

INFLUENCIA DE LA RESTRICCIÓN DE VITAMINA A EN LA DIETA DE CERDOS IBERICOS SOBRE EL METABOLISMO Y LA TRANSCRIPCIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LIPOGENESIS

INFLUENCE OF DIETARY VITAMIN A RESTRICTION ON METABOLISM AND TRANSCRIPTION OF GENES RELATED TO LIPOGENESIS IN IBERIAN PIGS.

Ayuso¹, M., Isabel¹, B., Rey¹, A.I., Fernández², A., Segura¹, J., Benítez, R²., Silió², L., Daza³,
A., Óvilo², C., López-Bote¹, C.J.

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

²Dpto. de Mejora Genética Animal, INIA, Ctra. Coruña Km. 7.5. 28040, Madrid

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

mayher@live.com

RESUMEN: La vitamina A es una vitamina liposoluble obtenida de la dieta con numerosas funciones fisiológicas en los tejidos animales, incluyendo un efecto antiadipogénico aparentemente limitado al tejido muscular. La restricción de vitamina A se ha propuesto como una herramienta para mejorar la calidad de la canal y de la carne en animales de abasto. En el presente trabajo hemos estudiado el efecto de la restricción de vitamina A en el pienso sobre caracteres productivos, composición tisular de ácidos grasos y expresión de un panel de genes candidato con funciones adipogénicas y lipogénicas en cerdos ibéricos. Cuarenta cerdos de la estirpe Torbiscal fueron alimentados con pienso estándar o con pienso sin vitamina A en el corrector desde los dos meses de edad hasta su sacrificio, realizado en dos lotes (a 100 y 160 kg de peso vivo). La dieta no afectó al crecimiento, engrasamiento, rendimientos ni a la cantidad de grasa intramuscular, pero los animales restringidos mostraron una cantidad mayor de ácidos grasos monoinsaturados y menor de saturados en el tocino dorsal y en el lomo. El análisis de expresión génica en el tocino dorsal mostró una mayor expresión de *SCD* y *CRABP II* en el grupo restringido. Por otro lado, la expresión de *RXRG* fue mayor en el grupo control, en concordancia con el efecto modulador de la transcripción génica del ácido retinoico y su potencial relación con la adipogénesis y lipogénesis.

PALABRAS CLAVE: vitamina A, perfil ácidos grasos, cerdo ibérico, expresión génica.

ABSTRACT: Vitamin A is a liposoluble vitamin obtained from the diet with multiple physiological actions in all animal tissues, including an antiadipogenic action which seems to be limited to muscular tissues. Thus, vitamin A restriction has been proposed as a strategy for improving meat and carcass quality in farm animals. In this work we have studied the effects of vitamin A dietary restriction on productive traits, tissue fatty acid composition and expression of a panel of adipogenic and lipogenic candidate genes in Iberian pigs. Forty Torbiscal pigs were fed with a standard or a Vitamin A restricted diet from two months of age till their sacrifice conducted in two batches, at 100 and 160 Kg live weight. Diet had no significant effect on growth, fatness, yields or intramuscular fat, but animals receiving no vitamin A supplementation showed higher monounsaturated fatty acids and lower saturated fatty acids in back fat and loin samples than the control ones. Adipose tissue *SCD* gene expression was higher in vitamin A restricted animals, as occurs with *CRABP II* expression. On the other hand, *RXRG* expression was higher in control group, in agreement with the influence on transcription of retinoic acid and its potential relationship with adipogenesis and lipogenesis.

KEYWORDS: vitamin A, fatty acid profile, Iberian pig, gene expression

INTRODUCCIÓN

La cantidad y composición de la grasa de la canal son factores de gran importancia desde el punto de vista productivo, tecnológico, así como de aceptación y salud del consumidor. Debido al interés creciente de la población por alimentos de mayor calidad organoléptica y nutritiva, la industria actual persigue la obtención de productos animales con mejor infiltración grasa y mejores índices de insaturación. En el caso de monogástricos como el cerdo, la composición de ácidos grasos de los tejidos puede modificarse mediante cambios en la dieta, que tradicionalmente han consistido en cambios en el origen y composición de la grasa del pienso (Resenvold y Andersen, 2003). Sin embargo, más recientemente, se ha comprobado que la restricción de la vitamina A en el pienso puede conducir a cambios

cuantitativos y cualitativos de la grasa subcutánea e intramuscular en vacuno y porcino (Gorocica-Buenfil et al., 2008; Olivares et al., 2009), y por ello esta estrategia se ha propuesto como una posible herramienta para mejorar la calidad de la carne y la canal en estas especies.

La vitamina A es un retinoide natural liposoluble, que es obtenido de la dieta. Su metabolito activo, el ácido retinoico (AR), actúa en todos los tejidos animales ejerciendo funciones celulares muy variadas relacionadas con el desarrollo, proliferación, diferenciación, metabolismo y apoptosis. Entre sus acciones, el AR influye en los procesos de adipogénesis y lipogénesis (Bonet et al., 2003), supuestamente mediante la regulación transcripcional de un gran número de genes. El objetivo de este estudio ha sido comprobar el efecto de la restricción de vitamina A sobre aspectos productivos y de composición de ácidos grasos y sobre la expresión en tejido adiposo de un panel de genes candidato relacionados con la diferenciación de adipocitos y síntesis lipídica en cerdo ibérico.

MATERIAL Y MÉTODOS

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

Análisis composición de ácidos grasos: Se realizó la extracción de grasa intramuscular mediante el procedimiento one-step descrito por Sukhija y Palmquist (1988) y su posterior análisis en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard HP-6890 (Avondale, PA, USA). Se empleó un patrón interno (C15:0), lo que permitió cuantificar cada ácido graso así como la grasa intramuscular total.

Estudio de expresión diferencial: Se extrajo ARN total utilizando el sistema Ribopure (Ambion) en muestras de 100-150 mg de grasa dorsal (capa interna). Se realizó la cuantificación de la expresión de los genes *PPARG* (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), *CRABP II* (celular retinoic acid binding protein II), *RXRγ* (retinoid X receptor gamma), *ACACA* (acetyl-CoA carboxylase alpha:), *FASN* (fatty acid synthase), *ELOVL6* (fatty acid elongase 6) y *SCD* (stearoyl-CoA desaturase), para lo cual se diseñaron parejas de cebadores usando el software QuickPri a partir de las secuencias disponibles de ARNm en porcino. La cuantificación se llevó a cabo mediante qPCR con SYBR Green (Roche) en un equipo Lightcycler 480 (Roche). Todas las reacciones se realizaron por triplicado. Se utilizaron los genes *GAPDH* y *TBP* como endógenos para la normalización.

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los dos grupos experimentales presentaron pesos similares a lo largo del ensayo. Tampoco se observaron diferencias entre ellos en el peso de la canal, espesor del tocino dorsal ni rendimiento de piezas nobles al sacrificio, en ninguno de los dos sacrificios realizados. El contenido en grasa intramuscular del lomo no fue significativamente distinto entre ambos grupos (5.2 vs 5.7 y 9 vs 10.4% en el primer y segundo sacrificio).

Sin embargo, el tratamiento tuvo efecto significativo sobre la composición en ácidos grasos de los tejidos analizados (Tabla 1). Dicho efecto fue muy marcado en las muestras obtenidas en el sacrificio más tardío (160 Kg). En éste, se observa un efecto significativo de la restricción de vitamina A sobre la mayor parte de los ácidos grasos, con el grupo R presentando alrededor de 3 puntos porcentuales más de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) ($p < 0.0001$) en detrimento de la cantidad de saturados (AGS), que disminuye 3 puntos en la capa interna de la grasa dorsal ($p < 0.0001$). En concordancia, los índices de insaturación (Ind. Ins.) fueron mayores en el grupo R. Los ratio C16:1/C16:0 y C18:1/C18:0 han sido tradicionalmente utilizados como una medida indirecta de la actividad de la enzima SCD. Estos ratios presentan diferencias significativas en el sacrificio a 160 kg, presentando valores superiores en el grupo R.

Los resultados obtenidos para los caracteres de engrasamiento no confirman los hallazgos previos relativos al efecto positivo de la reducción del aporte de la vitamina A sobre la adipogénesis muscular en el cerdo (D'Souza et al., 2003, Olivares et al., 2011). En relación a la composición de ácidos grasos, los escasos estudios previos muestran efectos de la restricción de vitamina A dependientes del tipo genético (Olivares et al., 2009). Los efectos observados en nuestro estudio sobre el perfil de AG a 160 Kg son similares pero de mayor magnitud que los observados en estudios previos realizados con tipos genéticos procedentes de cruzamientos con Duroc. La mayor intensidad del efecto puede deberse al tipo genético graso empleado, o a la mayor duración del tratamiento y mayor peso al sacrificio.

Los genes estudiados se seleccionaron entre los potencialmente regulados por el retinol, teniendo en cuenta su papel regulador de los procesos de adipogénesis (*PPARG*), su función en la señalización del retinol (*CRABP II*, *RXR γ*) o su relación directa con la biosíntesis de ácidos grasos (*ACACA*, *FASN*, *ELOVL6*, *SCD*). De estos genes, tres presentaron expresión diferencial en tejido adiposo entre los dos grupos.

Los resultados muestran mayor expresión del gen *RXR γ* (*retinoid X receptor, gamma*) en el grupo C ($p < 0.05$). Este gen codifica para un receptor nuclear que interviene en el mecanismo de acción de AR, favoreciendo su efecto antiadipogénico (Bonet et al., 2003). Esto se refleja en los resultados fenotípicos en los que, a pesar de no existir diferencias en cuanto al espesor de tocino dorsal entre tratamientos, sí se detecta una correlación negativa (-0.683) entre dicha medida y la expresión del gen *RXR γ* ($p < 0.001$).

Por el contrario, la expresión del gen *CRABP II* (*celular retinoic acid binding protein 2*), es mayor en el grupo R ($p < 0.05$). Este gen codifica para una proteína coactivadora del AR, que favorece el transporte del AR al núcleo y su unión al receptor nuclear RARA (retinoic acid receptor alpha) favoreciendo sus efectos transcripcionales de inhibición de la diferenciación de células grasas. Esta proteína se expresa en preadipocitos, pero no en adipocitos maduros (Berry et al., 2010), lo que sugiere mayor proporción de preadipocitos en el grupo R, que puede asociarse a una adipogénesis más activa, con una continua diferenciación de células madre a preadipocitos (Hausman et al., 2009). Por otro lado, la mayor expresión de *CRABP II* en el grupo R podría ser un mecanismo encaminado a favorecer la correcta señalización del escaso AR disponible en este grupo (Budhu y Noy, 2002).

El mismo efecto se observó en la expresión del gen *SCD* ($p < 0.04$). Los animales del grupo R mostraron un 26% más de expresión respecto a los del grupo C. Estos resultados concuerdan con los efectos observados a nivel de composición de ácidos grasos, ya que el enzima *SCD* codifica principalmente la desaturación de ácido palmítico a palmitoleico y de ácido esteárico a oleico por lo que su mayor expresión está asociada a mayor proporción de AGMI y por lo tanto, a índices de insaturación más elevados. Los índices de actividad desaturasa también presentan diferencias concordantes con la expresión diferencial de *SCD*, lo cual indica una mayor expresión y actividad desaturasa en el grupo R. La posible inhibición que la vitamina A ejerce sobre la expresión y la actividad de *SCD* ha sido descrita en algunos trabajos en distintas especies, como roedores o rumiantes (Miyazaki y Ntambi, 2003; Siebert et al., 2006 y Gorocica-Buenfil et al., 2008).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bonet, M.L., Ribot, J., Felipe, F., Palou, A. 2003. Cell Mol Life Sci. 60: 1311-1321.
- Daniel, Z.C.T.R., Salter, A.M., Buttery, P. J. 2004. Anim Sci. 78: 237-243.
- D'Souza, D.N.D., Pethick, D.W., Dunshea, F.R., Pluske, J.R., Mullan, B.P. 2003. Aust J Agric Res. 54: 745-749.
-

Gorocica-Buenfil, MA., Fluharty, FL., Loerch, SC. 2008. J AnimSci. 86: 1609-1616. • Miyazaki, M., Ntambi, JM. 2003. PLEFA. 68: 113-121. • Olivares, A., Daza, A., Rey, A.I., López-Bote, C.J. 2009. MeatSci. 81: 6–12. • Olivares, A., Rey, A.I., Daza, A., López-Bote, C.J. 2011. Livest Sci. 137: 31-36. • Resenvold, K. y Andersen, H.J. 2003. Meat Sci. 64: 219-237. • Siebert, BD.,Kruk, ZA., Davis, J., Pitchford, WS., Harper, GS., Bottema, CDK. 2006. Lipids. 41: 365-370. • Steibel, JP.,Poletto, R., Coussens, PM., Rosa, GJM. 2009. Genomics. 94: 146-152. • Sukhija, P.S., Palmquist, D.L. 1988. J Agric Food Chem. 36: 1202–1206. • Zolfaghari, R., Ross, AC. 2003. PLEFA. 68: 171-179.

Agradecimientos: Trabajo financiado con los proyectos AGL2010-21991-C03-00 y CAM-S2009-AGR1704. Los animales fueron facilitados por el proyecto RZP2009-00004. Agradecemos la colaboración del personal del CIA 'Dehesón del Encinar' (Oropesa, Toledo)

Tabla 1. Índice de insaturación y de actividad desaturasa en tejido adiposo subcutáneo (capa interna) de cerdos ibéricos alimentados con pienso control o restringido en vitamina A, a los 100 Kg y 160 Kg de peso vivo.

	SACRIFICIO 100 Kg			SACRIFICIO 160 Kg		
	CONTROL	RESTR.	P valor	CONTROL	RESTR.	P valor
Ind. Ins	67.20 ± 2.55	67.07 ± 2.40	0.906	69.95 ± 1.51	73.58 ± 0.93	<.0001
16:1/16:0	0.010 ± 0.00	0.011 ± 0.00	0.432	0.011 ± 0.00	0.013 ± 0.00	0.003
18:1/18:0	2.90 ± 0.31	2.96 ± 0.36	0.733	3.32 ± 0.20	3.89 ± 0.23	<.0001

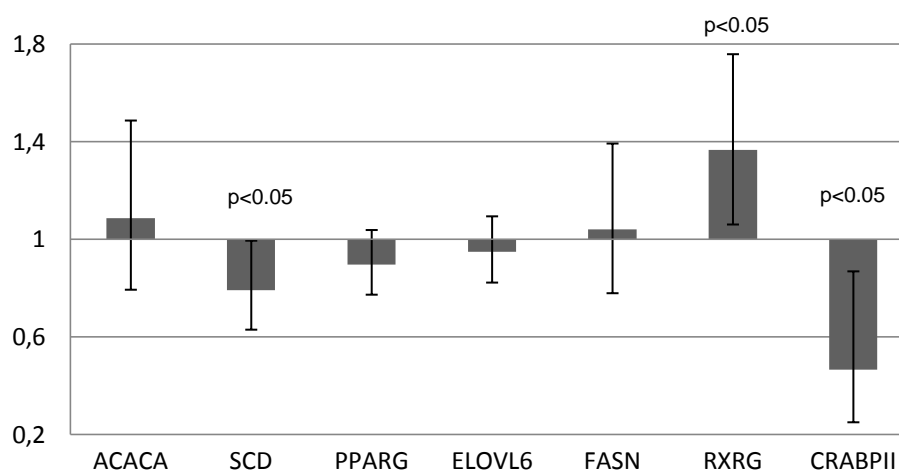


Figura 1: Expresión relativa (fold change) de los genes estudiados en grasa subcutánea del grupo control frente al restringido. Valores superiores a 1 indican mayor expresión del gen en el grupo C.