

RESUMEN

Entre las causas de la disminución del consumo actual de carne de cordero se encuentra su alto contenido en ácidos grasos saturados ya que existe una preocupación por la salud y este tipo de grasas suponen un mayor riesgo de padecer obesidad y enfermedades cardiovasculares (Baghurst, 2004; Givens, 2005).

Actualmente, se utilizan estrategias de alimentación para los rumiantes utilizando materias primas ricas en ácidos grasos (AGs) del tipo omega 3, con el objeto de modificar la composición de los AGs de su carne. Estudios previos han demostrado que este tipo de alimentación rica en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) aumenta la composición de estos AGs en el músculo pero inhibe la actividad de algunas enzimas implicadas en la síntesis endógena y acumulación de los PUFAs (Ntambi, 1992; Bernard *et al.*, 2005) no obteniendo el enriquecimiento esperado en estos AGs.

En este trabajo se ha profundizado en el estudio de la expresión de genes en el músculo y tejido adiposo implicados en el metabolismo de los AGs en corderos alimentados con dietas ricas en PUFAs como el lino, con alto contenido en ácido alfa-linolénico (ALA) y microalgas, abundante en ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA).

Se utilizaron 33 corderos de Raza Navarra divididos en tres lotes cuya alimentación difería en el contenido y tipo de PUFAs: lote C (control), lote L suplementado con un 10% de lino y lote LA con 5% de lino y 3,75% de microalgas. Mediante RT-PCR a tiempo real se cuantificó la expresión de los genes ACC, LPL y SCoAD. Los resultados muestran diferentes patrones en la expresión de dichos genes en función del depósito. En el tejido adiposo intramuscular, la incorporación de lino y lino y las algas provocaron un descenso en la expresión génica de la ACC y SCoAD y un aumento en la expresión de la LPL respecto al grupo control. En el tejido adiposo subcutáneo, la expresión de la ACC y SCoAD aumentaron y disminuyó la expresión de la LPL en el lote L respecto al control, sin embargo, la inclusión de lino y las algas provocó un aumento en la expresión de la ACC, una disminución en la SCoAD y la LPL no presentó variación respecto al grupo control.

ABSTRACT

The causes of the reduced in the current consumption of lamb meat is due to its high content of saturated fatty acids as there is a health concern and these fats pose a greater risk of obesity and cardiovascular disease (Baghurst, 2004; Givens, 2005).

Currently feeding strategies are used for ruminants using raw materials rich in omega 3 fatty acids (FAs), in order to modify the composition of the FAs of the meat. Previous studies have shown that this type of diet, rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs), increases the composition of these FAs in the muscle. However, it is shown that this inhibits the activity of some enzymes involved in the endogenous synthesis and accumulation of PUFAs (Ntambi, 1992; Bernard *et al.*, 2005) and hence the enrichment expected in these FAs is not obtained.

In this present study we have analyzed gene expression in muscle and adipose tissue involved in the metabolism of FAs in lambs given diets rich in PUFA such as linseed, high in alpha-linolenic acid (ALA) and algae, abundant in docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA).

An experiment conducted with 33 lambs of the Raza Navarra breed divided into three dietary treatments differing in content and type of PUFAs: group C (control), group L supplemented with 10% linseed and group, 5% linseed and 3.75% microalgae. By real time RT-PCR the expression of lipogenic enzymes ACC, LPL and SCoAD was quantified. The results show different gene expression patterns of these genes depending on the depot. In the intramuscular adipose tissue, linseed or linseed and microalgae feeding downregulated ACC and SCoAD relative mRNA expression and upregulated LPL mRNA compared with control. In the subcutaneous adipose tissue, relative mRNA expression of ACC and SCoAD upregulated and LPL mRNA downregulated for group L compared with control. Nevertheless, ACC mRNA increased, SCoAD mRNA decreased and LPL mRNA was no affected with the linseed and microalgae treatment compared with the control.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS..... | 1 |
| 1.1. ANTECEDENTES..... | 1 |
| 1.1.1. El ganado ovino de carne..... | 1 |
| 1.1.2. Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en la salud humana . | 1 |
| 1.1.3. Metabolismo de los ácidos grasos en los rumiantes | 3 |
| 1.1.3.1. Metabolismo de los ácidos grasos en el rumen | 3 |
| 1.1.3.2. Absorción de los ácidos grasos en el intestino delgado y su distribución a través de la sangre | 4 |
| 1.1.3.3. Síntesis de triglicéridos en los adipositos | 5 |
| 1.1.3.4. Transformación endógena de los PUFAs provenientes de la dieta | 6 |
| 1.1.3.5. Síntesis <i>de novo</i> de los ácidos grasos | 7 |
| 1.1.4. Efecto de dietas ricas en PUFAs n-3 en la composición de los ácidos grasos en el depósito intramuscular y subcutáneo en ovino | 8 |
| 1.1.5. Efecto de la dieta rica en PUFAs sobre la expresión génica de las enzimas lipogénicas ACC, LPL Y SCOAD en el intramuscular y tejido subcutáneo | 9 |
| 1.2. OBJETIVOS | 11 |
| 2. MATERIAL Y MÉTODOS | 12 |
| 2.1. MATERIAL | 12 |
| 2.1.1. Material animal | 12 |
| 2.1.2. Sacrificio y toma de muestras para el análisis de la expresión génica | 15 |
| 2.2. METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE ENZIMAS IMPLICADAS EN LA SÍNTESIS Y ACUMULACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS | 15 |
| 2.2.1. Obtención de mRNA total | 15 |
| 2.2.1.1. Obtención de mRNA de tejido graso intramuscular | 15 |
| 2.2.1.2. Obtención de mRNA de tejido graso subcutáneo | 16 |
| 2.2.1.3. Tratamiento de DNasas para muestras de ARNm del tejido intramuscular y subcutáneo | 16 |
| 2.2.2. Cuantificación del ARNm del depósito intramuscular y subcutáneo | 17 |
| 2.2.3. Obtención de cDNA a partir de ARNm por medio de la reacción de la transcriptasa inversa en el depósito intramuscular y subcutáneo | 17 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2.4. Amplificación cualitativa de marcadores a partir de cDNA | 17 |
| 2.2.4.1. Diseño de los cebadores | 17 |
| 2.2.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR cualitativa)..... | 18 |
| 2.2.5. Amplificación de los marcadores de diferenciación mediante PCR | |
| cuantitativa (RT-PCR a tiempo real) | 18 |
| 2.2.5.1. Clonación de los productos amplificados | 19 |
| 2.2.5.2. Curvas estándar y análisis de eficiencia | 19 |
| 2.2.5.3. Cuantificación del nivel de expresión de enzimas implicadas en la síntesis y acumulación de los ácidos grasos. | 20 |
| 2.2.5.4. Método de análisis de resultados | 21 |
| 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 23 |
| 3.1. RESULTADOS..... | 23 |
| 3.1.1. Análisis de eficiencia de los cebadores..... | 23 |
| 3.1.2. Análisis de la expresión génica de enzimas implicadas en la síntesis y acumulación de ácidos grasos | 24 |
| 3.1.2.1. Expresión génica de las enzimas lipogénicas en el tejido adiposo intramuscular | 24 |
| 3.1.2.1.1. Acetil-CoA Carboxilasa (ACC) | 24 |
| 3.1.2.1.2. Lipoprotein Lipasa (LPL) | 24 |
| 3.1.2.1.3. Estearoil-CoA desaturasa (SCoAD) | 25 |
| 3.1.2.1. Expresión génica de las enzimas lipogénicas en el tejido adiposo subcutáneo | 26 |
| 3.1.2.1.1. Acetil-CoA carboxilasa (ACC) | 26 |
| 3.1.2.1.2. Lipoprotein lipasa (LPL) | 26 |
| 3.1.2.1.3. Estearoil-CoA desaturasa (SCoAD) | 27 |
| 3.2. DISCUSIÓN | 28 |
| 3.2.1. Efecto de la dieta rica en lino y microalgas sobre la expresión génica de enzimas lipogénicas en el tejido intramuscular en ganado ovino | 28 |
| 3.2.2. Efecto de la dieta rica en lino y microalgas sobre la expresión génica de enzimas lipogénicas en el tejido subcutáneo en ganado ovino..... | 29 |
| 4. CONCLUSIONES | 34 |
| 4. BIBLIOGRAFÍA | 35 |

1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. El ganado ovino de carne

El consumo de carne de ovino en los hogares españoles ha disminuido en la última década. En 2007, el consumo medio se situaba en torno a 4,45 kg *per capita*, sin embargo, en 2010 el consumo decreció hasta 2,24 Kg *per capita*, según datos del Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino, MARM (2011).

En Navarra, en las zonas de la parte occidental media y sur, las explotaciones de ovino integran animales de Raza Navarra. Estos animales son destinados principalmente a la producción de carne. El “ternasco” es el producto comercial más importante y generalizado. Se caracteriza porque son corderos que alcanzan los 22-26 kg de peso en vivo, alimentados a base de concentrados, en general en un tiempo inferior a los 90 días.

Existen también otras alternativas de producción como son el cordero lechal, corderos que alcanzan cómo máximo 14 kg de peso vivo, alimentados con leche materna, y el cordero pastenco, producido durante los meses de julio y agosto en la zona del Pirineo Navarro y alimentado con la leche materna y pastoreo (Instituto Técnico de Gestión Ganadero, 2011).

1.1.2. Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en la salud humana

Debido a los cambios en los hábitos alimentarios y el modo de vida, las enfermedades crónicas como la obesidad, la diabetes mellitus, las enfermedades cardiovasculares, la hipertensión y los ictus cerebrovasculares y algunos tipos de cáncer son causantes de discapacidad y muerte prematura tanto en los países desarrollados como en los países en desarrollo. Las previsiones indican que para el año 2020 las enfermedades crónicas representarán casi las tres cuartas partes del total de defunciones (OMS, 2003).

La asociación entre los PUFAs, en particular los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (PUFAs n-3), y las enfermedades cardiovasculares fue establecida en los años 70 tras las observaciones de la baja mortalidad por enfermedades coronarias que presentaban los esquimales de Groenlandia a pesar de consumir una dieta rica en grasa (Din *et al.*, 2004). Desde entonces, han sido numerosos los estudios que han evaluado la

relación entre la ingesta de n-3 PUFAs y la enfermedad cardiovascular (A.P. Simopoulos, 1991; P. M. Kris-Etherton *et al.*, 2003; Din *et al.*, 2004; Ruxton *et al.*, 2004; Givens, 2005; Harper & Jacobson, 2005; A.P. Simopoulos, 2008).

Los PUFAs son ácidos grasos (AGs) de gran importancia para la salud humana. Estos AGs se clasifican en cuatro familias; n-3, n-6, n-7 ó n-9, en función de la posición del primer doble enlace en la cadena comenzando desde el extremo metilo.

Los ácidos grasos n-7 y n-9 no se consideran esenciales, ya que pueden ser sintetizados por el organismo humano. Sin embargo, los AGs n-3 y n-6 son imprescindibles para el ser humano, debido a que no pueden ser sintetizados en las células y se denominan ácidos grasos esenciales (AGE).

Dentro de los AGs importantes para la salud, el ácido alfa-linolénico (ALA) de la serie n-3 es un AG formado por 18 átomos de carbono con tres dobles enlaces, y junto con el ácido linoleico (LA, n-6), AG de 18 átomos de carbono y 2 dobles enlaces, es un precursor necesario en la biosíntesis de los eicosanoides. A partir de estos dos AG se forman, entre otros, los siguientes AG considerados “saludables”: el ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido linoleico conjugado (CLA).

El DHA es esencial para una gran variedad de funciones fisiológicas como la integridad de la piel, señalización de eicosanoides, visión y funciones renales (Nakamura & Nara, 2003). Mientras que el EPA es un AG básico para la regulación de la funcionalidad cerebral, desarrollo óptimo del cerebro y la vista y síntesis de prostaglandinas.

Kim *et al.* (2009) observaron que un consumo elevado de AGs de pescado reducía el riesgo de padecer cáncer de mama. Además, la ingesta de AGs n-3 ricos en DHA y EPA existentes en el pescado presenta una relación inversa con la probabilidad de sufrir cáncer de mama postmenopáusico.

Por otro lado, varios estudios han demostrado los beneficios del DHA y EPA, y en menor medida el ALA, sobre las enfermedades cardiovasculares (Kris-Etherton, 2003ab; Connor, 2000; P.M. Kris-Etherton *et al.*, 2003; Thies *et al.*, 2003; Brouwer *et al.*, 2004; Mozaffarian *et al.*, 2005).

El CLA es otro de los AGs que aporta importantes beneficios para la salud, debido a que presenta propiedades antiadipogénicas, anticarcinógenas, efectos sobre el sistema inmune y el metabolismo de los lípidos (Thom *et al.*, 2001; Belury, 2002).

La ingesta de PUFAs n-3 es importante para la salud humana, pero también es necesario mantener una correcta proporción entre los AGs n-3 y n-6, ya que, una relación n-6/n-3 muy elevada, también promueve ciertas enfermedades como las cardiovasculares o el cáncer, mientras que niveles bajos del ratio ejercen efecto supresores (A. P. Simopoulos, 2002). Además, Kiecolt-Glaser *et al.* (2007) observaron que cuanto mayor era el nivel de AGs n-6 en la sangre de los participantes en el estudio, más probabilidades tenían de sufrir depresión.

Los valores recomendados para el ratio n-6/n-3 son menores o iguales que cinco (De La Torre *et al.*, 2006) o menores que cuatro (Wood *et al.*, 2004).

1.1.3. Metabolismo de los ácidos grasos en los rumiantes

1.1.3.1. Metabolismo de los ácidos grasos en el rumen

A nivel ruminal son cuatro los procesos que ocurren con los lípidos: hidrólisis, biohidrogenación, saponificación y biosíntesis de los AGs, los tres primeros son procesos que ocurren siempre, en cambio, la biosíntesis depende de la cantidad de AGs ingeridos (Relling & Mattioli, 2003).

En el proceso de la hidrólisis tiene lugar la digestión de las grasas ingeridas por el animal. Las lipasas, fosfolipasas y galactosidasas producidas por las bacterias (principalmente *Anaerovibrio lipolytica*) y protozoos del rumen hidrolizan los lípidos de forma que se liberan AGs, glicerol, alcoholes aminados (derivados de los fosfolípidos) y galactosa (provenientes de los galactolípidos) (Harfoot & Hazlewood, 1988).

De los productos liberados en la hidrólisis, el glicerol, los alcoholes aminados y la galactosa son metabolizados y convertidos en ácidos grasos volátiles (AGV) y absorbidos por la pared ruminal. En cambio, el 70-90% de los AGs sufren un proceso de biohidrogenación bacteriana en la cual los ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs) y los PUFAs son transformados en sus isómeros *trans*, principalmente, por la bacteria *Butirivibrio fibrisolvens*. De esta forma dos de los AGs importantes como el LA (C18:2n6) y el ALA (C18:3n3), son transformados en ácido esteárico (C18:0).

En ocasiones la biohidrogenación no es completa, por lo que se obtienen metabolitos intermedios, algunos de los cuales tienen funciones metabólicas en los animales. El porcentaje de biohidrogenación está relacionado, por un lado, con la cantidad de PUFAs que llegan al rumen y por otro con el pH ruminal. A mayor cantidad de PUFAs menor el porcentaje de biohidrogenación y un pH menor provoca la

inhibición del crecimiento de las bacterias encargadas del proceso, quedando de esa forma mayor cantidad de metabolitos intermedios (Relling & Mattioli, 2003).

El resto de los AGs que no sufren la biohidrogenación pasan a ser una fuente de AGEs e insaturados para el rumiante al ser absorbidos en el intestino.

Con objeto de disminuir el efecto biohidrogenizador del rumen se utilizaron varias alternativas para aumentar la incorporación de AGEs n-3. Entre ellas, se encuentra la encapsulación de los PUFAs (semillas de lino, colza, aceites de pescado, etc.) en proteínas protegidas como formaldehído o AGs en forma de jabones cálcicos (Arana, 2005).

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

1.1.3.2. Absorción de los ácidos grasos en el intestino delgado y su distribución a través de la sangre

Una vez abandonado el rumen los AGs provenientes de la dieta son transportados a los enterocitos por medio de la lipasa localizada en la pared intestinal. Los AGs con más de 14 carbonos, como son el ALA y el LA, se esterifican para formar triglicéridos (TGs) dentro del enterocito y pasan a la circulación sanguínea a través de la vía linfática en forma de quilomicrones (Figura 1).

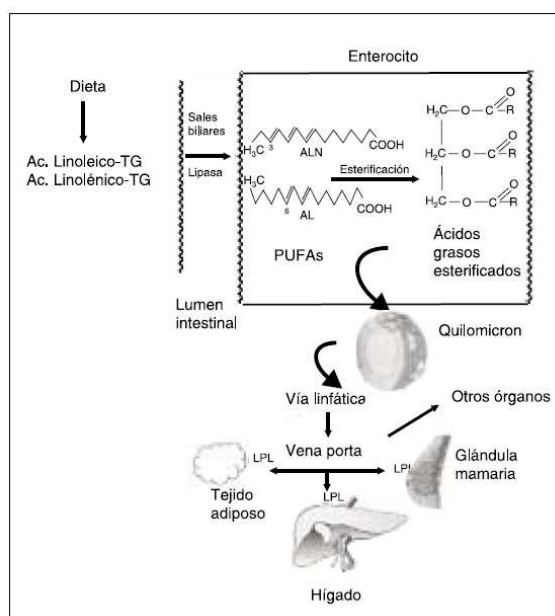


Figura 1. Metabolismo de los AGE y principales destinos metabólicos de estos ácidos grasos (Rodríguez *et al.*, 2005).

Los TGs una vez absorbidos son hidrolizados a PUFAs libres y podrán ser metabolizados de diferentes formas y cumplir diferentes funciones.

1.1.3.3. Síntesis de triglicéridos en los adipocitos

Los TGs transportados por los quilomicrones y las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) son captados desde los capilares por medio de la enzima lipoproteína lipasa (LPL) anclada en el endotelio, la cual hidroliza los lípidos. La LPL actúa como un mediador importante en el mantenimiento de la homeostasis energética y la acumulación de la grasa en el tejido adiposo (Zechner *et al.*, 2000).

En la siguiente figura (Figura 2) se presentan las rutas metabólicas implicadas en la biosíntesis del tejido graso de los rumiantes:

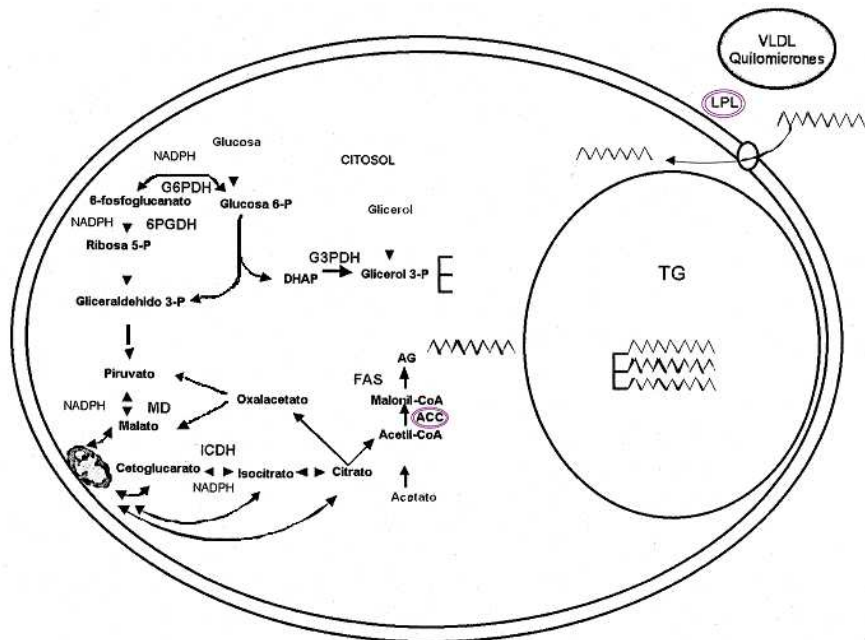


Figura 2. Principales vías metabólicas implicadas en la lipogénesis del tejido graso en rumiantes.

Los AGs liberados pueden ser absorbidos por los tejidos periféricos, siendo oxidados y empleados como fuente de energía o reesterificados, en forma de TGs.

Dichos TGs se formarán mediante la esterificación entre el glicerol 3-fosfato, formada a partir de la glucosa mediante la enzima Glicerol 3-Fosfato Deshidrogenada (G3PDH), y tres AGs, ya sean provenientes de la alimentación (obtenidos directamente o transformados de forma endógena) o sintetizadas *de novo*.

1.1.3.4. Transformación endógena de los PUFAs provenientes de la dieta

Los rumiantes, como todos los mamíferos, no poseen las enzimas capaces de insertar un doble enlace en los átomos de carbono 12 ($\Delta 12$ -desaturasa) y 15 ($\Delta 15$ -desaturasa) de los AGs, razón por la que no pueden sintetizar el ALA ni el LA, respectivamente, son AGEs que deben ser proporcionados por la dieta (García-Muriana, 2002).

Por un lado, el ALA y el LA son metabolizados por una serie de reacciones de desaturación y elongación en el retículo endoplasmático y transformados (Figura 3) produciendo DHA y EPA y el ácido araquidónico (AA) (Lama Moré & Moraix López, 2005).

El ALA y LA compiten por las mismas enzimas $\Delta 5$ desaturasa y $\Delta 6$ desaturasa, esta competencia explicaría por qué el consumo elevado de LA reduce el nivel de DHA (Rodríguez *et al.*, 2005)

En la siguiente figura (Figura 3) se presenta la biosíntesis de n-3 PUFA a partir del ALA y LA:

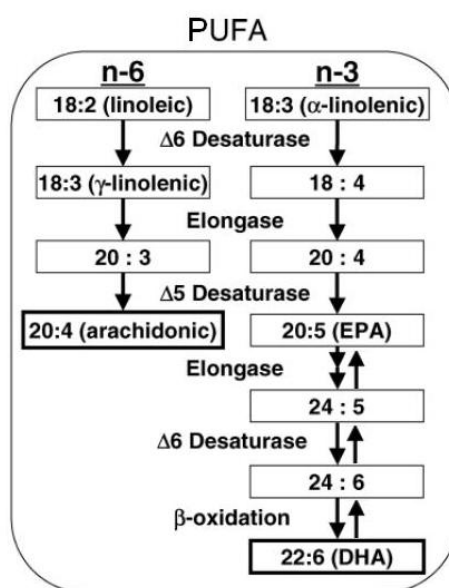


Figura 3. Biosíntesis del ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA) a partir del ALA y LA (Morris, 2008).

Por otro lado, otra de las rutas metabólicas en la que intervienen el ALA y el LA es la síntesis endógena de CLA en tejidos tanto en el rumen como el tejido adiposo, glándula mamaria o células hepáticas (Bauman *et al.*, 2003).

La síntesis endógena es la principal fuente de CLA presente en la leche y en la carne de los rumiantes, ya que la cantidad de CLA procedente de la biohidrogenación ruminal es reducida (Khanal & Dhiman, 2004).

El ALA y LA deben ser transformados a ácido vaccénico (VA) en el rumen. El VA, una vez transportado a los tejidos, es el principal ácido graso *trans* responsable de la formación por desaturación del isómero más abundante de CLA (75-90%), el 9c11t-CLA (Collomb *et al.*, 2006) (Figura 4).

La reacción esta regulada por la enzima estearoil-CoA desaturasa (SCoAD), es la enzima del retículo endoplasmático que cataliza la síntesis de MUFAs de forma endógena.

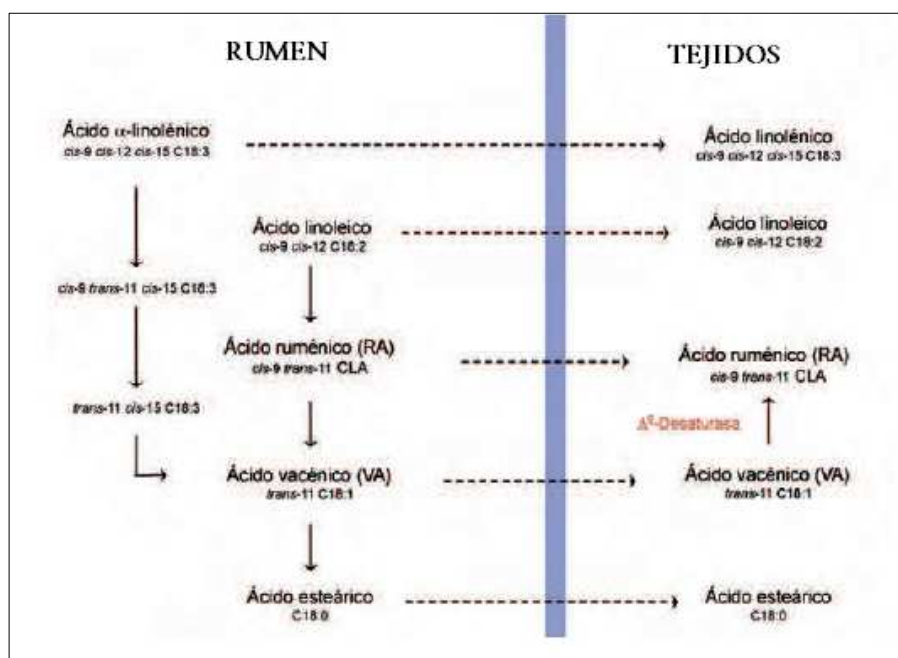


Figura 4. Principales rutas de formación del 9c11t-CLA en el rumen y en los tejidos de los rumiantes a partir del ácido α -linoleico (ALA) y linolénico (LA) (Toral *et al.*, 2009).

1.1.3.5. Síntesis *de novo* de los ácidos grasos

La biosíntesis *de novo* de los AGs se efectúa fundamentalmente a partir del acetato que requiere ser activado a acetyl coenzima A (CoA) por la enzima acetyl-CoA sintetasa. La síntesis tiene lugar en el citoplasma celular, de los adipocitos y hepatocitos, y está catalizada por la enzima acetyl-CoA carboxilasa (ACC), que convierte el acetyl-CoA en malonil-CoA, proporcionando así un sustrato indispensable (Barber *et al.*, 2005).

A partir del malonil-CoA y a través de siete reacciones de condensación la enzima sintasa de ácidos grasos (FAS), cuya fuente de hidrógenos es el NADPH+H,

cataliza la síntesis de ácido palmítico (C16:0) (Smith *et al.*, 2003). A partir de este momento, por procesos de elongación localizados en el retículo endoplasmático liso y en las mitocondrias y por procesos de desaturación en el retículo endoplasmático liso se van creando AGs más complejos. La reacción de desaturación es catalizada por la enzima SCoAD ($\Delta 9$ desaturase) (Figura 5).

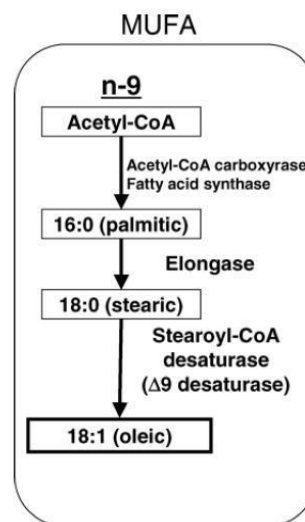


Figura 5. Síntesis *de novo* de AGs (Morris, 2008).

La energía empleada en la síntesis de los AGs, en el caso de los rumiantes, se obtiene mediante la vía de las pentosas catalizada por la enzima NAD-Isocitrato Deshidrogenada (ICDH).

1.1.4. Efecto de dietas ricas en PUFAs n-3 en la composición de los ácidos grasos en el depósito intramuscular y subcutáneo en ovino

Con el objeto de aumentar la concentración de AGs saludables diversos estudios han analizado el efecto de la modificación de la dieta sobre la composición en AGs en la carne de rumiantes.

A pesar de los altos niveles de biohidrogenación ruminal de los PUFAs la alimentación es la principal vía para incrementar el contenido en AGs saludables en rumiantes, incrementando la cantidad de estos AGs provenientes de la dieta (Scollan *et al.*, 2006).

Dentro de los productos utilizados en estudios anteriores como fuente de PUFAs n-3 en el alimento, también utilizados en el presente trabajo, son la linaza o lino y las microalgas. Ambos son una fuente de grasa vegetal del tipo n-3, ya que el lino contiene un 57% de ALA y un 16% de LA de los ácidos grasos totales y las microalgas (*Schizochytrium sp*) un 42,3% de DHA, 17,7% de DPA y 2% de EPA del total de AG. Por lo que, en los casos en los que se pretende incrementar la concentración de 9c11t-CLA, ALA y LA en la carne de rumiante las fuentes de PUFAs utilizadas son el forraje, el lino, la soja, el maíz, etc., mientras que para obtener un enriquecimiento en DHA y ALA las dietas son ricas en aceite de pescado o microalgas.

Varios autores han estudiado el efecto de la inclusión del lino en la dieta del ganado ovino. Demirel *et al.* (2004), Bas *et al.* (2007), Radunz *et al.* (2009) y Berthelot *et al.* (2010) observaron que una alimentación rica en lino produjo un incremento en los PUFAs n-3 y el ALA tanto en el intramuscular (IM) como en el tejido subcutáneo (SC).

La alimentación a base de lino no presentó un claro efecto sobre la proporción de LA en el en el músculo y tejido adiposo (Bas *et al.*, 2007), aunque algunos autores observaron una tendencia al aumento (Radunz *et al.*, 2009; Berthelot *et al.*, 2010).

En referencia a los autores Bas *et al.* (2007) y Radunz *et al.* (2009) el contenido en VA no presentó variación en ambos tejidos. Por el contrario, Cooper *et al.*, (2004) y Elmore *et al.* (2005) indicaron una disminución significativa de este AGs en el depósito IM en dietas ricas en lino frente a las dietas ricas en lino protegido de la biohidrogenación.

Tanto el 9c11t-CLA como el DHA y EPA presentaron una tendencia similar, Bas *et al.*, (2007) y Radunz *et al.*, (2009) no observaron variación en dichos AGs, sin embargo, según Berthelot *et al.*, (2010) el 9c11t-CLA y el DHA y EPA mostraron un aumento en su contenido en los dos depósitos.

En los trabajos que se analizó el efecto de las algas sobre la composición en AGs del músculo y del tejido adiposo (Franklin *et al.*, 1999; Papadopoulos *et al.*, 2002; Cooper *et al.*, 2004) se observó que en general no tuvo efecto o se produjo una disminución del ALA y el LA. En cambio, el DHA y el EPA aumentaron significativamente en dietas con alto contenido en estos AGs (algas o algas y aceite de pescado).

1.1.5. Efecto de la dieta rica en PUFAs sobre la expresión génica de las enzimas lipogénicas ACC, LPL Y SCoAD en el tejido intramuscular y subcutáneo

Son escasos los trabajos realizados sobre las implicaciones de la modificación de la dieta en la expresión génica de enzimas encargadas de la síntesis y acumulación de ácidos grasos en ganado ovino.

Bas *et al.* (2007) estudiaron el efecto de la inclusión de semillas de lino en la dieta (0%, 3%, 6% y 9%) en la composición de AGs del músculo y tejido adiposo de corderos. En este caso observaron que la actividad de la enzima SCoAD aumentaba en una pequeña proporción en animales alimentados con un suplemento de lino del 3%

respecto al control (0% de lino), en cambio, la actividad sufrió una disminución en los corderos de los grupos lino 6% y 9%.

Duckett *et al.* (2008) estudiaron el efecto de la dieta en la expresión de genes asociados con la síntesis y metabolismo de los AGs en ganado bovino. Estos autores estudiaron el efecto de diferentes tipos de alimentación: pasto, pasto y aceite de maíz (rica en ácido linoléico), concentrado (maíz y soja) y pasto y grano de maíz, en la expresión de las enzimas ACC, LPL y SCoAD. Encontraron que la expresión de la ACC disminuía en los animales alimentados con concentrados o maíz grano o aceite en combinación con pasto respecto a los animales alimentados solamente con pasto. También observaron diferencias en la expresión de la SCoAD; en animales alimentados con concentrado y pasto-grano o aceite de maíz la expresión del gen aumenta frente a los alimentados solamente con pasto. En el caso del tratamiento con pasto y aceite de maíz, se observó una tendencia al incremento de la (P=0,068). Por otro lado, no encontraron diferencias en la expresión de la LPL en los animales alimentados con los diferentes tratamientos.

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

Joseph *et al.* (2010) utilizando tratamientos similares a los utilizados por los anteriores autores, observaron que la expresión de SCoAD era mayor en los animales alimentados con concentrado o pasto-grano de maíz o pasto-aceite de maíz respecto a los alimentados con pasto. El resultado obtenido por estos autores utilizando los mismos tratamientos para la alimentación de los animales coincide resultado al que llevaron (Duckett *et al.*, 2008).

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

Otros autores analizaron el efecto de la inclusión en la dieta del DHA y/o EPA sobre el nivel de RNAm de la SCoAD en bovino. Waters *et al.* (2009) estudiaron el efecto de diferentes dietas: un grupo control que contenía un 6% aceite de soja, rica en ALA y sobre todo en LA, un segundo grupo con la misma cantidad de soja y un 1%

aceite de pescado (alto contenido en DHA y EPA) durante 100 días y un tercer grupo alimentado con un 6% de soja y 2% aceite de pescado (100 días) sobre la expresión de dicha enzima.

Observaron que la expresión génica de SCoAD decreció significativamente en el grupo que contenía un 1% de aceite de pescado y un 2% respecto al control, y también hubo una tendencia a disminuir en el lote con el mayor porcentaje de aceite de pescado comparando con el que contenía menor cantidad, es decir, el nivel de RNAm disminuyó al aumentar la cantidad de PUFAs en la dieta.

Waters *et al.* (2009) también estudiaron el efecto del nivel de EPA en la regulación transcripcional de la SCoAD en cultivo *in vitro* de células IM de bovino. Los resultados coinciden con los obtenidos *in vivo* por los mismos autores, ya que la suplementación del medio de cultivo tanto con 50 ó 100 μ M de EPA provocó la disminución de la expresión de la enzima respecto al control de forma significativa.

Actualmente, se utilizan estrategias de alimentación para los rumiantes basadas en la utilización de materias primas ricas en PUFAs n-3, con el objeto de modificar la composición de los AGs de su carne. Estudios previos han demostrado que este tipo de alimentación rica en PUFAs aumenta la composición de estos AGs en el músculo pero reprime la expresión de alguna de las enzimas que forma parte de las vías para la síntesis de estos AGs (Ntambi, 1992; Bernard *et al.*, 2005), por lo que no se obtiene el enriquecimiento esperado en estos AGs. Debido a que los estudios realizados en ganado ovino son escasos sería interesante estudiar el efecto la inclusión de PUFAs n-3 en la expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico.

1.2. OBJETIVOS

La finalidad del presente Trabajo Fin de Máster es analizar el efecto de la inclusión de materias primas ricas en PUFAs como son el lino, con un alto contenido en ALA y LA, y las microalgas, ricas en DHA y EPA, en la expresión génica de las enzimas implicadas en la síntesis y acumulación de ácidos grasos en los depósitos intramuscular y subcutáneo de corderos de Raza Navarra.

El objetivo específico planteado es el de determinar si alguna de las enzimas presentan una expresión diferencial en los animales que ingirieron dietas que diferían en el nivel de PUFAs. Para ello, se realizará la cuantificación del nivel de expresión génica de los genes utilizando la técnica de la RT-PCR a tiempo real.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. MATERIAL

2.1.1. Material animal

Para la realización de este estudio se han utilizado un total de 33 corderos de raza Navarra. Los animales se ubicaron en la finca experimental “El Serrón” propiedad del Instituto Técnico de Gestión Ganadero de Navarra (ITG Ganadero) situada en Valtierra (Navarra).

Teniendo en cuenta el peso, la edad y el tipo de parto se establecieron tres lotes, de 11 corderos cada uno, con los siguientes pesos medios de cada lote al inicio de la experiencia: lote C 16,24 Kg, lote L 16,32 Kg y el lote LA 16,37 Kg. Las dietas correspondientes fueron las siguientes: el lote C (control) recibió un pienso comercial, agua y paja *ad libitum*, común con todos los lotes; la dieta del lote L incluía un 10% de lino y al lote LA se le administró un 5% de semilla de lino y 3,75% de microalgas.

En las siguientes tablas se presenta la composición de los piensos utilizados:

Tabla 1. Composición en materias primas de los piensos utilizados (% materia fresca).

| <i>Materia prima</i> | <i>Lote C</i> | <i>Lote L</i> | <i>Lote LA</i> |
|---------------------------------|---------------|---------------|----------------|
| Cebada | 74,03 | 64,19 | 65,79 |
| Soja 44 | 22,37 | 16,68 | 19,10 |
| Valomega 160 | 0 | 15,53 | 7,76 |
| Martek DHA Gold | 0 | 0 | 3,75 |
| Carbonato cálcico | 1,76 | 1,76 | 1,76 |
| Bicarbonato sódico | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| Cloruro sódico | 0,50 | 0,50 | 0,50 |
| Micromix corderos* ² | 0,3 | 0,3 | 0,3 |
| Tastex+638* ³ | 0,04 | 0,04 | 0,04 |

*²complejo vitamínico mineral. *³aromatizante y saborizante.

Tabla 2. Composición química de los piensos utilizados (% en materia fresca).

| <i>Materia prima</i> | <i>Lote C</i> | <i>Lote L</i> | <i>Lote LA</i> |
|----------------------|---------------|---------------|----------------|
| E.M. (Mcal/Kg.) | 2,70 | 2,75 | 2,82 |
| Proteína bruta (%) | 14,56 | 14,35 | 14,48 |
| Fibra bruta (%) | 4,64 | 4,83 | 5,08 |
| Materia grasa (%) | 2,11 | 4,50 | 6,32 |
| Cenizas (%) | 5,52 | 5,94 | 6,02 |

Tabla 3. Composición analítica del producto Valomega 160 y Martek DHA Gold (% Kg. bruto).

| <i>Constituyentes analíticos</i> | <i>Valomega 160 (%)</i> | <i>Market DHA Gold (%)</i> |
|----------------------------------|-------------------------|----------------------------|
| Humedad | 6,80 | 2,03 |
| Proteína bruta | 20,43 | 16,66 |
| Fibra bruta | 12,07 | 4,5 |
| Materia grasa bruta | 28,38 | 55,57 |
| Cenizas | 4,76 | 8,81 |
| Ácido linolénico (Omega 3) | 15,70 | - |
| Ácido linoleico (Omega 6) | 4,70 | - |
| Ácido docosahexaenoico (DHA) | - | 42,3 |
| Ácido eicosapentaenoico (EPA) | - | 1,9 |

Los corderos se sacrificaron cuando alcanzaron un peso vivo de 26 Kg y se analizaron los parámetros de crecimiento y cebo (Tabla 4). Se observa que la diferente composición de los piensos utilizados no tuvo efecto sobre el crecimiento de los corderos ni en el índice de conversión (IC) del alimento del lote C y lote L, en cambio, el lote LA mostró crecimientos más bajos y un IC mayor. En general, las características de la canal de los tres lotes no mostraron diferencias, sin embargo, los corderos del lote L y LA presentaron mayor engrasamiento, que pudo ser debido a la mayor cantidad de energía metabolizable de la dieta causada por la inclusión del lino y las microalgas.

Tabla 4. Parámetros de crecimiento y cebo de los corderos (Seminario, 2011).

| | <i>Lote C</i> | <i>Lote L</i> | <i>Lote LA</i> | <i>EE</i> | <i>Signif.</i> |
|-------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------|----------------|
| GMD cebo (g/d) | 398,43 ^a | 366,82 ^a | 237,43 ^b | 22,68 | 0,000 |
| PV sacrificio (kg) | 27,08 ^a | 27,35 ^a | 25,85 ^b | 0,39 | 0,002 |
| Edad sacrificio (d) | 80,64 ^a | 85,91 ^a | 99,00 ^b | 3,61 | 0,000 |
| IC cebo (kg/kg) | 2,63 | 2,80 | 3,47 | *2 | *2 |
| Estado de engrasamiento | 4,91 ^b | 6,55 ^a | 6,82 ^a | 3,10 | 0,035 |
| % Grasa intramuscular | 3,12 | 2,43 | 5,59 | 1,86 | ns |
| Grasa subcutánea (g) | 10,55 | 14,99 | 12,68 | 1,90 | 0,082 |

*¹ns: no significativo.

*²No hay dato debido a que la medida del parámetro se hizo por lote.

La utilización de una dieta rica en lino y microalgas produjo diferencias en la composición de los ácidos grasos (AGs), como se ilustra en la siguiente tabla (tabla 5). En el tejido IM, tanto en el grupo L como en el grupo LA, los AGs VA, ALA, PUFAs n-3 y el EPA presentaron un aumento significativo respecto al grupo C (P<0,01), el DHA también aumentó de forma significativa en el grupo LA frente al C, sin embargo,

en el lote L no aumentó. Por otro lado, en el LA y 9c11t-CLA no se observaron diferencias entre los tres grupos. Al igual que en el tejido SC el índice n-6/n-3 disminuyó con la inclusión del lino y las microalgas ($P<0,001$).

Respecto a la composición de AGs en el tejido SC, la inclusión del lino (lote L), rico en ALA y LA, produjo un aumento respecto al grupo control ($P<0,001$) del ácido vaccénico (VA), ácido alfa linolénico (ALA), ácido linoleico (LA), el 9c11t-CLA y n-3 PUFA, en cambio, el DHA y EPA no presentaron variación. La inclusión de las microalgas (ricas en DHA y EPA) junto con el lino también produjo un aumento del VA, ALA y n-3 PUFA respecto al C ($P<0,001$), sin embargo, el LA y el 9c11t-CLA no cambiaron. En el lote LA también se produjo el aumento del DHA y EPA que no se observó en el grupo L. En ambos grupos el ratio n-6/n-3 disminuyó significativamente respecto al grupo control ($P<0,001$).

Tabla 5. Efecto de la dieta en la composición en ácidos grasos de la grasa intramuscular (IM) y subcutánea (SC) en corderos de Raza Navarra (%) (media y error estándar) (Adaptado de Insausti *et al.*, 2011).

| | Lote C | | Lote L | | Lote LA | | EE | | Signif. | |
|---------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|------|------|-----------------|-----|
| | IM | SC | IM | SC | IM | SC | IM | SC | IM | SC |
| C18:1t11 (VA) | 2,88 ^a | 6,66 ^a | 7,04 ^b | 13,41 ^b | 7,93 ^b | 11,53 ^c | 0,53 | 0,49 | *** | *** |
| C18:2n6 (LA) | 7,77 | 0,10 ^a | 6,78 | 1,18 ^b | 5,97 | 0,50 ^c | 0,09 | 0,14 | ns [*] | *** |
| C18:3n3 (ALA) | 0,40 ^a | 0,37 ^a | 1,84 ^b | 1,92 ^b | 0,89 ^c | 0,84 ^c | 0,02 | 0,05 | *** | *** |
| 9c11t-CLA | 0,12 | 0,16 ^a | 0,11 | 0,15 ^a | 0,16 | 0,11 ^b | 0,09 | 0,01 | ns | *** |
| C20:5n3 (EPA) | 0,19 ^a | 0,07 ^a | 0,74 ^b | 0,10 ^a | 1,01 ^b | 0,21 ^b | 0,02 | 0,01 | *** | *** |
| C22:6n3 (DHA) | 0,05 ^a | 0,02 ^a | 0,08 ^a | 0,04 ^a | 0,99 ^b | 0,58 ^b | 0,47 | 0,03 | *** | *** |
| SFA | 48,89 ^a | 49,85 ^a | 47,48 ^a | 49,93 ^a | 50,74 ^b | 54,75 ^b | 0,70 | 0,82 | *** | *** |
| MUFA | 37,14 ^a | 42,17 ^a | 36,34 ^a | 40,99 ^a | 33,77 ^b | 38,05 ^b | 0,61 | 0,68 | ** | ** |
| PUFA | 12,19 | 4,57 ^a | 14,21 | 5,84 ^b | 13,85 | 4,51 ^a | 0,01 | 0,23 | ns | *** |
| PUFA/SFA | 0,25 ^a | 0,10 ^b | 0,30 ^b | 0,12 ^a | 0,27 ^{ab} | 0,08 ^b | 0,69 | 0,00 | * | ** |
| n6 | 10,96 | 4,04 ^a | 9,75 | 3,70 ^{ab} | 10,86 | 3,25 ^a | 0,37 | 0,19 | ns | * |
| n3 | 1,04 ^a | 0,49 ^a | 4,32 ^b | 2,10 ^b | 2,77 ^b | 1,17 ^c | 0,53 | 0,05 | *** | *** |
| n6/n3 | 10,46 ^a | 8,32 ^a | 3,76 ^b | 1,78 ^b | 4,44 ^b | 2,82 ^c | 0,02 | 0,19 | *** | *** |

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

2.1.2. Sacrificio y toma de muestras para el análisis de la expresión génica

Los corderos se sacrificaron en el matadero comercial “La Protectora”, situado en Pamplona, teniendo en cuenta los protocolos aprobados por el establecimiento de acuerdo a la normativa vigente, cuando alcanzaron los 26 Kg.

Después de sacrificar y eviscerar los animales se procedió a la toma de muestras de los diferentes depósitos grasos; el IM a la altura de la décima costilla del músculo *Longissimus Dorsi* y el SC en la base de la cola.

Las muestras obtenidas, cada una de 5 g aproximadamente, fueron congeladas en nitrógeno líquido a -196 °C. En el laboratorio, las muestras se guardaron a -80 °C.

2.2. METODOLOGÍA PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE ENZIMAS IMPLICADAS EN LA SÍNTESIS Y ACUMULACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS.

2.2.1. Obtención de mRNA total

2.2.1.1. Obtención de mRNA de tejido graso intramuscular

El primer proceso realizado consiste en la preparación del tejido para la extracción. Para ello, se cortó y desmenuzó una pequeña porción de la muestra y se pulverizó con nitrógeno líquido, en un mortero previamente enfriado. Después, se pesaron 250 mg en un tubo, rápidamente se añadió 1 ml de Trizol y se agitó en el agitador automático durante 15 s. Posteriormente, se incubaron las muestras a temperatura ambiente durante 5 min, se centrifugaron 10 min a 12.000 g y 4°C. Se transfirió la fase acuosa a un nuevo tubo. Se añadieron 200 µl de cloroformo, agitando manualmente durante 15 s. Posteriormente, se incubó 3 min a T^a ambiente, se centrifugó durante 15 min a 12.000 g y -4°, se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se añadió un volumen igual de etanol 70%.

Para la extracción de RNA, se añadieron 700 µl del filtrado obtenido a una columna de GenElute Binding Column, se centrifugó a 12.000 g durante 15 s. Seguidamente, se añadieron 500 µl de la Wash Solution 1 a la columna y se centrifugó a 12.000 g 20 s. Tras transferir la columna a un nuevo tubo eppendorf, se añadieron 500 µl de Wash Solution 2 Concentrate y se centrifugó a 12.000 g durante 30 s. Se repitió este último procedimiento, centrifugando durante 2 min. Posteriormente, se centrifugó durante 1 min a máxima velocidad. Por último, se transfirió la columna a un nuevo tubo

ependorf, se añadieron 50 µl de Elute Solution y se centrifugó a 12.000 g durante 1 min y se congelaron las muestras a -80°C.

2.2.1.2. Obtención de mRNA de tejido graso subcutáneo

La extracción de mRNA se realizó utilizando el kit de extracción RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen).

Para llevar a cabo este procedimiento, se pesaron 100 mg de tejido graso y se homogenizaron en un con nitrógeno líquido hasta que al tejido quedó pulverizado. A continuación, se homogeneizó la muestra añadiendo 1 ml de QIAzol Lysis Reagent y se dejó reposar durante 5 min a temperatura ambiente.

Después, se añadieron 200 µl de cloroformo, se agitó durante 15 s y se dejó reposar 2-3 min a T^a ambiente. Posteriormente se centrifugó a 12.000 g a 4 °C y 15 min. Tras la centrifugación se obtuvieron tres fases, la fase superior que contenía el mRNA se transfirió a un nuevo tubo, se añadió un volumen de etanol al 70% y se agitó en el agitador automático. Se traspasó la muestra a una columna de 2 ml, se centrifugó a 8.000 g, 30 s y, como en todos los casos tras la centrifugación, se desechó el eluido. Después, se añadieron 700 µl de Buffer RW1, se centrifugó a 8.000 g, 30 s, a -4°C. Posteriormente, se añadieron 500 µl de Buffer RPE a la columna y se volvió a centrifugar durante 15 s. Se repitió el proceso de centrifugación durante 2 min. A continuación, se colocó la columna en un nuevo eppendorf y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 min. Finalmente, se eluyó el mRNA colocando la columna en un tubo de 1,5 ml y se añadieron 50 µl de agua-DEPC se centrifugó durante 1 min a 8.000 g y se congeló la muestra a -80°C.

2.2.1.3. Tratamiento de DNAsas para muestras de ARNm del tejido intramuscular y subcutáneo

Se realizó un tratamiento con DNAsas para evitar la posible interferencia del ADN contaminante. Para ello, se utilizó el Kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega).

De acuerdo con el protocolo se añadieron en un tubo eppendorf 8 µl del extracto de RNA, 1 µl de buffer RQ1 DNasa 10X 1 unidades/µg de RNA de la enzima RQ1 DNasa y agua DEPC hasta ajustar un volumen final de 10 µl y se incubó a 37°C durante 30 min. A continuación se añadieron 2,25 µl de la solución RQ1 DNase Stop Solution. Finalmente, se incubó a 65°C durante 10 min para parar la reacción y se conservó la muestra a -80 °C hasta su utilización.

2.2.2. Cuantificación del ARNm del depósito intramuscular y subcutáneo

Las muestras se cuantificaron mediante el espectrofotómetro de forma que se obtuvo la concentración de ARN (ng/ μ l) de cada muestra, la absorbancia y el cociente A_{260} / A_{280} , indicativo del grado de pureza de la muestra. En el caso del ARN, debe estar entre 1,8 y 2.

2.2.3. Obtención de cDNA a partir de ARNm por medio de la reacción de la transcriptasa inversa en el depósito intramuscular y subcutáneo

Para llevar a cabo la obtención de cDNA a partir de ARNm se realizó el siguiente procedimiento: se colocaron en un tubo 1 μ l de Oligo dT (500 μ g/ml), 1 μ l de dNTPs (10 mM), 4 μ l de RT Buffer 5X (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl y 15 mM $MgCl_2$), 4 μ l en DTT (0,1 M), 1 μ l de Rnase out (40 U/ μ l), 1 μ l de la enzima retrotranscriptasa M-MLV RT (200 U/ μ l) (casa comercial Promega), la cantidad de RNA necesaria para añadir una cantidad total de 1500 ng y por último, X μ l de H_2O DEPC hasta un volumen total de 20 μ l.

Posteriormente, se incubaron las muestras a 42°C durante 1 hora, después, se inactivó la enzima en hielo durante 10 min y se cuantificó el cDNA obtenido de la misma forma que se realiza con el ARNm.

2.2.4. Amplificación cualitativa de marcadores a partir de cDNA.

2.2.4.1. Diseño de los cebadores

Para el diseño de los cebadores utilizados en este trabajo se utilizó el programa informático Primer 3, para la búsqueda de las secuencias de los ARNm se realizó utilizando la base de datos GenBank y el programa informático Blast para el alineamiento de las secuencias de ARNm.

En la siguiente tabla 6 se recogen los cebadores utilizados en este trabajo.

Tabla 6. Características de los cebadores utilizados en el trabajo.

| <i>Nombre del gen</i> | <i>Secuencia</i> | <i>Producto amplificado (pb)</i> |
|------------------------------------|---|----------------------------------|
| β actina (N° acceso: U39357) | <i>Forward (F)</i> -CTCACGGAGCGTGGCTACA <i>Reverse (R)</i> -GCCATCTCCTGCTCGAAGTC | 107 |
| ACC (N° acceso: X80045) | <i>F</i> -ATGACCTTAACAGCCGCAGAGT <i>R</i> -CTATTACACAGCCCGGGTCAAG | 82 |
| LPL (N° acceso: NM_001009394) | <i>F</i> -TCATCGTGGTGGACTGGCT <i>R</i> -CATCCGCCATCCAGTTCATA | 111 |
| SCoAD (N° acceso: NM_001009254) | <i>F</i> -GAG TAC CGC TGG CAC ATC AA <i>R</i> -CTA AGA CGG CAG CCT TGG AT | 103 |

2.2.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR cualitativa).

En el presente trabajo, la PCR cualitativa se ha utilizado tanto para comprobar el correcto funcionamiento de los cebadores diseñados como para obtener el producto de PCR para la posterior clonación del producto amplificado en la PCR.

La mezcla para la reacción utilizado fue la siguiente: 1,25 μ l de Taq polimerasa (5U/ μ l) de Biotools; 2,5 μ l de tampón 10X (Biotools), 0,75 μ l de Cl_2Mg (50mM; Biotools); 0,5 μ l de dNTPs (10 mM); 0,8 μ l de los cebadores forward y reverse (10 mM; Invitrogen), 16,4 μ l ddH₂O y 2 μ l de cDNA (40-100 ng/ μ l).

La amplificación se realizó en un termociclador (Applied Biosystem) bajo las condiciones: 5 min a 94°C (desnaturalización del ADN); 40 ciclos de amplificación cada una de 30 s a 94 °C (fase de desnaturalización), 30 s a 60 °C (fase de anillamiento) y 30 s a 72 °C (fase de extensión) y la extensión final durante 10 min a 72 °C.

Posteriormente, las bandas de ADN se visualizaron mediante una electroforesis en un gel de agarosa (2%) teñido con SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen).

2.2.5. Amplificación de los marcadores de diferenciación mediante PCR cuantitativa (RT-PCR a tiempo real).

Previamente a la realización de la PCR cuantitativa para analizar el nivel de expresión génica de las diferentes enzimas, es necesario comprobar que las eficiencias de los cebadores son similares y mayores que el 90%. Por ello, se llevó a cabo la clonación para conocer el número de moléculas amplificadas en la PCR cuantitativa.

2.2.5.1. Clonación de los productos amplificados

Tras realizar la PCR cualitativa, se visualizó el fragmento de interés en un transiluminador horizontal (BioRad) y se separó el trozo del gel que lo contenía. Posteriormente, se realizó la extracción con el kit comercial NucleoSpin Extract II.

A continuación, se procedió a realizar la ligación de cada uno de los productos de PCR con el vector plasmídico pGEM-T-Easy de 3015 pares de bases (Promega) teniendo en cuenta el protocolo proporcionado por el fabricante. Se añadieron 4 µl del producto de ligación a 200 µl de células *E. Coli* quimiocompetentes y se incubaron en hielo durante 20 min. Para permitir la entrada del plásmido con el inserto en las células se realizó un choque térmico de 42°C durante 2 min y 4°C durante 2 min. Después, se añadieron 800 µl de medio LB líquido y tras incubarlo durante 50 min (37 °C a 250 rpm) se sembraron en placas de LB agar que contenían ampicilina (100 mg/ml), IPTG (100 mM) y X-Gal (40 mg/ml). Se incubaron durante 24 h en una estufa a 37°C de forma que crecieron colonias blancas y azules. Las colonias blancas, que contenían el inserto, se incubaron en tubos de vidrio con 4 ml de LB suplementado previamente con 9 µl de ampicilina. Posteriormente, se incubaron las colonias 16-20 h a 37°C y en agitación y se procedió a la extracción del plásmido de las bacterias con el kit Illustra™ plasmidPrep Mini Spin (GE Healthcare) teniendo en cuenta las indicaciones del fabricante, obteniendo el vector plasmídico eluido en 50 µl de buffer de elución.

Finalmente, se comprobó la existencia del inserto en el plásmido extraído. Para ello, se realizó una digestión con la enzima de restricción EcoRI (Invitrogen). La mezcla de digestión que estaba formada por 5 µl de plásmido, 1 µl de EcoRI, 2 µl de buffer 10X H (Invitrogen) y 12 µl de agua destilada y se incubó durante 1 h a 37°C. Se añadió el tampón de carga de la electroforesis para detener la reacción y se comprobó la digestión realizando una electroforesis en un gel de agarosa (2%) con SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen). Se observó una banda de 3000 pb correspondiente al vector pGEM-T-Easy y otra banda a una altura de 80-200 pb correspondiente a cada gen.

2.2.5.2. Curvas estándar y análisis de eficiencia.

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

$$\text{N}^\circ \text{ moléculas}/\mu\text{l} = [\text{ADN}] (\text{ng}/\mu\text{l}) \times 1(\text{g})/10^9 \times 1(\text{mol})/\text{PM} \times \text{N}^\circ \text{ de Avogadro}/1(\text{mol})$$

Siendo, [ADN]: la concentración de ADN; N° de Avogadro: número de moléculas/mol y PM: peso molecular del plásmido y el inserto (PM=PM del plásmido x peso medio de una base nitrogenada (326,95 g/mol) + PM x 326,95 g/mol).

Una vez conocido el número de moléculas, se realizaron diluciones seriadas 1:10, posteriormente, se realizó una PCR cuantitativa con las diluciones de 10^6 a 10^0 . Para evitar resultados erróneos debidos a errores de pipeteo, las muestras se procesan por triplicado y dispensando con una pipeta automática.

La mezcla de reacción para la PCR cuantitativa esta compuesta por: 0,6 µl del cebador forward, 0,6 µl del cebador reverse, 8,8 µl de agua miliQ y 5 µl del SYBR Green PCR master Mix (Applied Biosystems) y 5 µl de la muestra, que corresponden a las diluciones de los plásmidos purificados clonados previamente.

Se pipetearon 20 µl de cada reacción a cada uno de los pocillos de la placa MicroAmp Optical 96-well reaction plate (Applied Biosystem), la reacción de amplificación tubo lugar en el termociclador (Applied Biosystem) bajo las siguientes condiciones de programa: una etapa inicial de 2 min a 50°C y 10 min a 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95°C y 1 min a 60°C y por último, una etapa de disociación de 15 min-95°C, 15 min-60°C y 15 min 95°C.

Terminada la amplificación, se comprueba que no se hayan producido amplificaciones indeseadas, es decir, picos extraños en la *curva de disociación* facilitada por el programa SDS2.2.2.

Mediante el programa informático Microsoft Office Excel, se realizan las curvas estándar de los marcadores y el gen control, representando los valores medios de los Ct's frente a las diferentes diluciones. Las características ideales de las curvas deben ser las siguientes: -3,34 de pendiente y un índice de correlación, R^2 , mayor que 0,97.

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

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

2.2.5.3. Cuantificación del nivel de expresión de enzimas implicadas en la síntesis y acumulación de los ácidos grasos.

Tras obtener las eficiencias de todos los marcadores y comprobar que son similares y superiores al 90%, se procede a analizar la expresión de cada uno de los genes de interés.

El gen control utilizado ha sido la β actina, previamente se ha comprobado que su expresión no varía con diferentes tratamientos de forma que se puede utilizar como referencia. Además, se observó que los coeficientes de variación de los Ct's de cada placa de qPCR eran valores bajos y similares entre placa (0,02, 0,01 y 0,02, en el depósito SC; 0,02, 0,02 y 0,04, en el IM. Lote C, L y LA, respectivamente).

A la hora de realizar la cuantificación mediante la RT-PCR a tiempo real existen dos alternativas con la forma de proceder con las muestras de cDNA, por un lado, ejecutar la técnica partiendo de muestras individuales (en este caso 33 muestras), y por otro lado, realizar muestras colectivas o “pooles”, es decir, mezcla de muestras de cDNA provenientes de diferentes animales todos ellos alimentados con la misma dieta.

Se decidió utilizar mezclas colectivas de los 11 animales de cada lote, debido a que en estudios anteriores se observó que el error estándar (0,53 vs. 0,25, muestras colectivas y pooles, respectivamente.) y el coeficiente de variación (0,13 vs. 0,04) de los resultados de la qPCR realizada con “pooles” era menor.

2.2.5.4. Método de análisis de resultados

El nivel de expresión de cada uno de los marcadores implicados en la síntesis y acumulación de ácidos grasos se ha determinado mediante el “*Método comparativo de Ct's*”.

Este método se basa en la comparación de los Ct's de las muestras en estudio con los valores de los Ct's del gen control. En primer lugar, se calcula el valor de ΔCt , diferencia entre el valor de Ct del gen problema y el valor de Ct de gen control o housekeeping ($\Delta Ct = Ct \text{ gen problema} - Ct \text{ gen referencia}$).

Posteriormente, se calcula el $\Delta\Delta Ct$ ($\Delta Ct \text{ muestra} - \Delta Ct \text{ calibrador}$), siendo el calibrador un momento concreto (horas, días, etc.) o un tratamiento concreto tomado como referencia, en este caso, es el grupo denominado control. Además,

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

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

Finalmente, se eleva 2 a $-\Delta\Delta Ct$ y se representa gráficamente para los tres lotes.

2.2.5.5. Análisis estadístico

El estudio estadístico de los valores de expresión génica de las enzimas estudiadas se realiza con el programa informático SPSS Statistics 18.0.

El análisis de la varianza se realiza con el test de ANOVA de un factor, siguiendo el siguiente modelo:

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

Donde:

Y_{ij} : parámetros medios del nivel de expresión de ACC, LPL y SCoAD.

μ : media de la población considerada.

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

e_{ij} : error residual aleatorio.

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

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

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. RESULTADOS

3.1.1. Análisis de eficiencia de los cebadores.

La eficiencia de los cebadores se calculó a partir de la pendiente (y) y el coeficiente de determinación múltiple (R^2) de las curvas estándar obtenidas a partir de los resultados de la qPCR tras la clonación (descrito en el apartado 4.2.5.2 de Material y Métodos).

A continuación se presentan las curvas estándar de los genes estudiados.

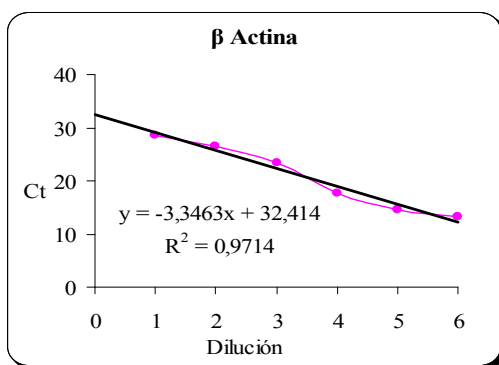


Figura 6. Curva estándar del gen β actina.

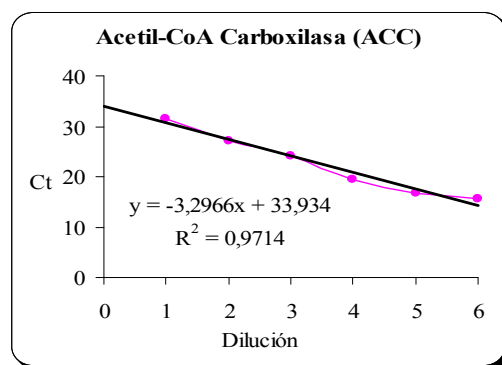


Figura 7. Curva estándar del gen ACC.

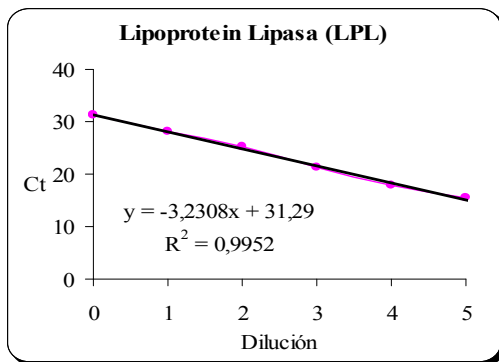


Figura 8. Curva estándar del gen LPL.

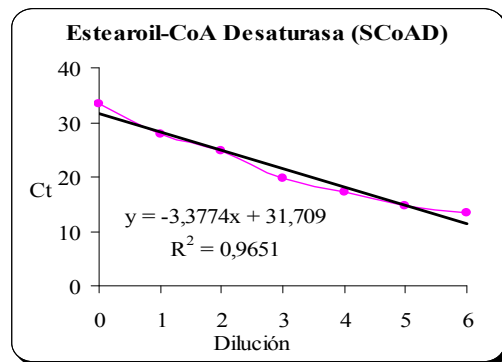


Figura 9. Curva estándar del gen SCoAD.

En la Tabla 7 se ilustran las eficiencias de amplificación obtenidas en la qPCR.

Tabla 7. Eficiencias de amplificación de la RT-PCR a tiempo real.

| Gen | R^2 | Pendiente | Eficiencia (%) |
|----------------|-------|-----------|----------------|
| β Actina | 0,97 | -3,35 | 98,84 |
| ACC | 0,97 | -3,30 | 100 |
| LPL | 0,99 | -3,23 | 100 |
| SCoAD | 0,97 | -3,38 | 97,63 |

En la Tabla 7 se observa que las pendientes y las eficiencias de amplificación del gen control y los genes problema son similares, por lo que se cumplen las condiciones necesarias para realizar la cuantificación de la expresión génica tomando como referencia la β actina.

3.1.2. Análisis de la expresión génica de enzimas implicadas en la síntesis y acumulación de ácidos grasos

3.1.2.1. Expresión génica de las enzimas lipogénicas en el tejido adiposo intramuscular

3.1.2.1.1. Acetil-CoA Carboxilasa (ACC)

En la figura 10 se ilustra el nivel de la expresión del gen SCoAD para cada uno de los lotes estudiados.

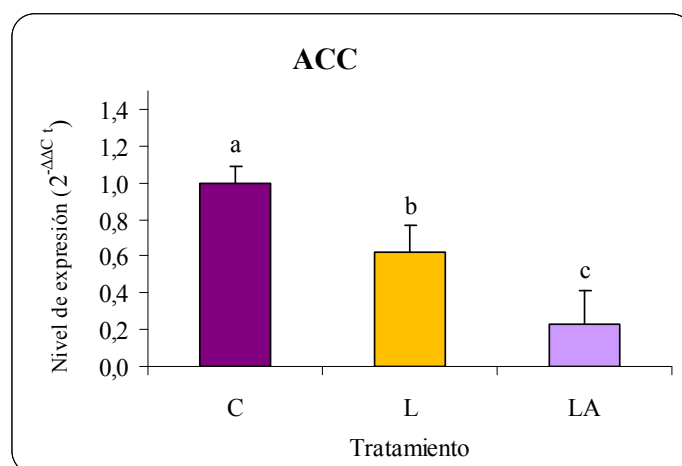


Figura 10. Representación gráfica de la expresión del gen ACC para cada tratamiento en el tejido IM (media \pm SEM, n=11). *a*, *b* y *c* indican los diferentes subconjuntos homogéneos ($P < 0,001$).

En la figura se observa que el nivel de expresión génica disminuyó ($P < 0,001$) tanto en el grupo rico en lino (0,93) como el grupo de animales alimentado con un 5% de lino y 3,75% de algas (0,38) frente al grupo control (1). Los resultados muestran que hubo una reducción en la síntesis *de novo* en el tejido intramuscular de los corderos alimentados solamente con lino y los alimentados con lino y algas.

3.1.2.1.2. Lipoprotein Lipasa (LPL)

En la figura 11 se presenta el nivel de expresión génica frente a los diferentes tratamientos, es decir, diferentes tipos de dietas, aplicados a los animales que componían cada lote. El gráfico muestra que tanto la inclusión de lino como la inclusión

de lino y algas produjo un incremento significativo ($P < 0,001$) sobre la expresión del gen LPL en el depósito IM.

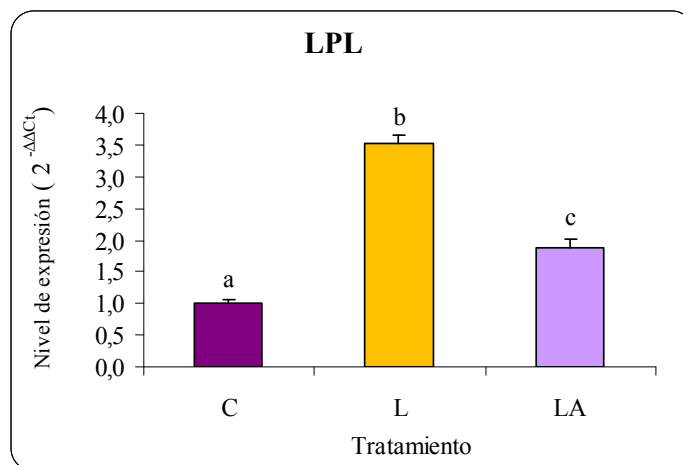


Figura 11. Representación gráfica del nivel de expresión del gen Lipoprotein Lipasa (LPL) para cada lote en el intramuscular (media \pm SEM, n=11). *a*, *b* y *c* indican los subconjuntos homogéneos ($P < 0,05$).

3.1.2.1.3. Esteroil-CoA desaturasa (SCoAD)

La alimentación proporcionada a los animales de los diferentes lotes ejerció un efecto sobre la expresión génica de la enzima esteroil-CoA desaturasa en el tejido intramuscular. La expresión génica de los lotes L y LA disminuye de forma estadísticamente significativa ($P < 0,001$) respecto al grupo control (1, 0,07, 0,51: C, L y LA, respectivamente) indicando que el cambio en la alimentación afectó a la transformación endógena de los PUFA.

En la figura 12 se representa gráficamente la expresión del gen SCoAD para cada uno de los lotes estudiados:

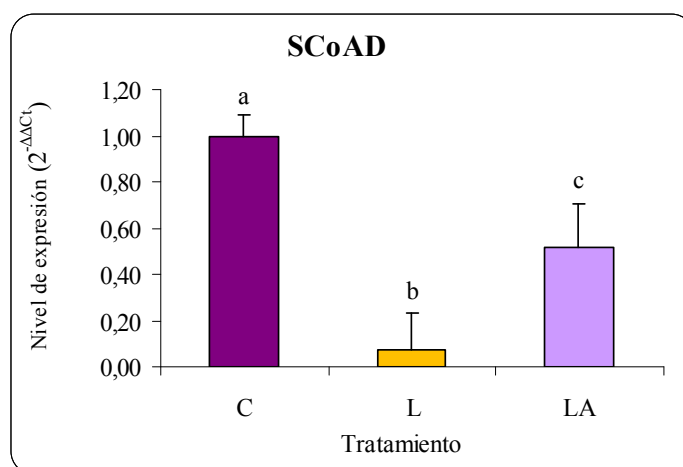


Figura 12. Representación gráfica de la expresión del gen SCoAD para cada lote en el tejido intramuscular (media \pm SEM, n=11). *a*, *b* y *c* indican los diferentes subconjuntos homogéneos ($P < 0,001$).

3.1.2.2. Expresión génica de las enzimas lipogénicas en el tejido adiposo subcutáneo

3.1.2.2.1. Acetil-CoA carboxilasa (ACC)

En el siguiente gráfico se ilustran los niveles de expresión de la ACC para los diferentes tratamientos estudiados en el tejido SC. Como se puede observar, la expresión aumentó ($P < 0,001$) en el lote lino (10%) y lino (5%) + algas (3,75%) respecto al grupo control, lo que sería indicativo que se produjo un aumento en la síntesis *de novo* de los AGs en el tejido subcutáneo de los animales.

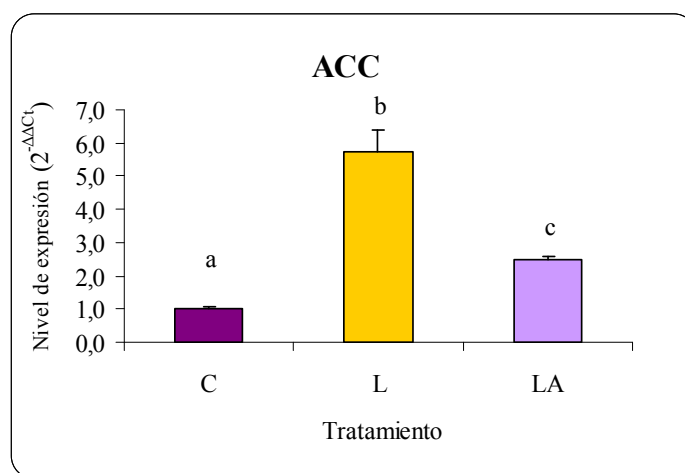


Figura 13. Representación de la expresión génica del gen ACC para cada lote en el tejido SC (media \pm SEM, n=11). *a*, *b* y *c* indican los subconjuntos homogéneos ($P < 0,001$).

3.1.2.2.2. Lipoprotein lipasa (LPL)

La figura 14 ilustra gráficamente los niveles de expresión de la LPL para los diferentes lotes establecidos. Se puede observar que el nivel de expresión disminuye de forma significativa ($P < 0,05$) en el lote que contenía un 10% de lino respecto al lote control en el depósito sin embargo, no se observaron diferencias respecto al grupo lino + algas. Por otra parte, la inclusión del lino y algas no afectó a la expresión de esta enzima con respecto al grupo control, tampoco su expresión fue diferente del grupo lino. Los resultados indicarían que no se produjo un aumento en la incorporación de los PUFA provenientes de la dieta desde los capilares a las células del tejido adiposo.

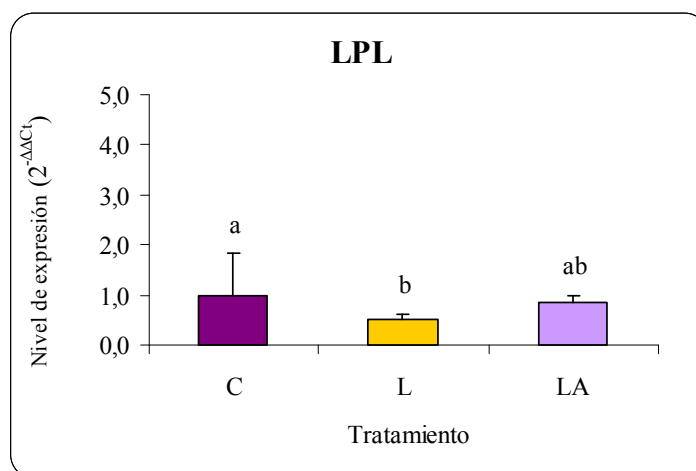


Figura 14. Representación del nivel de expresión del gen LPL para cada lote en el SC (media \pm SEM, n=11). *a* y *b* indican los diferentes subconjuntos homogéneos ($P < 0,05$).

3.1.2.2.3. Estearoil-CoA desaturasa (SCoAD)

En la figura 15 se muestra la representación gráfica de la expresión del gen SCoAD para cada uno de los lotes estudiados.

El tipo de dieta proporcionada a los animales de los diferentes lotes de animales mostró un efecto sobre la expresión génica de la enzima estearoil-CoA desaturasa en el tejido SC. El nivel de expresión génica del lote alimentado con lino al 10% es significativamente mayor ($P < 0,001$) que el lote control, sin embargo, la expresión de la SCoAD disminuye ($P < 0,001$) en el lote LA, cuya alimentación fue rica en lino (5%) y algas (3,75%), respecto al lote control. Estos resultados son indicativos de que el tipo de alimentación afectó a la transformación endógena de los AGs provenientes de la dieta de forma diferente en los dos depósitos.

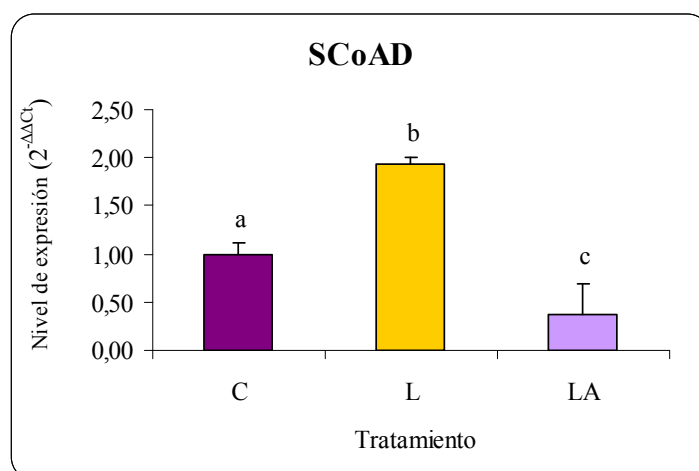


Figura 15. Representación de la expresión del gen SCoAD para cada lote en el tejido SC (media \pm SEM, n=11). *a*, *b* y *c* indican los subconjuntos homogéneos ($P < 0,001$)

3.2. DISCUSIÓN

A la vista de los resultados obtenidos en el presente Trabajo Fin de Máster se observa que el efecto sobre la expresión génica de los genes implicados en el metabolismo lipídico es diferente en los depósitos estudiados, por lo que la discusión de estos resultados se realizará en dos subapartados distintos.

Esta diferente respuesta de los depósitos seguramente estará relacionada con el diferente grado de desarrollo de los depósitos (precocidad), ya que el tejido subcutáneo es un depósito que en el momento del crecimiento de los corderos está acumulando más grasa que otros depósitos como el intramuscular (Arana *et al.*, 1998; Soret *et al.*, 1998). Asimismo, los resultados de cultivo *in vitro* de adipocitos de los diferentes depósitos también han mostrado una respuesta diferente a los factores que estimulan su desarrollo (Soret *et al.*, 1999).

3.2.1. Efecto de la dieta rica en lino y microalgas sobre la expresión génica de enzimas lipogénicas en el tejido intramuscular en ganado ovino

En el depósito intramuscular no se han observado diferencias entre los grupos de corderos en la cantidad de grasa depositada (Tabla 4 de Material y métodos), lo que nos indicaría que la acumulación de los TGs y AGs es similar en los corderos con los tres tipos de alimentación.

Los resultados referentes al decremento en la expresión génica de la acetil-CoA carboxilasa (ACC) en el tejido adiposo intramuscular del presente estudio dan soporte a la hipótesis de que un aumento en los PUFAs provenientes de la dieta, en este caso procedentes del lino y de las algas, inhibe la síntesis *de novo* de los AGs, ya que el gen ACC es uno de los genes más importantes de la síntesis *de novo* (figura 10, apartado 3.1.2.1.1 de Resultados).

Esta disminución de la síntesis *de novo* de AGs podría ser debida a que los PUFA provenientes de la alimentación servirían de base para ser esterificados a triglicéridos, por lo que no sería necesario que fueran sintetizados en la célula.

Además, como se ha observado en estudios previos realizados en humanos y ratones, parece ser que los PUFAs, particularmente los n-3, inhiben la síntesis *de novo* de los lípidos actuando sobre los factores de transcripción PPAR α , PPAR γ y SREBP-1 que provocan un aumento de la oxidación y una disminución de la biosíntesis de AGs (Clarke, 2001; Dentin *et al.*, 2005).

El nivel de expresión génica de la ACC del lote alimentado con lino y algas fue menor al lote alimentado solamente con lino, por lo que parece que cuanto más insaturados son los AGs es mayor la inhibición causada en la expresión de dicho gen, ya que el DHA y el EPA, presentes en gran cantidad en las algas, son AGs que presentan mayor insaturación que el ALA y LA provenientes del lino.

Joseph *et al.* (2010) observaron que la expresión de la ACC disminuyó en animales alimentados con concentrado ó maíz en combinación con pasto respecto a los animales alimentados solamente con pasto. Según Chilliard & Ferlay (2004) la hierba verde y fresca es la principal fuente de ALA, por lo tanto, esto podría explicar la menor expresión de la ACC en animales alimentados con pasto debido a su mayor contenido en PUFAs n-3. De hecho, Dervishi *et al.* (2011) y Hiller *et al.* (2011) indican una disminución en la expresión génica de la enzima, tanto en el depósito SC como el IM, en corderos alimentados con pasto en contraposición a los alimentados con concentrados, en ganado vacuno y ovino, respectivamente.

Por otro lado, al igual que en el presente trabajo en el que se observó un aumento de VA, Jayan & Herbein (2000) constataron que el incremento en la concentración de ácido oleico y sobre todo de VA, inhiben a la enzima ACC de la glándula mamaria, provocando una disminución en la expresión génica de la enzima.

La expresión génica de la lipoprotein lipasa (LPL) en el tejido IM aumento de forma significativa ($P < 0,001$) en los corderos alimentados con lino y algas (figura 11 del apartado 3.1.2.1.2 Resultados) frente al control alimentado con concentrados ricos en almidones.

El aumento de la cantidad de los PUFA provenientes de la dieta, mediante la inclusión del lino y del lino y algas, provocó un incremento en la absorción de los AGs, como lo demuestra la mayor cantidad de ALA, VA, DHA y EPA en el tejido IM (Insausti *et al.*, 2011). Esta mayor concentración de PUFAs podría haber incrementado la expresión génica de la enzima encargada de la captación desde la sangre de los AGs exógenos.

Los resultados de otros autores (Joseph *et al.*, 2010) indican que en bovino la alimentación a base de pasto, rica en PUFAs, presentó una mayor expresión ($P < 0,01$) del gen LPL que los animales alimentados con concentrados. Tsiplakou *et al.* (2009) también observaron un aumento en la expresión del gen con una alimentación a base de forraje, con alto contenido en PUFAs, frente al concentrado en la glándula mamaria de cabras.

Al igual que sucede en el presente trabajo, el aumento de la expresión podría ser debido a que el pasto contiene gran cantidad de AGs de cadena larga, al aumentar estos en la dieta de los animales la expresión de la enzima LPL aumenta, debido a que es la enzima encargada de la captación desde la sangre de AGs ingeridos.

Como se ha comentado anteriormente, los resultados del análisis histológico de los corderos del presente trabajo previamente obtenidos (Seminario, 2011) indican que la cantidad de grasa intramuscular acumulada por los animales de los lotes L y LA no presentó variación respecto al lote control. Sin embargo, la diferencia en la expresión de los genes ACC y LPL respecto al control fueron estadísticamente significativas, que es indicativo de que se puede haber producido un fenómeno de “compensación” entre la expresión de ambos genes, ya que el aumento en la expresión de la LPL en los lotes L y LA frente al control, por el aumento de los AGs exógenos en la sangre, se compensaría con la disminución de la expresión de la ACC con respecto al lote control.

En relación con la enzima SCoAD, enzima encargada de la síntesis de los MUFAs, el aumento de la cantidad de PUFAs provenientes de la dieta, mediante la inclusión del lino y algas (lote L y LA) provocó una disminución en la expresión génica de la SCoAD en el tejido IM de corderos.

En el análisis de la composición de los ácidos grasos se observa un aumento en la cantidad de VA en los animales alimentados con lino y algas frente al control (Insausti *et al.*, 2011), teniendo en cuenta que el 9c11t-CLA se forma a partir del VA por medio de la SCoAD, la cantidad de 9c11t-CLA tendría que haber incrementado. Este resultado de un aumento del VA y no del 9c11t-CLA a nivel celular corroboraría el resultado observado de disminución de la expresión génica del gen que codifica la enzima SCoAD.

Keating *et al.* (2006) observaron que los PUFAs provocan una reducción en la expresión génica del gen, debido a que estos AGs actúan sobre el factor de transcripción SREBP1 que a su vez regula la SCoAD. Además, en el estudio de la región promotora del gen encontraron una región conservada de unión a los PUFAs en humanos, ratas, pollos y ganado bovino que incluye el sitio de unión al SREBP1, de forma que los PUFAs actúan sobre él.

El nivel de expresión génica de la SCoAD del lote alimentado con lino fue menor al lote alimentado con lino y algas. Teniendo en cuenta lo que observaron otros autores (Chilliard & Ferlay, 2004), es decir, que la reducción de la expresión del gen es mayor cuanto mayor es el grado de insaturación de los AGs, la expresión debería haber

sido menor con la inclusión de las algas que contienen AGs más insaturados, sin embargo, no ocurrió así. La razón por la cual el grupo alimentado con lino y algas (lote LA) no presentó menor expresión que el lote alimentado con lino (lote L) puede ser debida a que el lote LA contiene mayor cantidad de ácido palmítico (C16:0), proveniente de las algas, que el lote L (Insausti *et al.*, 2011), el cual es sustrato de la enzima SCoAD. Como hay más sustrato, podría esperarse un aumento en la actividad de la enzima y paralelamente en la expresión del gen que la codifica. Por lo tanto, podría estar ocurriendo un fenómeno de “compensación” en la regulación de la SCoAD por medio de los AGs insaturados y saturados provenientes de la dieta.

En concordancia con lo observado en el presente trabajo, Herdmann *et al.* (2010) observaron que, tanto en el tejido IM como en el SC, la expresión génica de la SCoAD decreció en toros alimentados con ensilado de hierba, lino y colza, con alto contenido en ALA, frente a los animales alimentados con concentrado. Asimismo, Waters *et al.* (2009) concluyeron que una alimentación con aceite de pescado, rica en DHA y EPA, provocó un descenso en la expresión génica de la SCoAD en el tejido IM de bovino. Además, los autores en el estudio de cultivo *in vitro* de células intramusculares con el medio de cultivo suplementado con 50 ó 100 μ M de EPA indicó que la expresión del gen disminuyó frente a la expresión del gen de células sin suplementación en el medio de cultivo.

Por último, varios trabajos indican que la inclusión de PUFAs n-3 en la dieta afecta a la expresión génica de esta enzima. La inclusión de estos AGs en forma de pasto o forraje causaron una reducción en la cantidad de RNAm de la SCoAD (Duckett *et al.*, 2008; Tsiplakou *et al.*, 2009; Joseph *et al.*, 2010; Dervishi *et al.*, 2011) en el tejido SC de bovino, en la glándula mamaria de ovejas y cabras y en el depósito IM de ovino.

3.2.2. Efecto de la dieta rica en lino y microalgas sobre la expresión génica de enzimas lipogénicas en el tejido subcutáneo en ganado ovino

A diferencia de lo que se produjo en el depósito intramuscular, en el presente trabajo, la deposición de la grasa subcutánea fue mayor en el lote L y LA en comparación con el lote control, como se puede observar en la medida del estado de engrasamiento y la grasa subcutánea que se muestran en la tabla 4 de Material y métodos.

Como se ha comentado anteriormente, la cantidad de grasa acumulada en los tejidos de los animales puede provenir de dos fuentes, por un lado, por un aumento en la cantidad de AGs provenientes de la dieta y por otro lado, por la síntesis *de novo* llevada a cabo en la células.

Esta mayor acumulación de grasa podría estar favorecida por la activación de la síntesis *de novo* causada por la incorporación en los adipocitos de los ácidos grasos volátiles (AGV), uno de los cuales es el acetato el cual es primordial para la síntesis *de novo*. Dicha activación se ve reflejada en el aumento de la expresión génica de la ACC en el tejido subcutáneo de corderos alimentados con lino o con lino y algas frente a los animales del lote control (figura 13, apartado 3.1.2.2.1 de Resultados).

Sin embargo, la expresión génica de la LPL, enzima encargada de la captación de los ácidos grasos provenientes de la dieta desde los capilares hacia las células, fue menor en los corderos alimentados con lino e igual en los animales del lote LA (figura 14 del apartado 3.1.2.2.2 de Resultados) frente al control. La mayor actividad de la síntesis *de novo* celular podría haber influido en que no sea necesario el aumento de la absorción de AGs exógenos de la sangre y por lo tanto la expresión de la LPL en los corderos no varíe (lote LA) o disminuya (lote L) frente a los animales que componen el grupo control alimentados con concentrados. Aunque también podría deberse a mecanismos de regulación post-transcripcional de la enzima LPL o de regulación de su actividad catalítica.

Por otro lado, la inclusión del lino provocó un aumento en la expresión génica de la SCoAD en el tejido SC de corderos. Por un lado, parece ser que la menor incorporación de los PUFAs en las células, que afectan sobre la expresión de dicho gen, hace que no se produzca la inhibición de la expresión de SCoAD. Además, el aumento de la expresión de este gen podría estar relacionado con el aumento del sustrato de la enzima SCoAD, el ácido vaccénico (VA), como lo muestra el análisis de composición de ácidos grasos (Insausti *et al.*, 2011). En cambio, la expresión génica de la SCoAD disminuye en los animales alimentados con lino y algas (lote LA) frente al lote control. Teniendo en cuenta que la expresión de la enzima encargada de la incorporación de los AGs hacia las células (LPL) no presentó variación en el lote LA frente al control, en este caso, tendría lugar la incorporación de una cierta cantidad de AGs, entre ellos los PUFA, que parece ser que son causantes de la disminución en la expresión génica de la SCoAD.

En resumen, los resultados obtenidos en el presente trabajo, como los presentados por otros autores, indican que los cambios en el perfil de los AGs debido a las estrategias de alimentación utilizadas en rumiantes utilizando materias primas ricas en PUFAs n-3 implican cambios en el nivel de expresión de los genes relacionados con el metabolismo lipídico. Los efectos son diferentes en función del estado de desarrollo del depósito graso, en el caso en el que el depósito esté en un estado en el que acumula grasa de forma activa, la síntesis *de novo* adquiriría importancia y, aunque se acumulen más PUFAs, pueden no verse afectadas enzimas como la SCoAD. Por el contrario, si el depósito está en un momento de desarrollo en el que no esté acumulando grasa de forma intensa, sería mayor la contribución de la entrada de los PUFAs provenientes de la dieta a las células. Esta mayor cantidad de PUFAs en el interior de los adipositos podría ocasionar la inhibición de la expresión de las enzimas implicadas en la formación de AGs deseables como el 9c11t-CLA, DHA o EPA, disminuyendo la eficiencia de la deposición de los AGs deseables en la grasa de la carne, objetivo de las actuales estrategias alimentarias. Por ello, es importante conocer y tener en cuenta estos mecanismos modificadores de las vías del metabolismo lipídico a la hora de diseñar estrategias nutricionales que pretendan modificar la composición en ácidos grasos de la carne de corderos.

4. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo y en las condiciones de esta experiencia se extraen las siguientes conclusiones:

- El efecto de la inclusión de PUFAs n-3, en forma de lino y algas, sobre la expresión génica de las enzimas implicadas en el metabolismo lipídico, la ACC, la LPL y la SCoAD, ha sido distinta en función del depósito. Esta diferencia en el patrón de la expresión de los genes del depósito intramuscular y subcutáneo posiblemente estaría relacionado con el estado de desarrollo del depósito, y por tanto, con el grado de acumulación de grasa.
- En el tejido adiposo intramuscular, la incorporación de los PUFAs n-3 en la dieta no produjo un aumento de la grasa de los animales en comparación con el grupo control. El efecto de la ingestión de PUFAs, principalmente ALA, DHA y EPA, se tradujo en la disminución de la expresión génica del gen acetil-CoA carboxilasa (ACC), una de las enzimas reguladoras de la síntesis *de novo*, así como en el aumento de la lipoprotein lipasa (LPL), enzima encargada de la absorción de los AGs del plasma. Asimismo, la inclusión de los PUFAs n-3 en la dieta provocó la inhibición de la esteroil-CoA desaturasa (SCoAD) disminuyendo la producción de AGs deseables como el 9c11t-CLA.
- En el tejido adiposo subcutáneo, la ingestión de una mayor cantidad de AGs por parte de los corderos alimentados con lino o lino y algas provocó que estos animales acumulasen mayor cantidad de grasa que en el grupo control, traduciéndose en un incremento en la expresión génica de la ACC que podría implicar una activación de la síntesis *de novo*. Por otra parte, la ingestión y absorción de los AGs DHA y EPA provenientes de las algas podría haberse traducido en una inhibición de la SCoAD.
- La inclusión de los PUFAs n-3, en este caso provenientes del lino y las algas, en la dieta con el objeto de producir carne enriquecida en estos ácidos grasos implican variaciones en la expresión génica de los genes relacionados con el metabolismo lipídico. Por ello, es importante conocer y tener en cuenta estos mecanismos modificadores de las vías del metabolismo lipídico a la hora de diseñar estrategias nutricionales que pretendan modificar la composición en ácidos grasos de la carne de corderos.

5. BIBLIOGRAFÍA

- Arana, A., Soret, B., Mendizabal, J. A., Corroza, M., Eguinoa, P. & Purroy, A. (1998). Changes in adipose tissue accumulation in Rasa Aragonesa breed lambs during growth and fattening. *Animal Science*, 66(02), 409-413.
- Arana, A. (2005). Measurement of size and number of adipocytes and lipogenic enzyme activity [Muscle and fat physiology]. *Monografías INIA. Ganadera*.
- Baghurst, K. (2004). Dietary fats, marbling and human health. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44(7), 635-644.
- Barber, M. C., Price, N. T. & Travers, M. T. (2005). Structure and regulation of acetyl-CoA carboxylase genes of metazoa. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1733(1), 1-28.
- Bas, P., Berthelot, V., Pottier, E. & Normand, J. (2007). Effect of level of linseed on fatty acid composition of muscles and adipose tissues of lambs with emphasis on trans fatty acids. *Meat science*, 77(4), 678-688.
- Bauman, D. E., Corl, B. A. & Peterson, D. G. (2003). The biology of conjugated linoleic acids in ruminants. *Advances in conjugated linoleic acid research*, 2, 146-173.
- Belury, M. A. (2002). Dietary Conjugated Linoleic Acid in Health: Physiological Effects and Mechanisms of Action 1. *Annual Review of Nutrition*, 22(1), 505-531.
- Bernard, L., Rouel, J., Leroux, C., Ferlay, A., Faulconnier, Y., Legrand, P. & Chilliard, Y. (2005). Mammary lipid metabolism and milk fatty acid secretion in alpine goats fed vegetable lipids. *Journal of Dairy Science*, 88(4), 1478-1489.
- Berthelot, V., Bas, P. & Schmidely, P. (2010). Utilization of extruded linseed to modify fatty composition of intensively-reared lamb meat: Effect of associated cereals (wheat vs. corn) and linoleic acid content of the diet. *Meat science*, 84(1), 114-124.
- Brouwer, I. A., Katan, M. B. & Zock, P. L. (2004). Dietary alpha-linolenic acid is associated with reduced risk of fatal coronary heart disease, but increased prostate cancer risk: a meta-analysis. *The Journal of nutrition*, 134(4), 919.
- Chilliard, Y. & Ferlay, A. (2004). Dietary lipids and forages interactions on cow and goat milk fatty acid composition and sensory properties. *Reproduction Nutrition Development*, 44(5), 467-492.
- Clarke, S. D. (2001). Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a molecular mechanism to improve the metabolic syndrome. *The Journal of nutrition*, 131(4), 1129.
- Collomb, M., Schmid, A., Sieber, R., Wechsler, D. & Rytönen, E. L. (2006). Conjugated linoleic acids in milk fat: Variation and physiological effects. *International Dairy Journal*, 16(11), 1347-1361.
- Connor, W. E. (2000). Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *The American journal of clinical nutrition*, 71(1), 171S.

- Cooper, S., Sinclair, L., Wilkinson, R., Hallett, K., Enser, M. & Wood, J. (2004). Manipulation of the n-3 polyunsaturated fatty acid content of muscle and adipose tissue in lambs. *Journal of animal science*, 82(5), 1461.
- De La Torre, A., Gruffat, D., Durand, D., Micol, D., Peyron, A., Scislowski, V. & Bauchart, D. (2006). Factors influencing proportion and composition of CLA in beef. *Meat Science*, 73(2), 258-268.
- Demirel, G., Wachira, A., Sinclair, L., Wilkinson, R., Wood, J. & Enser, M. (2004). Effects of dietary n-3 polyunsaturated fatty acids, breed and dietary vitamin E on the fatty acids of lamb muscle, liver and adipose tissue. *British Journal of Nutrition*, 91(04), 551-565.
- Dentin, R., Benhamed, F., Pegorier, J., Foufelle, F., Viollet, B., Vaultont, S., Girard, J. & Postic, C. (2005). Polyunsaturated fatty acids suppress glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. *Journal of Clinical Investigation*, 115(10), 2843.
- Dervishi, E., Serrano, C., Joy, M., Serrano, M., Rodellar, C. & Calvo, J. (2011). The effect of feeding system in the expression of genes related with fat metabolism in semitendinous muscle in sheep. *Meat science*.
- Din, J. N., Newby, D. E. & Flapan, A. D. (2004). Science, medicine, and the future: Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease—fishing for a natural treatment. *BMJ: British Medical Journal*, 328(7430), 30.
- Duckett, S., Pratt, S. & Pavan, E. (2008). Corn oil or corn grain supplementation to steers grazing endophyte-free tall fescue. II. Effects on subcutaneous fatty acid content and lipogenic gene expression. *Journal of animal science*, 87(3), 1120.
- Elmore, J. S., Cooper, S. L., Enser, M., Mottram, D. S., Sinclair, L. A., Wilkinson, R. G. & Wood, J. D. (2005). Dietary manipulation of fatty acid composition in lamb meat and its effect on the volatile aroma compounds of grilled lamb. *Meat science*, 69(2), 233-242.
- Franklin, S. T., Martin, K. R., Baer, R. J., Schingoethe, D. J. & Hippen, A. R. (1999). Dietary marine algae (*Schizochytrium* sp.) increases concentrations of conjugated linoleic, docosahexaenoic and transvaccenic acids in milk of dairy cows. *The Journal of nutrition*, 129(11), 2048.
- García-Muriana, F. J. (2002). Metabolismo de los ácidos grasos. *Libro blanco de los omega-3. Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y monoinsaturados tipo oleico y su papel en la salud*, 36-47.
- Givens, D. (2005). The role of animal nutrition in improving the nutritive value of animal-derived foods in relation to chronic disease. *Proceedings of the Nutrition Society*, 64(03), 395-402.
- Harfoot, C. G. & Hazlewood, G. P. (1988). Lipid metabolism in the rumen. *The rumen microbial ecosystem*, 285-322.
- Harper, C. R. & Jacobson, T. A. (2005). Usefulness of omega-3 fatty acids and the prevention of coronary heart disease. *The American journal of cardiology*, 96(11), 1521-1529.

- Herdmann, A., Nuernberg, K., Martin, J., Nuernberg, G. & Doran, O. (2010). Effect of dietary fatty acids on expression of lipogenic enzymes and fatty acid profile in tissues of bulls. *animal*, 4(05), 755-762.
- Hiller, B., Herdmann, A. & Nuernberg, K. (2011). Dietary n-3 Fatty Acids Significantly Suppress Lipogenesis in Bovine Muscle and Adipose Tissue: A Functional Genomics Approach. *Lipids*, 1-11.
- Insausti, K., Zudaire, G., Sarriés, M. V., Beriain, M. J., Gómez, I., Arana, A., Mendizabal, J. A. & Purroy, A. (2011). Enriquecimiento en ácidos grasos poliinsaturados y omega-3 de la carne de cordero de Raza Navarra mediante la utilización de semilla de lino y algas marinas. II Calidad de la carne: composición en ácidos grasos. *Asociación Interprofesional para el Desarrollo Agrario (AIDA), XIV Jornadas sobre Producción Animal, Tomo II*, 640-642.
- Jayan, G. C. & Herbein, J. H. (2000). "Healthier" dairy fat using trans-vaccenic acid. *Nutrition & Food Science*, 30(6), 304-309.
- Joseph, S. J., Robbins, K. R., Pavan, E., Pratt, S. L., Duckett, S. K. & Rekaya, R. (2010). Effect of diet supplementation on the expression of bovine genes associated with Fatty Acid synthesis and metabolism. *Bioinformatics and Biology Insights*, 4, 19.
- Keating, A. F., Kennelly, J. J. & Zhao, F. Q. (2006). Characterization and regulation of the bovine stearoyl-CoA desaturase gene promoter. *Biochemical and biophysical research communications*, 344(1), 233-240.
- Khanal, R. C. & Dhiman, T. R. (2004). Biosynthesis of conjugated linoleic acid (CLA): a review. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3, 72-81.
- Kiecolt-Glaser, J. K., Belury, M. A., Porter, K., Beversdorf, D. Q., Lemeshow, S. & Glaser, R. (2007). Depressive symptoms, omega-6: omega-3 fatty acids, and inflammation in older adults. *Psychosomatic Medicine*, 69(3), 217.
- Kim, J., Lim, S. Y., Shin, A., Sung, M. K., Ro, J., Kang, H. S., Lee, K., Kim, S. W. & Lee, E. S. (2009). Fatty fish and fish omega-3 fatty acid intakes decrease the breast cancer risk: a case-control study. *BMC cancer*, 9(1), 216.
- Kris-Etherton. (2003a). Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease (vol 106, pg 2747, 2002). *Circulation*, 107(3), 512-512.
- Kris-Etherton, P. M. & Etherton, T. D. (2003b). The impact of the changing fatty acid profile of fats on diet assessment and health. *Journal of Food Composition and Analysis*, 16(3), 373-378.
- Lama Moré, R. A. & Moraix López, A. (2005). *Las grasas en la alimentación infantil: Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados*.
- Morris, D. H. (2008). Metabolism of Alpha-Linolenic Acid. *Fax Council of Canada*.
- Mozaffarian, D., Ascherio, A., Hu, F. B., Stampfer, M. J., Willett, W. C., Siscovick, D. S. & Rimm, E. B. (2005). Interplay between different polyunsaturated fatty acids and risk of coronary heart disease in men. *Circulation*, 111(2), 157.
- Nakamura, M. & Nara, T. (2003). Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*, 68(2), 145-150.

- Ntambi, J. (1992). Dietary regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in mouse liver. *Journal of Biological Chemistry*, 267(15), 10925.
- OMS. (2003). Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas. *Ginebra: OMS*
- Papadopoulos, G., Goulas, C., Apostolaki, E. & Abril, R. (2002). Effects of dietary supplements of algae, containing polyunsaturated fatty acids, on milk yield and the composition of milk products in dairy ewes. *Journal of Dairy Research*, 69(03), 357-365.
- Radunz, A., Wickersham, L., Loerch, S., Fluharty, F., Reynolds, C. & Zerby, H. (2009). Effects of dietary polyunsaturated fatty acid supplementation on fatty acid composition in muscle and subcutaneous adipose tissue of lambs. *Journal of animal science*. 2009-2059v2001.
- Relling, A. & Mattioli, G. (2003). Fisiología digestiva y metabólica de los rumiantes. *Fac. Ciencias Veterinarias. Argentina: Universidad Nacional de La Plata*.
- Rodríguez, C. M., Tovar, A. R., del Prado, M. & Torres, N. (2005). Mecanismos moleculares de acción de los ácidos grasos poliinsaturados y sus beneficios en la salud.
- Ruxton, C., Reed, S. C., Simpson, M. & Millington, K. (2004). The health benefits of omega 3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 17(5), 449-459.
- Scollan, N., Hocquette, J. F., Nuernberg, K., Dannenberger, D., Richardson, I. & Moloney, A. (2006). Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat Science*, 74(1), 17-33.
- Seminario, A. (2011). Efecto de la inclusión en el pienso de materias primas ricas en ácidos grasos omega-3 sobre las características productivas y de la canal de corderos de Raza Navarra. *Trabajo Fin de Carrera*.
- Simopoulos, A. P. (1991). Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *The American journal of clinical nutrition*, 54(3), 438.
- Simopoulos, A. P. (2002). Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: The epidemiological evidence. *Environmental health and preventive medicine*, 6(4), 203-209.
- Simopoulos, A. P. (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*, 233(6), 674.
- Smith, S., Witkowski, A. & Ak, J. (2003). Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase. *Progress in Lipid Research*, 42(4), 289-317.
- Soret, B., Lee, H. J., Finley, E., Lee, S. C. & Vernon, R. G. (1999). Regulation of differentiation of sheep subcutaneous and abdominal preadipocytes in culture. *Journal of Endocrinology*, 161(3), 517.

- Soret, B., Mendizabal, J. A., Arana, A., Purroy, A. & Eguinoa, P. (1998). Breed effects on cellularity and lipogenic enzymes in growing Spanish lambs. *Small Ruminant Research*, 29(1), 103-112.
- Thies, F., Garry, J., Yaqoob, P., Rerkasem, K., Williams, J., Shearman, C. P., Gallagher, P. J., Calder, P. C. & Grimble, R. F. (2003). Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *The Lancet*, 361(9356), 477-485.
- Thom, E., Wadstein, J. & Gudmundson, O. (2001). Conjugated linoleic acid reduces body fat in healthy exercising humans. *Journal of International Medical Research*, 29:392-396.
- Tsiplakou, E., Flietakis, E., Kalloniati, C., Papadomichelakis, G., Katinakis, P. & Zervas, G. (2009). Sheep and goats differences in CLA and fatty acids milk fat content in relation with mRNA stearoyl-CoA desaturase and lipogenic genes expression in their mammary gland. *Journal of Dairy Research*, 76(04), 392-401.
- Toral, P. G., Frutos, P. & Hervás, G. (2009). Leche de oveja con más CLAs. Suplementación de la dieta de ovejas lecheras con distintas fuentes lipídicas.
- Waters, S. M., Kelly, J. P., O'Boyle, P., Moloney, A. P. & Kenny, D. A. (2009). Effect of level and duration of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on the transcriptional regulation of 9-desaturase in muscle of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 87(1), 244.
- Wood, J. D., Richardson, R. I., Nute, G. R., Fisher, A. V., Campo, M. M., Kasapidou, E., Sheard, P. R. & Enser, M. (2004). Effects of fatty acids on meat quality: a review. *Meat Science*, 66(1), 21-32.
- Wynn, R., Daniel, Z., Flux, C., Craigon, J., Salter, A. & Buttery, P. (2006). Effect of feeding rumen-protected conjugated linoleic acid on carcass characteristics and fatty acid composition of sheep tissues. *Journal of animal science*, 84(12), 3440.
- Zechner, R., Strauss, J., Frank, S., Wagner, E., Hofmann, W., Kratky, D., Hiden, M. & Levak-Frank, S. (2000). The role of lipoprotein lipase in adipose tissue development and metabolism. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*, 24, S53.

Páginas Web consultadas:

Instituto Técnico de Gestión Ganadero, I. G. (2011). Raza Navarra. www.itgganadero.com