficios derivados de su consumo. La correcta síntesis de fosfolípidos con dos ácidos; saturado e insaturado, el refuerzo del sistema inmunológico, la reducción del riesgo de padecer artritis reumatoidea o de desarrollar resistencia a la insulina son algunas de las propiedades atribuidas. Se ha comprobado que reducen el colesterol en sangre, ya que estimulan la síntesis de la lipoproteína Colesterol-HDL (macromolécula lipídico-proteica que transporta el colesterol por la sangre al hígado, para su catabolismo y excreción en forma de bilis) y aumenta su concentración de apoproteínas A-1 (vinculada a la esterificación y captación del colesterol libre) (Farquharson *et al.*, 2004).

Estos ácidos también protegen a las lipoproteínas de baja densidad LDL (la mitad de sus ácidos grasos son insaturados) de la peroxidación lipídica, debido a que son menos reactivos a los radicales libres hidróxilos (-OH) que los poliinsaturados, y la pérdida de su funcionalidad. Esto reduce la patología de la formación de las células espumosas, formadas por macrófagos con el atrapamiento de LDLs oxidadas, que originan las estrías de grasa y el desarrollo de aterosclerosis (acumulación de depósitos grasos en el interior de las paredes arteriales) (Aguilera *et al.*, 2001).

En el campo de la neurociencia, producen un aumento significativo en la expresividad de las proteínas marcadoras de la diferenciación neuronal y la formación de sus sinapsis en neonatos (De la Vega *et al.*, 2008).

Los ácidos grasos monoinsaturados presentan una menor reactividad frente a los radicales libres por tener únicamente un enlace doble, pero aún así siguen siendo susceptibles y su oxidación libera más radicales libres (-OH), propagando así la peroxidación lipídica (Pérez *et al.*, 2006). Los antioxidantes  $\beta$ -carotenos, tocofenoles y fenólicos, presentes en hortalizas, frutas y verduras, ralentizan en gran medida esta degradación oxidativa, siendo ellos quienes anexionan y estabilizan estos radicales para proteger al ácido graso.

En cuanto a los ácidos grasos trans, ya sean mono o poliinsaturados, estos son difíciles de encontrar en la naturaleza, salvo en la leche y tejidos de rumiantes (AG vaccénico, C18:1, trans- $\Delta$ 11) o alimentos manipulados con proceso de hidrogenación catalítica de grasas, como sucede en el rumen por la acción bacteriana (Pueyrredón *et al.*, 1999). A efectos biológicos estos insaturados se comportan como ácidos grasos saturados pero también ocasionan alteraciones metabólicas a nivel hormonal (prostaglandinas y otros eicosanoides, alterando la agregación plaquetaria y la función vascular) lipídico (aumento del colesterol LDL, disminución del colesterol HDL) y de membrana celular (síntesis de fosfolípido anormal, disminuyen la fluidez de membrana y alteran sus propiedades físico-químicas) (Leal *et al.*, 2005). Estos efectos adversos no se dan en los rumiantes, que poseen rutas metabólicas para gestionar la gran cantidad de ácidos grasos trans producidos en el rumen.

### **B) Los ácidos grasos poliinsaturados**

Estos ácidos son, dentro de los ácidos grasos insaturados, el grupo mayoritario dentro de las dietas consumidas por los rumiantes y que son absorbidos por la pared

ruminal o por el intestino con la digestión de los microorganismos. En nuestro caso los alimentos vegetales (aceites, frutos secos, etc), huevos y pescado azul componen una fuente rica en este tipo de ácidos, los cuales abarcan una gran diversidad de ácidos de cadena larga con varios enlaces insaturados. Al igual que los anteriores ácidos grasos, estos también desempeñan multitud de funciones de tipo energético, estructural y de regulación.

Uno de los mayores inconvenientes que presentan estos ácidos es la ya mencionada peroxidación lipídica, siendo su susceptibilidad proporcional a la cantidad de dobles enlaces presentes. Esta peroxidación, más agravada en los poliinsaturados, no solo modifica la funcionalidad del ácido grasos sino que provoca una reacción en cadena de producción de radicales y de degradación molecular (lípidos, proteínas, DNA, etc). Dado que la producción de radicales es inherente al metabolismo celular, la única vía de control eficaz pasa por los antioxidantes (Pérez *et al.*, 2006).

En esta categoría de poliinsaturados se encuentran también los ácidos grasos esenciales (series de  $\Omega$ -3 y  $\Omega$ -6). El asignado carácter de “esencial” quiere señalar que los ácidos grasos que abarcan ambas series desempeñan funciones vitales para el organismo, tanto de humanos como de rumiantes. Los ácidos más complejos de las series, 20 carbonos o más con poliinsaturación, sintetizan compuestos de gran actividad metabólica llamados eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos), al unirse con los fosfolípidos de la membrana plasmática (FAO *et al.*, 1997), siendo estos los mayores responsables de las propiedades saludables atribuidas a estas series de ácidos grasos. El problema radica en que los ácidos precursores de estas dos series (serie 6; AG linoléico, serie 3; AG linoléico) no pueden ser obtenidos por el organismo mediante su síntesis interna como sucedía con la serie 9 (ácido palmítico obtenido en la lipogénesis de novo). Además existe una triple inhibición competitiva entre los ácidos grasos pertenecientes a las series 3, 6 y 9. Las series 3 y 6 suprimen el metabolismo de la 9, y estas dos a su vez lo hacen entre sí (Berriain *et al.*, 2009). Esto sumado a que no existe interconversión de ácidos entre las series (salvo una ruta extremadamente ineficiente de la serie 9 a la 6) obliga a una ingesta

equilibrada de ácidos grasos pertenecientes a las series 3 y 6, especialmente de sus ácidos grasos precursores, para conseguir la proporción idónea de 1:4 respectivamente (Waliszewski *et al.*, 2006). Los ácidos de la serie 9 se restituyen con facilidad a partir de la síntesis del AG palmítico.

En el caso de los rumiantes, los ácidos linoleico y linolénico también se degradan en el rumen a formas comunes, más saturadas y simples, lo que significa que el único medio que tiene el rumiante de obtener estos ácidos esenciales es su absorción directa a través de las paredes del rumen antes de ser hidrolizados.

Una vez estos ácidos esenciales llegan al riego sanguíneo siguen el proceso común de transporte mediante lipoproteínas específicas para desempeñar sus funciones. La función más importante que desempeñan estos dos ácidos (linolénico C18:3 y linoleico C18:2) es la de servir de precursores para la formación de AG de las series  $\Omega$ -3 y  $\Omega$ -6. El proceso de síntesis para ambas series es similar al de la serie 9. A partir del ácido precursor se sintetizan en el retículo endoplasmático liso de las células hepáticas, mamarias y adipocitos toda la serie de ácidos mediante enzimas elongasas, que añaden pares de carbonos hidrogenados, y desaturasas específicas, que introducen la insaturación. Dado que todas las series se realizan en el mismo lugar, de forma simultánea y continua, estas comparten el sistema enzimático, mostrando las desaturasas mayor afinidad a los ácidos en orden  $\Omega$  3 >  $\Omega$  6 >  $\Omega$  9 (Mataix *et al.*, 2010). Si se requiere de un ácido graso concreto este se saca del proceso para cumplir su función, pudiendo volver cualquier ácido perteneciente a una serie para retomar el proceso de elongación y desaturación.

En el siguiente diagrama se muestra la síntesis de los ácidos grasos pertenecientes a cada serie, común a rumiantes y humanos.

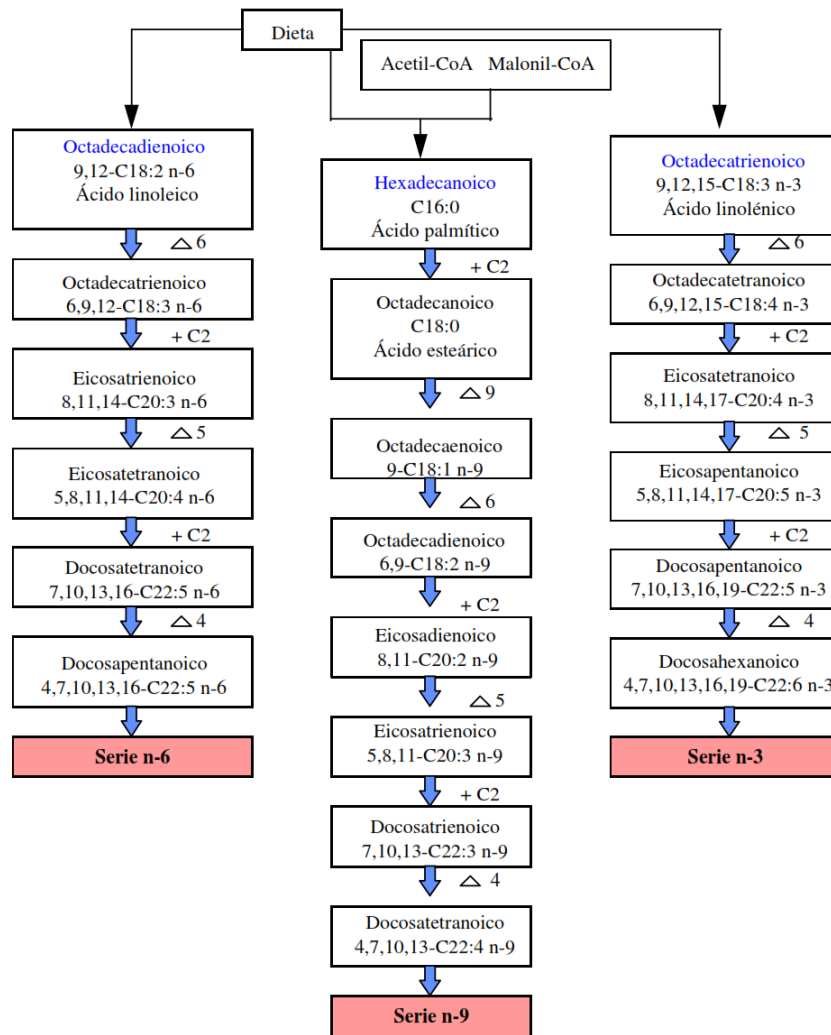


Figura 19.- Diagrama de ácidos grasos de las series 3, 6 y 9 (Beriaín *et al.*, 2009).

Un hecho particular de los rumiantes es que su enzima  $\Delta 9$ -desaturasa, presente en el retículo endoplasmático liso de los adipocitos y las células mamarias, introduce un doble enlace en el abundante ácido vaccénico (C18:1, trans- $\Delta 11$ ), procedente del rumen, para sintetizar ácido ruménico (C18:1, cis,trans- $\Delta 9$ ,  $\Delta 11$ ), uno de los 28 isómeros del ácido linolénico pertenecientes a los ácidos linoleicos conjugados (CLA) y que aporta importantes beneficios para la salud. Dado que nosotros, al igual que todos los mamíferos, tenemos integrada dicha enzima en el sistema enzimático de síntesis de la serie 9, se presupone que también podemos metabolizar el ácido vaccénico, lo que significaría que este ácido nos aportaría efectos beneficiosos pese a ser un isómero trans (Sanhuesa *et al.*, 2002). Este caso se encuentra actualmente bajo estudio.

## 2.4. El lino y el ácido linoleico conjugado (CLA)

En el presente trabajo se añadieron a las dietas de los rumiantes semillas de lino y compuesto granulado con CLA como fuente de ácidos grasos linoléico (precursor de la serie  $\Omega$ -3) y ácido linoleico conjugado (CLA) respectivamente para comprobar su efecto sobre la actividad enzimática de los adipocitos.

### 2.4.1. El lino

El lino es una semilla que aporta diversos ácidos grasos poliinsaturados, siendo el ácido linoléico su mayor componente. Dado que este AG además de ser un precursor de la serie  $\Omega$ -3 es un ácido de disponibilidad limitada por su ingesta con la alimentación, el presente ensayo pretende estudiar si un incremento del contenido de este ácido graso, mediante la semilla de lino, en la alimentación del rumiante puede alterar de alguna forma la actividad de las enzimas implicadas en la lipogénesis de los adipocitos blancos (G3PDH, FAS, ICDH y G6PDH). A continuación se presenta una tabla mostrando el elevado contenido proporcional del ácido linoléico con respecto a otros ácidos poliinsaturados dentro de la semilla de lino.

Tabla 2.- Composición en ácidos grasos de las semillas de lino (Belitz *et al.*, 1997).

	Composición %
Ácido palmítico (16:0)	6.5
Ácido esteárico (18:0)	3.5
Ácido oleico (18:1)	18
Ácido linoleico (18:2)	14
Ácido linolénico (18:3)	58

Debido al reducido tamaño de las semillas de lino (2,5 – 6 mm), estas resisten bien el proceso de rumia sin ser trituradas y su envuelta mucilaginosa reduce en gran medida la degradación del rumen. Las semillas son digeridas en el abomaso de forma que el ácido linolénico es absorbido, sin sufrir degradación microbiana, directamente en el intestino delgado e incorporado al flujo sanguíneo, lo que permite un máximo aprovechamiento del contenido de sus ácidos grasos y del linolénico en particular.

#### 2.4.1.1. Efecto del ácido linolénico sobre la salud humana

Aunque los efectos biológicamente beneficiosos para la salud humana procedentes del consumo del  $\Omega$ -3 están ya muy documentados, debe comprenderse que estos se derivan más por mantener en el organismo una correcta proporción entre los ácidos de las series 3 y 6, siendo la proporción ideal de 1:4 respectivamente, que por aumentar simplemente la ingesta del ácido en cuestión (Waliszewski *et al.*, 2006). Esto se debe a que en la sociedad actual muchas de las dietas occidentales presentan una proporción  $\Omega$ -3/ $\Omega$ -6 de hasta 1:20. Es por ello que resulta interesante también incrementar el contenido de ácidos  $\Omega$ -3 en los tejidos de los rumiantes, ya que la carne de vacuno presenta una elevada cantidad de ácidos grasos saturados y una mayor relación  $\Omega$ -6/ $\Omega$ -3, lo que hace que sea percibido como un alimento poco saludable para el consumidor.

Una de las propiedades que se le confieren a la serie  $\Omega$ -3 es la antiinflamatoria, debido a que el ácido araquidónico (C20:4,  $\Omega$ -6) participa en las primeras etapas de los procesos inflamatorios y los ácidos eicosapentaenoico (C20:5, EPA) y docosahexaenoico (C22:6, DHA), al ser de la serie 3, suprimen su metabolismo. Es por tanto objeto de estudio en el tratamiento de la artritis reumatoide (enfermedad sistémica autoinmune que provoca la inflamación crónica de las articulaciones y el deterioro de los tejidos) (Valenzuela *et al.*, 2011).

Se ha demostrado también que su consumo reduce la biosíntesis de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y de triglicéridos en el hígado, sin alterar la biosíntesis de lipoproteínas de alta densidad (HDL), lo que disminuye el colesterol plasmático y los niveles de triglicéridos en sangre. Puesto que la aterosclerosis es una enfermedad cardiovascular cuyos componentes principales son la inflamación y la dislipidemia (triglicéridos y colesterol elevados en sangre), los ácidos grasos  $\Omega$ -3 se presentan como agentes cardioprotectores muy potentes que dificultan el desarrollo de esta enfermedad, así como otras muchas relacionadas también con el sistema cardiovascular (Valenzuela *et al.*, 2011). Actualmente se sigue investigando su papel como probable agente neuroprotector de lesiones isquémicas y su papel en la inducción de la apoptosis de tumores cancerosos.

#### 2.4.1.2. Efecto de la utilización de lino en las dietas de cebo de bovinos

Actualmente existe un interés por aumentar el contenido de ácidos grasos n-3 por los efectos beneficiosos para la salud humana comentados en el apartado anterior. Existen diversos estudios realizados para intentar aumentar el contenido de estos ácidos grasos en la carne de los rumiantes. A continuación se indican algunos de los estudios en los que se empleó la adición de lino para aumentar el contenido de n-3.

Kim *et al.* (2004) en dos ensayos independientes llevados a cabo en Corea estudiaron el efecto de las semillas de lino sobre los depósitos grasos de veintiún machos (ensayo 1) y quince hembras (ensayo 2) de la raza bovina Korean Hanwoo. En cada ensayo se formaron tres grupos a los que se suministraron dietas con diferente contenido en semillas de lino enteras (0, 10 y 15% sobre materia fresca del pienso base). Se observó un incremento relacional muy significativo del contenido de ácido linolénico en los tejidos subcutáneo ( $p < 0,005$ ) e intramuscular ( $p < 0,01$ ), siendo mayor en el primero y en machos. Los niveles de ácido linoleico no se vieron alterados para ningún depósito ni sexo.



Raes *et al.* (2004), en una experiencia llevada a cabo con dieciocho novillos belgas azules, estudiaron los efectos de la inclusión de semillas de lino sobre el perfil lipídico en el tejido subcutáneo e intramuscular del músculo *longissimus thoracis*. Se prepararon tres dietas con una base similar de contenido en ácido linoleico ( $\Omega$ -6) y se les añadieron semillas de lino como fuente rica en ácido linolénico ( $\Omega$ -3); una de las dietas era control (sin aporte de lino), otra con semillas de lino extruidas (EL, 17.7% sobre materia fresca del pienso base) y la tercera con semillas de lino trituradas (CL, 6.8% sobre materia fresca del pienso base), siendo equivalente el contenido en ácido linolénico de estas dos últimas dietas. Se observó un incremento significativo en el contenido de ácidos propios de la serie  $\Omega$ -3 en el tejido subcutáneo, reduciéndose la proporción  $\Omega$ -6/ $\Omega$ -3, pero no sucedió así en el intramuscular. Por otra parte el contenido en CLA no varió en ningún tejido para ninguna dieta.

En el trabajo de Sarriés *et al.* (2009), realizado por el grupo de investigación de Producción y Tecnología de la carne de la Universidad Pública de Navarra, estudiaron el efecto de la adición de lino y vitamina E sobre el perfil de ácidos grasos en los terneros de raza pirenaica. Para realizarla se utilizaron cuarenta y seis terneros pirenaicos repartidos en tres lotes con dietas diferentes, un lote control con pienso base sin adiciones de ningún tipo, otro lote al que se añadió un 5% de semillas de lino sobre la materia fresca del pienso, y el tercero adicionado al pienso un 5% de semillas de lino igual que el anterior y 200 UI/kg de vitamina E sobre masa seca. Las muestras se tomaron del músculo *longissimus dorsi* y los resultados mostraron un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en la deposición de ácido graso linolénico en el tejido graso intramuscular.

#### 2.4.2. El ácido linoleico conjugado (CLA)

El ácido linoleico, precursor de la serie  $\Omega$ -6, puede conformar hasta 28 isómeros químicos, denominados ácidos linoleicos conjugados (CLA), mediante la deslocalización

de sus dos dobles enlaces y la alternancia de las formas cis y trans en estos. El objetivo del presente trabajo con la adición de CLA en la dieta de los terneros es estudiar si ello conlleva una alteración en la actividad de las enzimas lipogénicas de los adipocitos blancos, es decir las enzimas G3PDH, FAS, ICDH y G6PDH.

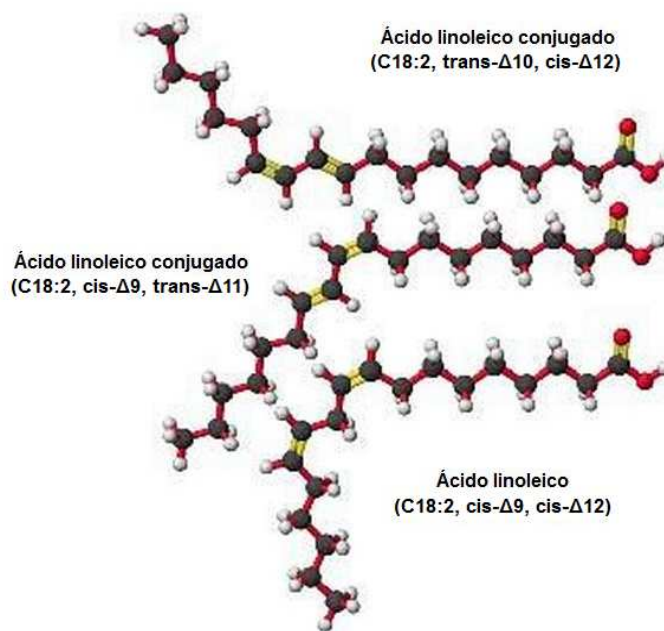


Figura 20.- Ácido linoleico y dos isómeros CLA.

Para llevar a cabo esta experiencia se empleó como fuente de ácido linoleico conjugado, para la dieta de los rumiantes, una formulación de varios isómeros CLA de Lutrell<sup>®</sup> pure por adición directa al pienso. Para evitar su degradación en el rumen se suministró como compuesto granulado y protegido por recubrimiento de metil ester y grasa. La digestión se produce en el abomaso, absorbiéndose el CLA por el intestino delgado sin modificarse. En cualquier caso, de dichos isómeros linoleicos el predominante en la leche y los tejidos de rumiantes siempre es el ácido ruménico (C18:2, cis-Δ9, trans-Δ11) con proporciones de entre el 80 – 90% sobre el total de CLAs presentes, lo que es debido a su síntesis en el REL mediante la conversión del AG vaccénico ruminal y su absorción directa del rumen. En menor cantidades se encuentran otros sintetizados en el rumen también como los (C18:2, trans-Δ7, cis-Δ9) y (C18:2, trans-Δ10, cis- Δ12) (Valenzuela *et al.*, 2005). Muchos de estos isómeros, como

el ácido ruménico, no participan en la síntesis de ácidos grasos de la serie  $\Omega$ -6 pero su presencia en el organismo conlleva efectos beneficiosos para la salud. Es por esto que resulta también interesante, al igual que sucedía con el ácido linolénico del lino, incrementar el contenido de CLA en los tejidos de los rumiantes, ya que el consumo de su carne aportaría más cantidad de estos CLA a los humanos con los efectos beneficiosos que se derivan.

#### 2.4.2.1. Efecto del ácido linoleico conjugado sobre la salud humana

Estudios científicos ratificados demostraron que la ingesta de alimentos con alto contenido en CLA conlleva una reducción de los niveles de colesterol en sangre. Esto es debido a que provoca un aumento de la degradación del colesterol, transportado por las lipoproteínas colesterol-HDL, en el hígado y su excreción en forma de bilis. De esta forma se reducen los niveles de colesterol total en sangre y por tanto la concentración de lipoproteínas Colesterol-LDL también disminuye (Aguilera *et al.*, 2001). El estudio de esta propiedad se encuentra actualmente orientado hacia el tratamiento de la antiarteriosclerosis en medicina.

Actualmente se llevan a cabo investigaciones para determinar el efecto anticarcinogénico de las moléculas de CLA en los seres vivos, considerándolo actualmente como un posible inductor de apoptosis. Estudios actuales *in vitro* han demostrado su efectividad como agentes inhibidores sobre el crecimiento de células tumorales e incluso su papel en la apoptosis. Otros ensayos *in vivo* con cobayas han demostrado que inhiben la formación de lesiones premalignas, fruto de agentes carcinogénicos o carcinomas externos (Valenzuela *et al.*, 2005).

También hay estudios orientados hacia su efecto sobre el sistema inmune, la deposición o reducción de la grasa corporal en adultos pero no han arrojado datos significativamente concluyentes hasta la fecha. Otros beneficios derivados del

consumo de CLA como es el aumento de la sensibilidad a la insulina, en diabéticos tipo 2, que reduce los niveles de glucosa en sangre está confirmado pero se desconoce aún los mecanismos por los que sucede.

#### **2.4.2.2. Efecto de la utilización de CLA en las dietas de cebo de bovinos**

Actualmente existe un enorme interés por los isómeros del CLA por los efectos beneficiosos para la salud humana comentados en el apartado anterior. Esto explica los numerosos estudios realizados para intentar aumentar el contenido de CLA tanto de la carne como de la leche de los rumiantes. A continuación se indican algunos de los estudios realizados hasta el momento.

En la universidad de Iowa (USA) se llevó a cabo una experiencia similar a la del presente trabajo con treinta novillos de cruce continental alimentados con cuatro dietas suplementadas con sales cálcicas de CLA. Los contenidos en CLA de dichas dietas fueron en 0, 1 y 2.5%. El efecto de dichas dietas se tradujo en un menor consumo de alimento y ganancia media diaria (GMD) de los novillos alimentados con CLA frente a los de control. Los resultados demostraron que los novillos alimentados con CLA tuvieron un mayor desarrollo del tejido magro frente a uno menor del tejido adiposo, aumentándose el contenido de CLA en ambos tejidos de forma significativa ( $p < 0,05$ ) y mejorando el perfil lipídico. No se vieron afectadas las propiedades organolépticas de la carne como la jugosidad, sabor, etc (Gassman *et al.*, 2001).

Un ensayo llevado a cabo en Atenas (USA) estudió el efecto que tenía suplementar distintas fuentes ricas en CLA (aceite de maíz y sales con CLA protegido del rumen) en las dietas de treinta y seis vaquillas cruzadas Angus x Hereford sobre su tejido adiposo. Se formaron tres grupos de doce terneros con distintas dietas, uno control alimentado con pienso base sin suplemento, otro con un suplemento en el pienso de 4% de aceite de maíz sobre la materia fresca, y otro el pienso base con un 2% de sales de CLA protegidas a la biohidrogenación del rumen. Ambas dietas enriquecidas tuvieron efecto significativo ( $p < 0,05$ ), siendo el enriquecimiento de CLA

protegido más efectivo que el aceite. Así mismo, y para ambos suplementos, el tejido subcutáneo mostró un mayor incremento de ácidos linoleicos conjugados que el intramuscular (Gillis *et al.*, 2006).

# OBJETIVO

### **3. OBJETIVO**

El presente trabajo tiene por objetivo estudiar el efecto de la adición de la semilla de lino, rica en ácidos grasos  $\Omega$ -3, y el ácido linoléico conjugado (CLA), sobre la actividad de las enzimas lipogénicas relacionadas con el engrasamiento en terneros frisonos.

Dentro de este objetivo general, también se pretenden estudiar las diferencias existentes entre los diferentes depósitos grasos. Para ello, se han considerado el depósito subcutáneo, muy activo metabólicamente, y el depósito intramuscular, con un desarrollo más tardío.

# MATERIAL Y MÉTODOS



## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL ANIMAL

#### 4.1.1. Animales y dietas

Para la realización de esta experiencia se utilizaron 48 terneros de raza frisona procedentes de la granja Kavisa de Tauste (Zaragoza), con un peso medio de  $125,7 \pm 16,54$  kg y  $115,0 \pm 19,05$  días de vida. A su llegada (4/11/2009) fueron alojados en la nave experimental del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) de Aragón.



Figura 21.- Los terneros en el CITA.

Durante el periodo de adaptación se les alimentó con paja y pienso de arranque B11 de la marca ALENDI. Todos los terneros fueron vacunados para la lengua azul y las enfermedades virales IBR, DVD y PI3. Durante esta fase se procedió al preparado de las 4 dietas experimentales, fabricadas por ARS ALENDI (Huesca) y que difieren en el porcentaje de lino y/o CLA añadido:

- Dieta Control: Pienso control
- Dieta Lino: Pienso enriquecido con 10% de semilla de lino.
- Dieta CLA: Pienso enriquecido con 2% de CLA.
- Dieta Lino+CLA: Pienso enriquecido con 10% de semilla de lino y 2% de CLA

El lino empleado en las dietas era semilla entera y el CLA isómeros del ácido graso (C18:2) con un contenido del 10% de  $\Omega$ -6 protegido de la degradación ruminal (Lutrell<sup>®</sup> pure). Las cuatro dietas eran isoenergéticas e isoproteicas y se formularon con una suplementación de 110 mg de vitamina E/kg de pienso. A continuación se muestra la tabla con la composición de las dietas.

Tabla 3.- Ingredientes y composición química de las dietas experimentales.

	<b>Control</b>	<b>Lino</b>	<b>CLA</b>	<b>Lino+CLA</b>
<b><i>Ingredientes (% MF)</i></b>				
<b>Harina de maíz</b>	40,00	40,00	40,00	35,00
<b>Harina de cebada</b>	21,58	18,77	21,65	19,79
<b>Harina de soja</b>	15,09	13,21	15,07	13,10
<b>Gluten de maíz</b>	12,00	5,00	12,00	6,00
<b>Pulpa de remolacha</b>	4,00	9,69	4,00	12,00
<b>Semillas de lino (enteras)</b>		10,00		10,00
<b>CLA (protegido del rumen)</b>			2,00	2,00
<b>Aceite de palma</b>	4,98	1,16	2,93	

<b>Carbonato de calcio</b>	1,23	1,05	1,23	0,99
<b>Sal</b>	0,20	0,20	0,20	0,20
<b>Bicarbonato de sodio</b>	0,50	0,50	0,50	0,50
<b>Oxido de magnesio</b>	0,20	0,20	0,20	0,20
<b>Minerales y vitaminas premix<sup>1</sup></b>	0,20	0,20	0,20	0,20
<b>Vitamina E<sup>2</sup></b>	0,02	0,02	0,02	0,02

**Composición química (% MS)**

<b>Proteína bruta</b>	16,6	17,6	16,6	16,8
<b>Fibra neutro detergente</b>	26,7	27,3	23,6	28,7
<b>Fibra ácido detergente</b>	6,1	8,2	5,9	8,2
<b>Extracto Etéreo</b>	9,7	5,1	9,1	5,2
<b>Cenizas</b>	6,8	6,4	7,1	7,2
<b>EM (Mcal/kg)</b>	3,38	3,33	3,31	3,35

<sup>1</sup> Contenido por Kg: Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 250g, FHT 150 mg, MgO 50g, Zn20gr, Mn 15g, Fe 2.5 g, Cu 1 g, Co 0.25, I 0.25 g, Se 0.1 g, vitamina E 5mg, vitamina A 3500000 UI, vitamina D3 750000 UI.

<sup>2</sup> Contiene un 50% de  $\alpha$ -tocoferol.

El 27 de enero de 2010 se inició el periodo experimental, formando 4 lotes de 12 animales distribuidos al azar por peso. La alimentación por lotes se componía de paja de cebada y el pienso específico de su dieta. El pienso se ofrecía *ad libitum*, controlando lo suministrado y lo desechado por el animal, también se les realizaban pesadas cada quince días a fin de poder determinar los parámetros productivos.

### 4.1.2. Sacrificio de los terneros y toma de muestras<sup>1</sup>

Se estableció el peso de 450 kg/ternero como criterio para fijar el momento del sacrificio. Dicho sacrificio se realizó en el matadero frigorífico de Mercazaragoza, tras el faenado se tomaron de cada ternero dos muestras (5,5 g/muestra) del *Longissimus dorsi*; intramuscular y subcutáneo, de la media canal derecha, a la altura de la 10ª costilla, para el estudio de los adipocitos y enzimas lipogénicas. De las muestras tomadas, una pequeña parte (0,5 g), destinada al estudio de los adipocitos, se guardó en tubos con 10 mL de solución Tirode (0,15 M NaCl; 6 mM KCl; 2 mM CaCl<sub>2</sub>; 6 mM Glucosa; 2 mM NaHCO<sub>3</sub>), ajustado a un pH de 7,62, en termos con agua a 39°C (temperatura fisiológica en ganado ovino para evitar la lisis de los adipocitos); el resto (5 g/muestra) se transportaron congeladas en nitrógeno líquido (-196 °C) hasta su llegada al laboratorio donde se guardaron en el congelador a -80 °C, no rompiendo en ningún momento la cadena de frío.

El día después del sacrificio se realizó la muestra de datos de las canales, clasificación por conformación, engrasamiento de las canales, peso canal oreada, etc. Con todos los datos recogidos se pudieron determinar los parámetros productivos diferenciados por lotes, que se presentan a continuación.

---

<sup>1</sup> En este apartado de Material y Métodos se incorporan resultados generados por otros autores sobre las características de engrasamiento y de calidad de la canal que van a ser necesarios para la determinación de las actividades enzimáticas lipogénicas y para su posterior discusión

Tabla 4.- Parámetros productivos, clasificación de la canal y pH último de la carne  
(Adaptado de Alberti *et al.*, 2011).

	Control	Lino	CLA	Lino+CLA	EE	sig
<b>Peso inicial, kg</b>	239,5	238,9	240,7	240,1	5,51	ns
<b>Peso sacrificio, kg</b>	450,5	460,4	454,5	468,8	9,79	ns
<b>GMD, kg/d</b>	1,72	1,78	1,76	1,84	0,05	ns
<b>Edad sacrificio, días</b>	320,4	326,3	324,1	318,3	5,97	ns
<b>Peso canal oreada, kg</b>	233,9	237,8	237,2	249,5	5,82	ns
<b>Rto. Canal o.,%</b>	51,9	51,65	52,2	53,2	0,38	ns
<b>Conformación</b>	O/O-	O	O/O-	O/O-	-	-
<b>Nota conformación</b>	4,2	4,0	4,4	4,8	0,26	ns
<b>Engrasamiento</b>	2+	2/2+	2+	2+	-	-
<b>Nota engrasamiento</b>	6,0	5,6	6,2	5,8	0,16	ns
<b>pH 24 h</b>	5,6	5,5	5,5	5,5	0,04	ns
<b>Consumo pienso; kg</b>	8,3	8,8	8,7	8,9	0,34	ns
<b>IC, kg pienso/kg peso vivo</b>	4,9	5,0	5,0	4,9	-	-

Error promedio (E.E.; Error medio de los errores de los lotes), No significativo (ns; nivel de significación para las diferencias entre lotes,  $p>0,05$ ).

El pH de 5,5 analizado a las 24 horas tras el sacrificio confirmó que los animales no sufrieron estrés previo a su muerte, por lo que las muestras no se verían afectadas

por este factor. Así mismo, el índice de conversión (IC) de 5 mostró una buena eficiencia de conversión de estas dietas para este tipo de animales.

Además de los parámetros productivos referentes al ternero, se realizó el estudio de la 10ª costilla extraída para determinar su composición. A continuación se presentan los datos obtenidos.

Tabla 5.- Características y composición de la 10ª costilla (Adaptado de Gómez *et al.*, 2012).

	Control	Lino	CLA	Lino+CLA	E.E.	sig
<b>Peso 10ª costilla, g</b>	1476	1471	1459	1553	48,0	ns
<b>Composición tejido 10ª costilla %</b>						
<b>Grasa subcutánea</b>	4,0	3,3	3,6	3,3	0,36	ns
<b>Grasa intermuscular</b>	14,4	14,0	15,2	13,9	0,62	ns
<b>Músculo</b>	58,4	59,5	57,5	59,7	0,96	ns
<b>Hueso</b>	22,3	22,4	22,9	22,4	0,76	ns

Error promedio (E.E.; Error medio de los errores de los lotes), No significativo (ns; nivel de significación para las diferencias entre lotes,  $p > 0,05$ ).

## 4.2. MEDIDA DEL TAMAÑO Y NÚMERO DE ADIPOCITOS<sup>2</sup>

### 4.2.1. Medida del tamaño de los adipocitos

Para el estudio del tamaño y número de los adipocitos se empleó la técnica de digestión de las muestras con colagenasa (Robdell *et al.*, 1964). La matriz del tejido conjuntivo que rodea a los adipocitos es digerida por la colagenasa, de esta forma quedan libres y pueden ser observados al microscopio.

Se realizaron preparaciones *in vitro* y se digitalizaron las imágenes seleccionadas en el microscopio. Posteriormente se utilizó la técnica de análisis de imagen (Arana *et al.*, 2005) con el programa informático Image-Pro Plus 5.1 para el estudio del diámetro de los adipocitos. Se determinó el diámetro medio de los adipocitos para cada ternero y depósito. A continuación se presentan las medias de los diámetros diferenciados por lotes.

Tabla 6.- Medias del diámetro de los adipocitos por depósitos y lotes (Adaptado de Gómez *et al.*, 2012).

	C	L	CLA	L+CLA	E.E.	Sig
<b>Diámetro adipocitos subcutáneos (µm)</b>	160,0	160,0	159,7	169,4	6,85	ns
<b>Diámetro adipocitos intramuscular (µm)</b>	45,6	48,1	43,6	48,8	2,94	ns

Dietas; Control (C; animales alimentados con dieta control), Lino (L; animales alimentados con 10% de lino en la dieta), CLA (animales alimentados con 2% de CLA en

<sup>2</sup> También en este apartado se incorporan resultados previos generados por otros autores sobre el tamaño y número de adipocitos que son esenciales para la determinación de las actividades enzimáticas lipogénicas y para su posterior discusión

la dieta), Lino + CLA (L+CLA; animales alimentados con 10% de lino y 2% de CLA), Error promedio (E.E.; desviación estándar de las medias de todas las muestras), No significativo (ns; nivel de significación para las diferencias entre lotes,  $p > 0,05$ ).

#### 4.2.2. Medida del número de adipocitos

A partir el tamaño de los adipocitos, los datos de la riqueza en lípidos de su grasa (Soxhlet) y la densidad lipídica ( $d=0,915$  g/ml) (Soret *et al.*, 1998), se calcula el número de adipocitos para cada ternero y depósito graso estudiado.

$$\text{Número de adipocitos} = \frac{\text{Peso del depósito} \cdot \text{Soxhlet} (\%)}{\text{Volumen medio adipocitos} \cdot \text{densidad lipídica}}$$

El contenido graso de los tejidos (Soxhlet) se considera del 65% para el depósito subcutáneo y del 2,8% para el depósito intramuscular (Eguinoa *et al.*, 2003). A continuación se muestra el recuento medio del número de adipocitos por lotes.

Tabla 7.- Número de adipocitos por gramo de tejido adiposo

	C	L	CLA	L+CLA	E.E.	sig
<b>Número adipocitos subcutáneo</b>	372561	379085	364615	333605	51989,1	ns
<b>Número adipocitos intramuscular</b>	810084	738508	823076	684539	149700,1	ns

Dietas; Control (C; animales alimentados con dieta control), Lino (L; animales alimentados con 10% de lino en la dieta), CLA (animales alimentados con 2% de CLA en la dieta), Lino + CLA (L+CLA; animales alimentados con 10% de lino y 2% de CLA), Error



promedio (E.E.; desviación estándar de las medias de todas las muestras), No significativo (ns; nivel de significación para las diferencias entre lotes,  $p > 0,05$ ).

### **4.3. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA LIPOGÉNICA**

#### **4.3.1. Medida del rendimiento enzimático**

Se precisa de una homogeneización previa de la muestra antes de poder determinar el rendimiento de la actividad lipogénica. Dicha homogeneización debe realizarse a baja temperatura, en hielo, para ralentizar el metabolismo celular y la consecuente desnaturalización de las enzimas. En el momento del análisis, la muestra disuelta con los sustratos sí que debe encontrarse a 37 °C para asegurar la máxima actividad metabólica. El rendimiento de la actividad enzimática se cuantifica por espectrofotometría para las siguientes enzimas; Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH), Sintetasa de Ácidos Grasos (FAS), Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y NADP-Isocitrato deshidrogenasa (ICDH).

El equipo empleado es un espectrofotómetro SPECORD de doble haz, utilizando el programa informático winASPECT y el proceso descrito por Soret *et al.* (1998) y que viene detallado en el anexo I.



Figura 22.- El espectrofotómetro y el programa WinASPECT.

#### 4.3.2. Estudio de la actividad enzimática lipogénica

La actividad enzimática lipogénica, para cada enzima y muestra, se calcula a partir de su actividad y número de adipocitos por gramo de muestra. Esta se expresa en  $\text{nmol} / 10^6$  adipocitos /min.

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{(\text{actividad} / \text{g}) \cdot 1.000}{\text{n}^\circ \text{ adipocitos} / \text{g}} \cdot 10^6 \text{ (nmol}/10^6 \text{ adipocitos/min)}$$

La actividad por gramo de muestra se calcula a partir de la lectura obtenida por espectrofotometría y la cantidad de muestra empleada.

#### 4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un modelo estadístico de análisis de varianza, en el que se tiene en cuenta el efecto lote, depósito graso y la interacción lote x depósito.

$$X_{ijk} = \mu + L_i + D_j + (L \cdot D)_{ij} + e_{ijk}$$

donde:

$X_{ijk}$  : Valores para cada individuo de la actividad de las enzimas lipogénicas.

$\mu$  : Media de la población considerada.

$L$  : Efecto fijo debido al tipo de lote (i=1 Control, i=2 Lino 10%, i=3 CLA 2%, i=4 Lino 10% + CLA 2%).

$D$  : Efecto fijo debido al tipo de depósito graso (j=1 SC, j=2 IM).

$(L \cdot D)_{ij}$  : Efecto de la interacción Lote x Depósito Graso.

$e_{ijk}$  : Error residual aleatorio.

El cotejado de los datos estadísticos, a fin de determinar la efectividad o no de las dietas sobre la actividad enzimática, se realizó mediante un contraste de hipótesis bilateral ( $\theta \neq \theta_0$ ) entre los lotes y según el depósito para cada enzima estudiada, con un nivel de significación del 5%. Se establecieron la siguiente hipótesis nula ( $H_0$ ) e hipótesis alternativa ( $H_1$ ).

$H_0: \mu_X = \mu_Y$       Independencia: No existe relación entre la dieta suministrada y la actividad enzimática lipogénica.

H1:  $\mu_x \neq \mu_y$       Dependencia: Existe una relación entre la dieta suministrada y la actividad enzimática lipogénica.

Los efectos anteriormente citados de los factores Lote, Depósito e interacción Lote x Depósito son también analizados estadísticamente mediante un contraste de hipótesis bilateral, con la determinación de su error cuadrático ( $R^2$ ), a fin de determinar, al 5% de significación, la influencia que ejercen sobre los resultados.

El programa informático empleado para todos los análisis estadísticos fue SPSS Statistics 19.0.

# RESULTADOS

## 5. RESULTADOS

Tras el análisis estadístico de los valores de la actividad enzimática lipogénica realizada para las cuatro enzimas estudiadas, G3PDH, FAS, ICDH y G6PDH, se obtuvieron resultados sobre el grado de influencia que han podido tener los factores lote, depósito y la interacción lote x depósito, sobre la de actividad enzimática de las cuatro enzimas lipogénicas estudiadas.

### 5.1. Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH)

En la Tabla 8 se muestran los niveles de significación de los factores lote, depósito y lote x depósito para la actividad de la enzima G3PDH.

Tabla 8.- Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito graso (D), lote x depósito (LxD) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), para la actividad de la enzima lipogénica glicerol 3 fosfato deshidrogenasa G3PDH.

	Lote	Depósito	Lote x Depósito	$R^2$
<b>G3PDH</b>	0,113	0,008	0,398	0,158

Se puede observar que la influencia del factor lote no es significativa ( $p>0,05$ ) para esta enzima lo que establece una independencia entre la alimentación suministrada a los terneros y los valores de actividad de la enzima G3PDH. No pasa así con el factor depósito, donde el tipo de tejido adiposo marca una diferencia significativa ( $p<0,01$ ). Por otra parte, la interacción de ambos factores, lote x depósito, no ha sido significativa ( $p>0,05$ ).

En la Figura 23 se muestran los resultados obtenidos de la actividad media y desviación típica para esta enzima. Puede observarse de forma gráfica la significación

estadística existente ( $p < 0,05$ ) entre depósitos indicada en la Tabla 8, de manera que el tejido subcutáneo presenta mayor actividad que el intramuscular ( $p = 0,008$ ).

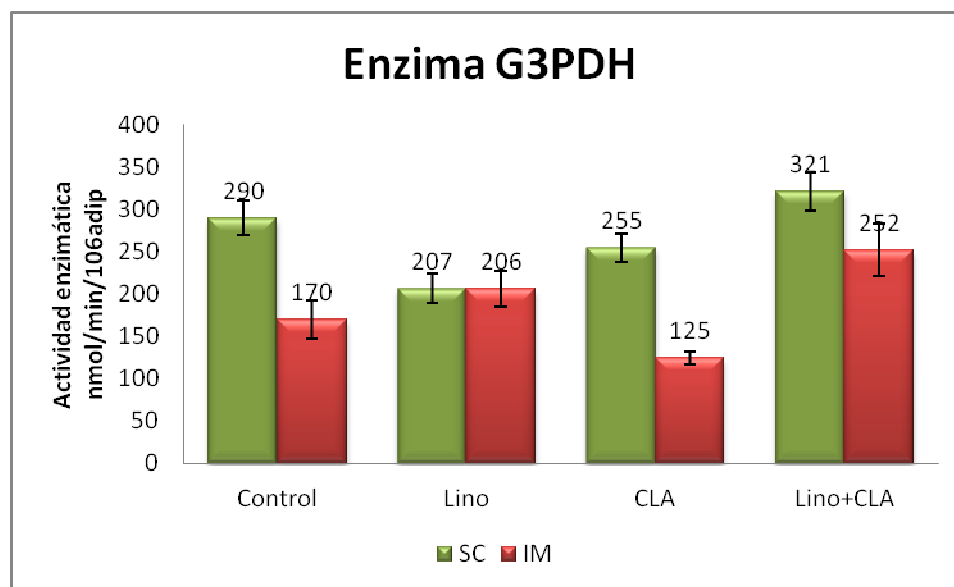


Figura 23.- Valores medios y desviación típica de la actividad enzimática lipogénica de la enzima G3PDH en función de los depósitos grasos, subcutáneo e intramuscular, para cada lote de dieta realizado; Control, Lino, CLA y Lino+CLA.

## 5.2. Sintetasa de ácidos grasos (FAS)

Los resultados estadísticos de la influencia de los factores lote, depósito y lote x depósito para la enzima FAS se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9.- Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito graso (D), lote x depósito (LxD) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), para la actividad de la enzima lipogénica sintetasa de ácidos grasos FAS.

	Lote	Depósito	Lote x Depósito	$R^2$
FAS	0,584	0,000	0,476	0,217

La significación del efecto lote presenta un p-valor muy elevado ( $p > 0,05$ ), de lo que se deduce que la alimentación llevada por los terneros no ha influido significativamente en la actividad enzimática. Por otra parte el efecto depósito muestra una gran significación ( $p < 0,001$ ). La interacción entre ambos factores, lote x depósito determina que no existe una influencia estadísticamente evidente y por lo tanto, no se ha visto influenciada la actividad de esta enzima en el presente ensayo.

En la Figura 24 se muestran los resultados obtenidos de actividad media y desviación típica para esta enzima. Se observa en la gráfica la significación ( $p < 0,05$ ) entre depósitos indicada en la Tabla 9, con una mayor actividad del tejido graso subcutáneo frente al intramuscular ( $p = 0,000$ ).

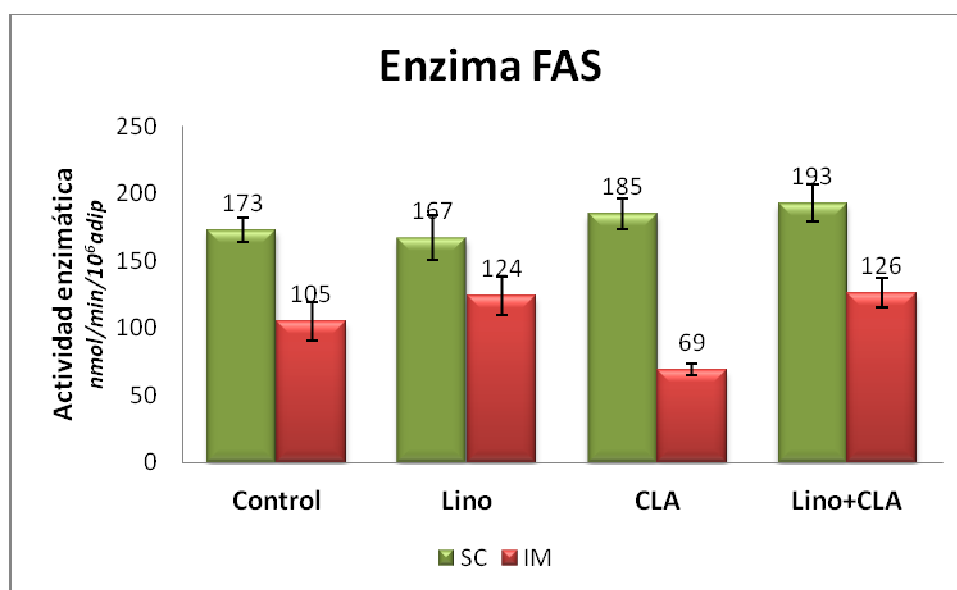


Figura 24.- Valores medios y desviación típica de la actividad enzimática lipogénica de la enzima FAS en función de los depósitos grasos, subcutáneo e intramuscular, para cada lote de dieta realizado; Control, Lino, CLA y Lino+CLA.



### 5.3. Isocitrato deshidrogenasa (ICDH)

En la siguiente tabla se muestran los resultados estadísticos de la influencia de los factores lote, depósito y lote x depósito para la enzima ICDH.

Tabla 10.- Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito graso (D), lote x depósito (LxD) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), para la actividad de la enzima lipogénica Isocitrato deshidrogenasa (ICDH).

	Lote	Depósito	Lote x Depósito	$R^2$
<b>ICDH</b>	0,796	0,012	0,952	0,083

El efecto lote no fue significativo ( $p > 0,05$ ) lo que indica que las dietas no han influido sobre esta enzima. Por otra parte, el depósito ha influido significativamente ( $p < 0,05$ ) en la actividad de la isocitrato deshidrogenasa, que a su vez no se manifestó una interacción significativa ( $p > 0,05$ ) en la interacción LxD.

En la Figura 25 se muestran los resultados obtenidos de actividad media y desviación típica para esta enzima. Se aprecia una actividad enzimática mayor en el tejido subcutáneo frente al intramuscular ( $p = 0,012$ ), lo que corrobora el efecto significativo del depósito (Tabla 10).

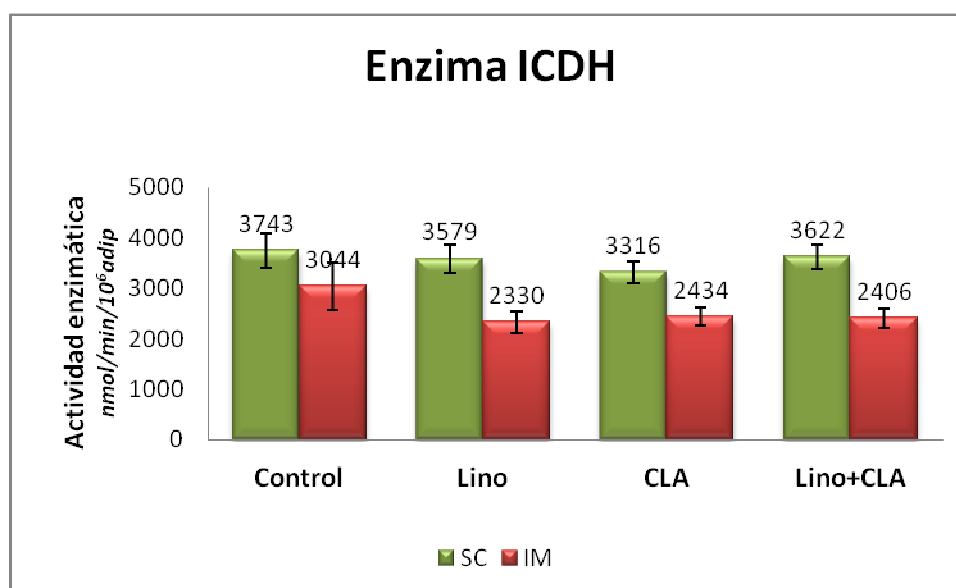


Figura 25.- Valores medios y desviación típica de la actividad enzimática lipogénica de la enzima ICDH en función de los depósitos grasos, subcutáneo e intramuscular, para cada lote de dieta realizado; Control, Lino, CLA y Lino+CLA.

#### 5.4. Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH)

En la siguiente tabla se muestran los resultados estadísticos de la influencia de los factores lote, depósito y lote x depósito para la enzima G6PDH.

Tabla 11.- Niveles de significación de los efectos lote (L), depósito graso (D), lote x depósito (LxD) y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), para la actividad de la enzima lipogénica glucosa 6 fosfato deshidrogenasa G6PDH.

	Lote	Depósito	Lote x Depósito	$R^2$
<b>G6PDH</b>	0,962	0,000	0,772	0,255

El elevado p-valor establece para el factor lote una influencia no significativa ( $p > 0,05$ ) sobre la actividad de la enzima G6PDH, mientras que el factor depósito ha presentado diferencias significativas ( $p < 0,001$ ). Por otra parte, la interacción lote x depósito, no ha sido significativa ( $p > 0,05$ ) en la presente enzima estudiada.

En la Figura 26 se muestran los resultados obtenidos de actividad media y desviación típica para esta enzima. La significación para el factor depósito ( $p=0,000$ ) queda reflejada en la Tabla 11, con una mayor actividad de la enzima G6PDH en el tejido subcutáneo frente al intramuscular.

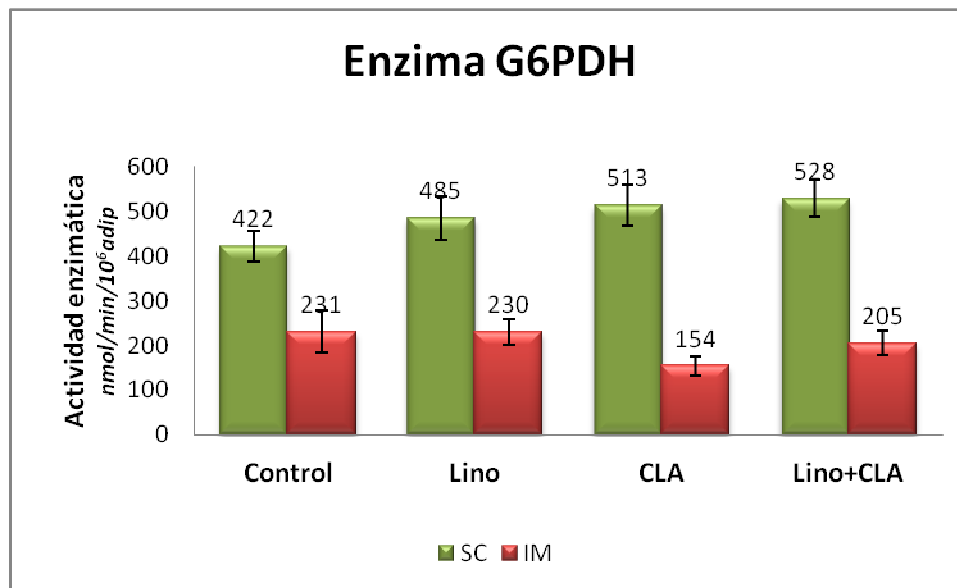


Figura 26.- Valores medios y desviación típica de la actividad enzimática lipogénica de la enzima G6PDH en función de los depósitos grasos, subcutáneo e intramuscular, para cada lote de dieta realizado; Control, Lino, CLA y Lino+CLA.

# Discusión

## 6. DISCUSIÓN

El presente trabajo, que ha estudiado la actividad de las enzimas lipogénicas relacionadas con el engrasamiento en terneros frisonos, se encuentra englobado dentro de un proyecto más amplio cuyo objeto es estudiar el metabolismo de los lípidos y su deposición en el animal para mejorar la calidad nutricional y organoléptica de la carne de vacuno mediante la adición de la semilla de lino y el ácido linoléico conjugado (CLA) en las dietas de los terneros.

Los parámetros productivos obtenidos en el estudio de los terneros (Tabla 4) no se vieron afectados significativamente por la dieta ( $p>0.05$ ), presentando los terneros de la diferentes lotes valores similares de conformación y de engrasamiento (Albertí *et al.*, 2011). Esto justifica que el pienso isoenergético e isoproteico adicinado con lino y CLA, en proporciones de 10 y 2% respectivamente, no produce efectos negativos, debido a los glúcidos cianogénicos contenidos en el lino en proporciones reducidas (FEDNA, 2003), u otras alteraciones en el correcto desarrollo de los terneros. En definitiva la dieta no afectó a los parámetros productivos.

Respecto a la composición de la 10ª costilla (Tabla 5), tamaño y número de adipocitos (Tablas 6 e 7, respectivamente), se observa que las diferentes dietas administradas no influyeron de manera significativa ( $p>0,05$ ) en ninguna de las variables (Gómez *et al.*, 2012). Los parámetros de composición tisular de la costilla (grasa subcutánea, intermuscular, músculo y hueso) mantuvieron su composición normal y no hubo modificaciones en el diámetro ni en la proliferación de los adipocitos del tejido subcutáneo e intramuscular, coincidiendo con el estudio llevado a cabo por Sayed *et al.* (2007) con terneros pirenaicos alimentados con una adición del 5% de semillas de lino en el pienso, en el cual no se hallaron diferencias significativas en los diámetros de los adipocitos para ninguno de los depósitos estudiados. El estudio conjunto de los resultados obtenidos de los adipocitos indica un mayor desarrollo hiperplásico en el depósito intramuscular y predominio hipertrófico del tejido subcutáneo, ya que el tejido SC muestra adipocitos mayores que el IM y un menor número de adipocitos, coincidiendo con otros ensayos como el de Cianzio *et al.* (1985)

que estudió esta diferencia en el desarrollo de los tejidos con cuarenta terneros de cruce alimentados *ad libitum* con paja de cebada y pienso comercial.

El objetivo buscado en el proyecto de investigación de obtener canales con perfiles lipídicos más beneficiosos para la salud humana, no conlleva cambios en el contenido de los depósitos grasos. Lo que también ha quedado justificado por otros autores en distintas especies como porcino (Echenique *et al.*, 2009), vacuno (Sayed *et al.*, 2007; Bach *et al.*, 2007; Mach *et al.*, 2006), corderos (Díaz, 2010), aves (Jia *et al.*, 2010) o conejos (Tres *et al.*, 2008).

En ninguna de las enzimas objeto de estudio, Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH) (Tabla 8), Sintetasa de ácidos grasos (FAS) (Tabla 9), Isocitrato deshidrogenasa (ICDH) (Tabla 10) y Glucosa 6 fosfato deshidrogenas (G6PDH) (Tabla 11), se observan diferencias significativas entre lotes ( $p > 0,05$ ); es decir, la inclusión del lino y/o CLA en la dieta de los terneros Frisones no muestra influencia en la actividad de estas cuatro enzimas lipogénicas.

Por otra parte, las enzimas sí han mostrando diferentes grados de actividad entre ellas. Analizando solo los resultados obtenidos sorprende la baja actividad de la FAS en contraste con la ICDH con valores muy elevados. Al estudiar las enzimas G3PDH y FAS se comprueba que guardan una relación directa con la lipogénesis de los triglicéridos en el adipocito, ya que son las responsables de la síntesis del glicerol y los ácidos grasos respectivamente. Dado que la enzima FAS sintetiza ácido palmítico (C16:0), un ácido graso muy abundante a través de la biohidrogenación del rumen, tiene sentido que esta enzima muestre valores tan bajos de actividad al no requerirse dicho ácido graso. Por otro lado, la demanda de glicerol no está cubierta por la dieta, dado que parte del glicerol procedente de la alimentación se utiliza para la gluconeogénesis del hígado, lo que explicaría la mayor actividad de la G3PDH, sobre todo frente a la FAS.

En cuanto a las enzimas G6PDH e ICDH, éstas presentan un papel minoritario dentro del proceso de lipogénesis. La G6PDH actúa por una vía paralela a la glucólisis, la ruta pentosas fosfato, cuya finalidad es la producción de poder reductor NADPH utilizado para la reacción de la enzima FAS, por lo que la actividad de esta enzima es un reflejo indirecto de la que se está produciendo dentro del adipocito, siendo esta moderada (Tabla 9) (Vernon *et al.*, 1980). La ICDH es una enzima que produce NADPH en el citosol como la G6PDH, la ruta en la que se sitúa transcurre paralela, e intercambia sustratos, con el ciclo de Krebs mitocondrial, lo que podría explicar los elevados valores que presenta esta enzima, que serían debidos a una gran actividad mitocondrial (Chilliard *et al.*, 1985). Por tanto, se concluye que esta dieta con adición de lino y CLA no tiene efecto sobre el desarrollo de los tejidos grasos, tanto subcutáneo como intramuscular.

Al comparar los resultados del presente estudio con los obtenidos en el trabajo de Eguinoa *et al.* (2003) se comprueba que en esta ocasión se han incrementado los valores de actividad para las enzimas FAS, ICDH y G6PDH con respecto a los valores que presentaron sus terneros Holstein. En el caso de la G3PDH el efecto fue el contrario, es decir, en el presente ensayo la actividad fue menor que en el de Eguinoa *et al.* (2003). Existe coincidencia en la edad y peso de sacrificio de los terneros, por lo que la causa podría residir, además de en factores externos como la manipulación de muestras o la cadena de frío, en la alimentación suministrada a los terneros, siendo en este trabajo isoenergética e isoproteica pero no así en el ensayo de Eguinoa *et al.* (2003). Por otra parte las proporciones de actividad para las enzimas G3PDH, FAS y G6PDH guardan semejanza con los obtenidos para la raza Angus en el ensayo Bonnet *et al.* (2003), en la cual solo se comparaban las actividades de los tejidos grasos de varias razas pero con dietas sin suplemento alguno, lo cual respalda la evidencia estadística de que la dieta no ha afectado de manera significativa al metabolismo de las enzimas lipogénicas.

El efecto del depósito graso ha mostrado una gran significación ( $p < 0,05$ ) en este ensayo (Tablas 8, 9, 10 y 11), mostrando una actividad mayor en el subcutáneo frente al intramuscular. Este efecto depósito graso ha podido deberse principalmente al diferente crecimiento hipertrófico e hiperplásico de los adipocitos subcutáneos e intramusculares, dado que el tejido intramuscular es un tejido de desarrollo hipertrófico más tardío que el subcutáneo, pudiendo explicar así la diferencia en la actividad de los resultados. Este desarrollo diferenciado se corrobora al comparar los resultados obtenidos con otros ensayos similares de terneros con adición de lino y CLA. En el caso de los ensayos con lino Kim *et al.*, (2004) y Raes *et al.*, (2004) incrementaron el contenido de ácido linolénico en ambos tejidos adiposos, en terneros Korean Hanwoo y Belgas azules respectivamente, y presentando siempre mayor actividad los adipocitos subcutáneos frente a los intramusculares. Dicha diferencia de actividad entre tejidos grasos se mantuvo en los ensayos de Gassman *et al.* (2001) y Gillis *et al.* (2006) con terneros de cruce y Angus x Hereford, respectivamente, alimentados con CLA, en los que se logró incrementar el contenido de ácido linoleico conjugado en su carne. El ensayo llevado a cabo por Díaz (2010) mostró el caso contrario, en el cual treinta y seis corderos alimentados con pienso enriquecido en lino mostraron una mayor actividad enzimática en el tejido intramuscular que en subcutáneo, aunque se comprobó que no hubo efecto significativo de la dieta sobre la actividad enzimática lipogénica al igual que ocurre en el presente trabajo.

En definitiva, los resultados evidencian que la inclusión de lino en la dieta de terneros de cebo de raza Frisona no modifica ni el desarrollo ni el metabolismo del tejido graso.



# CONCLUSIONES

## 7. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en este Trabajo Fin de Carrera se puede extraer las siguientes conclusiones:

1.- La inclusión de lino y CLA en dietas isoenergéticas e isoproteicas de terneros de raza frisona no ejerce influencia en los parámetros productivos, la cantidad de tejidos ni en el recuento y tamaño de los adipocitos, tanto para el depósito subcutáneo (SC) como intramuscular (IM).

2.- La inclusión de lino y CLA en dietas isoenergéticas e isoproteicas de terneros de raza frisona no afecta a la actividad metabólica de las enzimas lipogénicas estudiadas; Glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH), Sintetasa de ácidos grasos (FAS), Isocitrato deshidrogenasa (ICDH) y Glucosa 6 fosfato deshidrogenas (G6PDH).

3.- La actividad de las enzimas lipogénicas estudiadas varía significativamente entre los depósitos grasos subcutáneo e intramuscular, esto se debería a que el desarrollo de ambos depósitos es distinto de manera que el tejido intramuscular es de desarrollo más tardío que el subcutáneo, y no debido a la dieta suministrada a los terneros.

4.- El análisis del perfil lipídico, con el contenido de ácidos grasos poliinsaturados  $\Omega$ -3 y CLA en los tejidos, será el que determine en última instancia el interés de la utilización de lino y CLA en el cebo de terneros.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera C., Ramírez-Tortosa M., Mesa M<sup>a</sup>., Gil A. (2001). Efectos protectores de los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados sobre el desarrollo de la enfermedad cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria* XVI (3) 78-91.
- Albertí P., Ripoll G., Panea B., Beriain M.J., (2011), Efecto de la adición de semilla de lino y grasa CLA en el pienso de terneros frisonos sobre los parámetros productivos y el color de su carne. XIV Jornadas sobre Producción Animal. Tomo II, 577-579.
- Álvarez A. (2009). Fisiología del crecimiento. Curso de Producción Animal ref. d354496070.
- Bach A., Isla E., (2007). Omega 3 en la alimentación. EurVacum: 2º Congreso de ganado bovino.
- Belitz. H., Grosch W. (1997). Química de los alimentos. Editorial Acribia ISBN: 9788420011622.
- Beriain M<sup>a</sup>., (2009). Curso de Bromatología: Los lípidos. Ref. 36554.
- Bonnet M., Faulconnier Y., Hocquette J. F., Leroux C., Boulesteix P., (2003). Lipogenesis in subcutaneous adipose tissue and in oxidative or glycolytic muscles from Angus, Black Japanese x Angus and Limousin. *Progress in Research on Energy and Protein Metabolism* ISBN: 0071-2477.
- Carriquiry M. (2008). Lípidos: Nutrición animal. Curso de Nutrición Animal de la facultad agronómica de la Universidad de la República (Uruguay).
- Chilliard Y. (1985). Metabolime du tissu adipeux, lipogenese mammaire et activites lipoproteine-lipasiques chez la chebre au cours du cycle gestation-lactation. Tesis doctoral. Universidad Pierre et Marie Curie.
- Church CD., (1988). El Rumiante, Fisiología digestiva y nutrición. Volumen III, Editorial Acribia S.A, ISBN 8420003336.

- Cianzio D. S., Topel D. G., Whitehurst G. B., Beitz D. C., Self H. L., (1985) Adipose tissue growth and cellularity: Changes in bovine adipocyte size and number. *Journal of Animal Science* vol. 60 no. (4) 970-976.
- De la Vega. M, (2008). Efectos del ácido oleico en la migración neuronal y en la formación de sinapsis. Tesis doctoral.
- Diaz J., (2010). Efecto de la utilización en la alimentación de corderos de cebo sobre el desarrollo y metabolismo del tejido graso. Departamento de Producción Animal. ETSIA. Universidad pública de Navarra.
- Echenique A., Capra G., Pardo G., Grompone M.A., Urruzola N., (2009). Efecto de las pasturas sobre la composición química de la grasa intramuscular de cerdos machos enteros y castrados producidos al aire libre en Uruguay. AIDA, XIII Jornadas sobre Producción Animal, Tomo II: 622-624.
- Eguinoa P., Brocklehurst S., Arana A., Mendizabal J. A., Vernon R. G., Purroy A., (2003). Lipogenic enzyme activities in different adipose depots of Pirenaican and Holstein bulls and heifers taking into account adipocyte size. *Journal of Animal Science*, vol. 81 no. 2 432-440.
- FAO, (1997). Grasas y aceites en la nutrición humana, Capítulo 3: Aspectos sobre la digestión y el metabolismo de las grasas. Estudio FAO Alimentación y Nutrición – 57.
- Farquharson C., Benitez L. (2004). Lipoproteínas. Curso clínico de la Facultad de medicina en la Universidad Nacional del Nordeste.
- FEDNA (2003). Semillas de lino. Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal.
- Gallegos L. R.,(2007). Tejido adipose. Reserva Digital de Histología y Patología Ref 221124.
- Gassman K., Parrish Jr. F. C., Beitz D. C., Trenkle A., (2002). Effects of Feeding Calcium Salts of Conjugated Linoleic Acid. Beef Research Report — Iowa State University.
- Gillis M. H., Duckett S. k., Sachmann J. R., (2006). Effects of supplemental rumen-protected conjugated linoleic acid or corn oil on fatty acid composition of adipose tissues in beef cattle. *Journal of Animal Science* no. 5 1419-1427.

- Gómez I., Mendizabal J. A., Beriain, Albertí P., Sarries M. V., Arana T., Insausti K., Soret B., Purroy A., (2012). Effect of supplementation with linseed and CLA on adipose tissue cellularity of Holstein Young bulls.
- Hilda Ramirez-Pérez A., Buntinx Dios S.E. (2010). Metabolismo de carbohidratos, lípidos y proteínas. Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica.
- Jia W., Rogiewicz A., Bruce H.L., Slominski B.A., (2010). Feeding flaxseed enhances deposition of omega-3 fatty acids in broiler meat portions in different manner. Canadian Journal of Animal Science 90: 203-206.
- Khanal R.C., Dhiman T.R., (2004). Biosynthesis of Conjugated Linoleic Acid (CLA). Pakistan Journal of Nutrition 3 (2): 72-81
- Kim C. M., Kim J. H., (2004). Effects of Flaxseed Diets on Fattening Response of Hanwoo Cattle : Fatty Acid Composition of Serum and Adipose Tissues. Asian-australasian journal of animal sciences, vol. 17 (9) 1246-1254.
- Lagurez J., (2009). Principios de nutrición en rumiantes. Departamento de medicina veterinaria y zootecnia. Universidad Veracruzana. República Mexicana.
- Leal A., (2005). Ácidos grasos trans, cops y lops: evidencia actual de su influencia sobre la salud infantil. Acta Pediátrica Española (63) 22-26.
- Mach N., Devant M., Oliver M. A., Bach A., Font-Furnols M., Diaz I., Garcia J. A., (2006). Increasing the amount of n-3 fatty acid in meat from young Holstein bulls through nutrition. Journal of Animal Science, 84: 3.039-3.048.
- Mataix J., Sanchez F., (2010). Nutrición y tecnología de los alimentos: Los lípidos. Tratado de nutrición ISBN: 84-7978-387-7.
- Mc Guilvery R., (1977). Conceptos bioquímicos. Editorial Reverté, S.A. Journal of Biological Chemistry (239) 375-386.
- Moreno M.J., Martinez J.A. (2002). Adipose tissue: a storage and secretory organ. A Sist Sanit Navar; vol. 25 (1) 29-39.

- Oosterveer. M, Koolman. A. (2011). Resistance to diet-induced adiposity in cannabinoid receptor-1 deficient mice is not due to impaired adipocyte function. *Nutrition&Metabolism*. BioMed Central.
- Pérez Y., (2006). Oxidación de las LDL (lipoproteínas de baja densidad y su relación con la patogénesis de la aterosclerosis. *Revista CENIC*, vol. 38 (1) 3-11.
- Pueyrredón P., Roviroso A., Torres M. E., Uicich R., (1999). Ácidos grasos trans: Actualización y situación. *Revista de la Sociedad Argentina de Nutrición*, vol. 10 (3) 61-68.
- Raes K., Haak L., Balcaen E., Claeys E., Demeyer D., De Smet S., (2004). Effect of linseed feeding at similar linoleic acid levels on the fatty acid composition of double-muscled Belgian Blue Young bulls. *Meat Science* vol. 66 (2) 307-315.
- René Baudrand B., Eugenio Arteaga U., Manuel Moreno G. (2010). El tejido graso como modulador endocrino: Cambios hormonales asociados a la obesidad. *Revista médica e Chile*, vol. 138 (10) 1294-1301.
- Robdell M., (1964). Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose. *Journal of Biological Chemistry*, (239) 375-380.
- Rosario A., Muñoz C (2009). Curso de bioquímica sobre cinética enzimática y estructura de proteínas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Sanhueza J, Nieto S, Valenzuela A., (2002). Ácido linoleico conjugado: Un ácido graso con isomería trans potencialmente beneficioso. *Revista chilena de nutrición*, vol. 29 (2).
- Sarriés M. V., Beriain M. J., Insausti K., Arana A., Purroy A., (2009). Composición en ácidos grasos de la carne de terneros de raza pirenaica alimentados con lino. XXXIX Jornadas de Estudio, XIII Jornadas sobre producción animal, vol. 1, 562-564.
- Sayed S., Abadía S., Mendizabal J.A., Arana A., Soret B., Alberti P., Purroy A. (2007). Efecto de la alimentación con dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados sobre el desarrollo del tejido graso de terneros. XXXVIII Jornadas de Estudio AIDA (XII Jornadas sobre Producción Animal), Sección 3: Nutrición y Alimentación.

- Soret B., Mendizabal J.A., Arana A., Purroy A., Eguinoa P. (1998). Cellularity and lipogenic enzyme activity in Lacha and Rasa Aragonesa lambs during growth. *Small Ruminant Research* 29: 103-112.
- Tres A., Bou R., Codony R., Guardiola F., (2008). Influence of dietary doses of n-3- or n-6-rich vegetable fats and  $\alpha$ -tocopheryl acetate supplementation on raw and cooked rabbit meat composition and oxidative stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 7.243-7.253.
- Valenzuela R., Tapia G., Gonzalez M., Valenzuela A., (2011). Ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) y su aplicación en diversas situaciones clínicas. *Revista chilena de nutrición*, vol. 38 (3) 356-367.
- Valenzuela S., Rubén A., (2005). Contenido de ácidos grasos y conjugados del ácido linoleico en carne de bovinos. *Revista electrónica de Veterinaria*, vol. 10 (10).
- Van Lier E., Regueiro M. (2008). Digestión en retículo-rumen. *Revista Sistemas de producción agroecológica*, vol. 2 (2).
- Vernon R. (1980). Lipid metabolism in the adipose tissue of ruminant animals. *Progress in lipid research*, vol. 19 (1-2) 23-106.
- Waliszewski S., Infarzón R., (2006). La importancia de los ácidos omega 3. *Ciencia y el hombre. Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana*, Volumen XIX, Número 3.



ANEXO

# MÉTODOS DE TRABAJO

## ANEXO: MÉTODOS DE TRABAJO

### A.- HOMOGENEIZACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

#### Procedimiento

Todo el proceso debe llevarse a cabo a baja temperatura, en hielo, para evitar la desnaturalización de las enzimas.

- Desmenuzar con un bisturí un pedazo de muestra recién sacada del congelador a -80 °C.
- Pesar entre 0,7 y 0,8 gramos de la muestra desmenuzada.
- Añadir 4 ml de tampón STEG\*.
- Homogeneizar la mezcla con el ULTRA-TURRAX durante 30 segundos a 24.000 rpm. Repetir este paso dos veces.
- Filtrar el producto con filtro de tela.
- Centrifugar el filtrado a 6.000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
- Filtrar con filtro de red.
- Centrifugar el producto a 12.000 rpm durante 20 minutos a 4°C.
- Filtrar a través de un filtro de papel Whatman (0,45 µm de poro) usando una jeringuilla.
- Dividir el filtrado en tubos eppendorf de 1,5 ml.
- Almacenar en el congelador a -80°C.

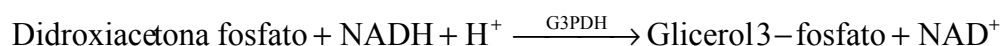
\*Tampón STEG (pH = 7,4):

- Sacarosa (0,3 M): 102,69 g/l
- Trizna base (30 mM): 3,63 g/l
- EDTA (1mM): 037 g/l
- Glutación forma reducida (1mM): 0,307 g/l

## B.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

### B.1.- GLICEROL 3 FOSFATO DESHIDROGENASA (G3PDH)

El espectrofotómetro mide el rendimiento del consumo de NADH



#### Procedimiento

Las muestras sacadas del congelador de -80°C se dejan descongelar lentamente metidas en hielo. Tras la mezcla de los sustratos la reacción se inicia inmediatamente, por lo que se debe proceder con rapidez al análisis en el espectrofotómetro.

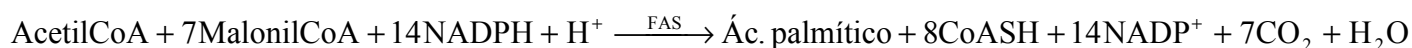
- Calentar el tampón\* a 37 °C y añadir 275 µm a la cubeta.
- Añadir a la cubeta en el orden indicado:
  - 10 µl de NADH (0,215 mM)
  - 5 µl de muestra
  - 10 µl de Dihidroxiacetona fosfato (DHAP; 1,2 mM) (ó H<sub>2</sub>O desionizada en el caso el control negativo)
- Agitar la cubeta (invirtiéndola).
- Medir la reacción durante 3 minutos con luz ultravioleta a 340 nm.

\*Tampón (pH = 7,5):

- Trietanolamina (100 mM): 13,34 g/l
- EDTA (3 mM): 1,12 g/l

## B.2.- SINTETASA DE ÁCIDOS GRASOS (FAS)

El espectrofotómetro mide el rendimiento del consumo de NADPH.



### Procedimiento

Las muestras sacadas del congelador de -80°C se dejan descongelar lentamente metidas en hielo. Tras la mezcla de los sustratos la reacción se inicia inmediatamente, por lo que se debe proceder con rapidez al análisis en espectrofotómetro.

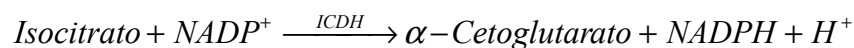
- Calentar el tampón\* a 37 °C y añadir 262 µl a la cubeta.
- Añadir a la cubeta en el orden indicado:
  - 10 µl de Acetil CoA (0,05 mM)
  - 10 µl de NADPH (0,15 mM)
  - 8 µl de muestra
  - 10 µl de Malonil CoA (0,1 mM) (ó H<sub>2</sub>O desionizada en el caso el control negativo)
- Agitar la cubeta (invirtiéndola).
- Medir la reacción durante 3 minutos con luz ultravioleta a 340 nm.

\*Tampón (pH = 6,8):

- Fosfato potásico (100 mM): 22,82 g/l
- EDTA (3 mM): 0,3722 g/l
- Ditiotreitól (DTT; 1 mM): 0,154 g/l

### B.3.- NADP – ISOCITRATO DESHIDROGENASA (ICDH)

El espectrofotómetro mide el rendimiento de la producción de NADPH.



#### Procedimiento

Las muestras sacadas del congelador de -80°C se dejan descongelar lentamente metidas en hielo. Tras la mezcla de los sustratos la reacción se inicia inmediatamente, por lo que se debe proceder con rapidez al análisis en el espectrofotómetro.

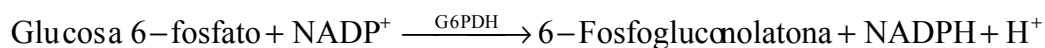
- Calentar el tampón\* a 37 °C y añadir 250 µl a la cubeta.
- Añadir a la cubeta en el orden indicado:
  - 25 µl de Cloruro de manganeso (30 mM)
  - 50 µl de EDTA (3,4 mM)
  - 5 µl de NADP (15 mM)
  - 10 µl de muestra
  - 5 µl de Isocitrato (15 mM) (ó H<sub>2</sub>O desionizada en el caso el control negativo)
- Agitar la cubeta (invirtiéndola).
- Medir la reacción durante 3 minutos con luz UV a 340 nm.

\*Tampón (pH = 7,4):

- TRIS (50 mM): 6,04 g/l

#### B.4.- GLUCOSA 6 FOSFATO DESHIDROGENASA (G6PDH)

El espectrofotómetro mide el rendimiento de la producción de NADPH.



#### Procedimiento

Las muestras sacadas del congelador de -80°C se dejan descongelar lentamente metidas en hielo. Tras la mezcla de los sustratos la reacción se inicia inmediatamente, por lo que se debe proceder con rapidez al análisis en el espectrofotómetro.

- Calentar el tampón\* a 37 °C y añadir 274 µl a la cubeta.
- Añadir a la cubeta en el orden indicado:
  - 10 µl de NADP (0,2 mM)
  - 6 µl de muestra
  - 10 µl de Glucosa 6 fosfato (G6P; 0,2 mM) (ó H<sub>2</sub>O desionizada en el caso el control negativo)
- Agitar la cubeta (invirtiéndola).
- Medir la reacción durante 3 minutos con luz UV a 340 nm.

\*Tampón (pH = 7,4):

- Glicilglicina (0,1 M): 13,21 g/l
- Cloruro magnésico (10 mM): 2,022 g/l

