

EFFECTO DEL DHA SOBRE LA BIOHIDROGENACIÓN RUMINAL IN VITRO DE ÁCIDOS GRASOS DE 18 CARBONOS: COMPARACIÓN EN VACAS Y OVEJAS

Toral¹, P. G., Hervás¹, G., Carreño¹, D., Leskinen², H., Belenguer¹, A., Shingfield³, K.J. y Frutos¹, P.

¹Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Univ. de León), Finca Marzanas s/n. 24346 Grulleros, León, España. ²Natural Resources Institute Finland (Luke), 31600, Jokioinen, Finlandia. ³Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences, Univ. de Aberystwyth, Aberystwyth, Ceredigion, SY23 3EB, Reino Unido. pablo.toral@csic.es

INTRODUCCIÓN

La investigación sobre la inclusión de lípidos marinos en la dieta de los rumiantes se ha enfocado principalmente al estudio de su acción moduladora sobre el último paso de la biohidrogenación ruminal (BH) de los ácidos grasos (AG) (Or-Rashid et al., 2008; Toral et al., 2010). En este caso, el objetivo final es aumentar el flujo de t11-18:1, que sirve como sustrato para la síntesis mamaria de c9t11-CLA (Shingfield et al., 2013; Frutos et al., 2014). Sin embargo, algunos estudios sugieren que otras etapas o rutas de la BH de los AG de 18 carbonos podrían verse también afectadas (Kairenius et al., 2015; Toral et al., 2016).

Por otra parte, aunque son conocidas las variaciones en el metabolismo lipídico entre el vacuno y los pequeños rumiantes, p. ej. en respuesta a la suplementación con aceites vegetales (Shingfield et al., 2013), estas diferencias no resultan tan claras cuando los animales reciben lípidos marinos (Or-Rashid et al., 2008; Toral et al., 2010). Así, comparaciones indirectas sugieren que los efectos de los últimos sobre el perfil de AG de la leche y el contenido digestivo son similares en vacuno, ovino y caprino (Boeckeaert et al., 2008; Bichi et al., 2013; Toral et al., 2015). Por el contrario, la comparación directa de vacas y cabras suplementadas con aceite de pescado parece indicar una respuesta ruminal más acusada en el caprino (Toral et al., 2016), lo que apunta de nuevo a variaciones entre especies. No parece existir ningún estudio similar en vacuno y ovino.

Por ello, este experimento se llevó a cabo para examinar el efecto de la adición a la dieta de ácido docosahexaenoico (DHA o 22:6n-3; uno de los AG bioactivos más abundantes en los lípidos marinos) sobre la BH ruminal de los AG de 18 carbonos en vacas y ovejas.

MATERIAL Y MÉTODOS

El ensayo se realizó in vitro mediante cultivos no renovados de microorganismos ruminales, con un diseño factorial 2x2 (2 especies: vacuno y ovino, y 2 tratamientos: Control y DHA).

Como donantes del inóculo se utilizaron dos vacas y dos ovejas provistas de cánula ruminal, que recibieron una dieta mixta completa basada en heno de alfalfa y un concentrado (relación F:C 50:50). La oferta se ajustó a sus necesidades energéticas de mantenimiento para trabajar en condiciones similares en ambas especies. Pasados 15 días de adaptación, y tras una noche de ayuno, se recogieron muestras de fluido ruminal de cada animal y se mezclaron para dar lugar a un inóculo por especie. La incubación se hizo en tubos Hungate (Carreño et al., 2015) y como sustrato se usó la misma dieta de los animales (10 mg/mL de fluido ruminal tamponado). Todo el proceso se repitió 3 días diferentes (=réplicas). La dosis de DHA (2% materia seca) se añadió disuelta en etanol justo antes de comenzar la incubación. En el Control se dosificó la cantidad de etanol pero sin el AG. La fermentación se detuvo a las 24 h y los tubos fueron congelados inmediatamente a -80°C y después liofilizados para determinar el perfil lipídico mediante cromatografía de gases de los ésteres metílicos de los AG y GC-MS de sus derivados 4,4-dimetiloxazolinicos (Toral et al., 2010).

Los resultados se analizaron mediante ANOVA utilizando el procedimiento MIXED del SAS 9.4 (SAS Inst. Inc., EE. UU.). El modelo incluyó los efectos fijos de la especie, el tratamiento y su interacción. La tanda de incubación y el inóculo anidado a la especie se incluyeron como efectos aleatorios. Las medias se compararon con la opción *pdiff* de la sentencia *lsmeans* del procedimiento MIXED, incluyendo el ajuste de Bonferroni.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se muestra en la Tabla 1, el DHA inhibió la acumulación de 18:0, producto final de la BH de los AG de 18 C de forma similar en vacas y ovejas, pero el aumento de la concentración de t11-18:1, principal metabolito intermedio 18:1 en el contenido digestivo, fue mayor en el vacuno (+76%) que en el ovino (+64%). Por el contrario, la suma de otros *trans*

18:1 minoritarios, que mostraron un patrón de respuesta al tratamiento muy similar, se incrementó de forma más pronunciada en las ovejas. Esto sugiere mayores alteraciones en las rutas de BH en esta especie e implicaría que, en las mismas condiciones de alimentación, la microbiota del rumen de los pequeños rumiantes podría ser más sensible que la del vacuno a los lípidos ricos en AG poliinsaturados n-3. Aunque a priori estos resultados parezcan inesperados, coinciden con los observados en la comparación de vacas y cabras alimentadas con aceite de pescado (Toral et al., 2016) y podrían estar relacionados con el síndrome de baja grasa en la leche en pequeños rumiantes que reciben lípidos marinos (Toral et al., 2015, 2016). Es importante tener en cuenta que ovejas y cabras apenas responden a otras estrategias nutricionales que provocan este síndrome en vacas (p. ej., la suplementación con aceites vegetales; Shingfield et al., 2013). Para apoyar la implicación de estos metabolitos, cabría destacar que algunos otros asociados previamente con la depresión de la grasa (Kairenius et al., 2015; Toral et al., 2015) aumentaron de forma similar en ambas especies, como es el caso del c11- y el t10-18:1 y, probablemente, el t10c15-18:2 (que coeluye con el t11c15-18:2 en nuestras condiciones cromatográficas). Como se esperaba, la concentración de t10c12-CLA, el único AG con actividad antilipogénica demostrada (Shingfield et al., 2013), no se vio afectada por el tratamiento.

Tabla 1. Efecto del DHA sobre la concentración de los principales ácidos grasos de 18 carbonos (g/100 g AG) tras 24 h de incubación con inóculo ruminal de vacas y ovejas.

	Vacas		Ovejas		eed ¹	P		
	Control	DHA	Control	DHA		Sp	T	Sp×T
18:0	53,22	32,68	55,80	37,47	2,174	0,054	<0,001	0,499
10-oxo-18:0	0,45	0,51	0,10	0,15	0,023	<0,001	0,009	0,797
13-oxo-18:0	0,66 ^A	0,40 ^B	0,17 ^C	0,13 ^C	0,035	0,001	<0,001	0,002
16-oxo-18:0	0,76 ^A	0,53 ^B	0,26 ^C	0,23 ^C	0,060	0,002	<0,001	<0,001
c9-18:1	1,90	3,06	1,87	2,70	0,270	0,334	0,002	0,421
c11-18:1	0,36	0,61	0,25	0,50	0,048	0,098	0,001	0,962
Σ otros cis 18:1 ²	0,42 ^b	0,55 ^{ab}	0,44 ^b	0,69 ^a	0,032	0,060	0,001	0,061
t10-18:1	0,31 ^b	0,96 ^a	0,24 ^b	1,03 ^a	0,060	0,960	<0,001	0,053
t11-18:1	5,36 ^B	9,43 ^A	3,93 ^C	6,46 ^B	0,446	0,001	<0,001	0,042
Σ otros trans 18:1 ³	2,84 ^C	4,63 ^B	2,67 ^C	5,83 ^A	0,234	0,073	<0,001	0,002
c7c12-18:2	0,004	0,010	0,003	0,015	0,0022	0,291	0,002	0,105
c9c12-18:2	1,32	0,80	1,12	0,84	0,128	0,409	0,002	0,234
c9t12-18:2	0,02	0,04	0,01	0,03	0,005	0,187	0,001	0,500
c9t13-18:2	0,05	0,10	0,04	0,08	0,008	0,029	<0,001	0,313
t9c12-18:2	0,03	0,09	0,04	0,08	0,011	0,813	0,002	0,503
t11c15-18:2 ⁴	0,16	0,63	0,10	0,40	0,070	0,026	<0,001	0,133
t9t12-18:2	0,02 ^C	0,08 ^A	0,02 ^C	0,06 ^B	0,005	0,022	<0,001	0,026
t9t14-18:2	0,01	0,02	0,01	0,02	0,003	0,152	0,010	0,285
t10t14-18:2	0,02	0,04	0,03	0,04	0,006	0,544	0,007	0,982
c9t11-CLA	0,13	0,14	0,11	0,11	0,014	0,148	0,755	0,441
c11t13-CLA	0,005	0,005	0,007	0,004	0,0012	0,478	0,254	0,296
t10c12-CLA	0,01	0,02	0,03	0,02	0,005	0,051	0,656	0,190
Σ t,t-CLA ⁵	0,118	0,107	0,098	0,084	0,002	0,005	<0,001	0,485
18:3n-3	0,28	0,10	0,21	0,11	0,037	0,247	<0,001	0,132

^{A-C}Para cada AG, diferentes superíndices indican diferencias significativas ($P < 0,05$) o una tendencia a la significación (en minúsculas; $P < 0,10$) para el efecto de la interacción especie (Sp)×tratamiento (T).

¹Error estándar de la diferencia. ²Suma de c12-, c13-, c15- y c16-18:1. ³Suma de t4-, t5-, t6+7+8-, t9-, t12-, t13-, t15- y t16-18:1. ⁴Coeluye con t10c15-18:2. ⁵Suma de 7,9-, 8,10-, 9,11- y 11,13-CLA.

Los aumentos del *c9-* y *c11-18:1* en ambas especies, y de la suma de isómeros minoritarios *cis* 18:1 en ovejas, sugieren que el DHA también podría impedir su saturación completa en el rumen (Boeckeaert et al., 2008). Asimismo, la hidrogenación de los metabolitos intermedios 18:2 (p. ej., *c9t13-*, *t11c15-*, *t9t14-* y *t10t14-18:2*) podría estar limitada por este AG n-3 en ambas especies. Estos resultados sugieren un efecto específico sobre ambos pasos de la BH, al no explicarse por una inhibición general del proceso (como la ejercida por algunos taninos; Carreño et al., 2015), pues las concentraciones de 18:2n-6 y 18:3n-3 disminuyeron en el contenido digestivo del tratamiento DHA. En este sentido, resulta destacable que no hubiera diferencias relevantes en la abundancia de los isómeros del CLA, observándose p. ej. un porcentaje bajo y estable de *c9t11-CLA* en vacas y ovejas, que contrasta con las variaciones de su precursor para la desaturación mamaria (*t11-18:1*). Esto apoya la hipótesis de que las diferencias entre especies en el efecto de los lípidos marinos sobre la concentración láctea de ácido ruménico sería independiente de su flujo ruminal (Bichi et al., 2013; Shingfield et al., 2013; Toral et al., 2015).

De acuerdo con la concentración de cetoácidos (p. ej., 13-oxo-18:0), la hidratación (una ruta metabólica alternativa a la BH) se vio afectada por el DHA solo en el vacuno, lo que encaja con las diferencias interespecíficas en las bacterias ruminales capaces de hidratar los AG (Hudson et al., 2000). El cetoácido más abundante en ambas especies fue el 16-oxo-18:0, si bien raramente se cuantifica, probablemente por su elución al final del cromatograma.

En conclusión, aunque el efecto inhibitorio del DHA sobre el último paso de la BH ruminal es similar en vacas y ovejas, la acumulación de *t11-18:1* resulta más acusada en el vacuno y las rutas alternativas de BH se favorecen en mayor medida en el ovino, lo que podría derivar de diferencias en la composición de su microbiota ruminal. Además de impedir la saturación completa de los *trans* 18:1, el DHA inhibe la hidrogenación de los metabolitos intermedios *cis* 18:1 y 18:2 y, en el bovino, también parece afectar al proceso de hidratación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bichi, E., et al. 2013. J. Dairy Sci. 96: 524-532.
- Boeckeaert, C., et al. 2008. Appl. Environ. Microbiol. 74: 6923-6930
- Carreño, D., et al. 2015. Anim. Feed Sci. Technol. 210: 66-73.
- Frutos, P., et al. 2014. J. Dairy Sci. 97: 1036-1046.
- Hudson, J.A., et al. 2000. J. Appl. Microbiol. 88: 286-292.
- Kairenius, P., et al. 2015. J. Dairy Sci. 98: 5653-5672.
- Or-Rashid, M.M., et al. 2008. J. Anim. Sci. 86: 187-196.
- Shingfield, K.J., et al. 2013. Animal 7: 132-162.
- Toral, P.G., et al. 2010. J. Dairy Sci. 93: 4804-4817.
- Toral, P.G., et al. 2015. J. Dairy Sci. 98: 7277-7297.
- Toral, P.G., et al. 2016. J. Dairy Sci. 99: 301-316.

Agradecimientos: Este trabajo forma parte de los proyectos AGL2014-54587 (MINECO, cofinanciado por el FSE) y PIE201540E104 (CSIC). P.G. Toral disfruta de un contrato Ramón y Cajal y D. Carreño de uno predoctoral FPI, ambos del MINECO con FSE. Dedicado a la memoria de nuestro maestro y amigo Kevin J. Shingfield.

EFFECT OF DHA ON *IN VITRO* RUMINAL BIOHYDROGENATION OF 18-CARBON FATTY ACIDS: COMPARISON IN COWS AND EWES

ABSTRACT: Despite the established differences in ruminal biohydrogenation (BH) between cows and small ruminants fed vegetable oils, it has been suggested that differences would be less clear when it comes to marine lipids (rich in very long-chain n-3 PUFA). Thus, this study was conducted simultaneously in bovine and ovine to compare the *in vitro* BH of C18 fatty acids (FA) to 22:6n-3 (DHA). Batch cultures of rumen microorganisms were carried out using cannulated cows and ewes as inocula donors, and DHA was added at a dose of 2% incubated DM. Although DHA had a similar impact on 18:0 accumulation in cows and sheep, greater increases in *t11-18:1* concentration were found in bovine, whereas alternative BH pathways that lead to the accumulation of minor *trans* 18:1 isomers were further promoted in ewes. These relevant specificities may probably derive from interspecies differences in rumen microbial composition. The saturation of *cis* 18:1 and 18:2 isomers was also inhibited in both species. Changes in oxo-FA concentrations suggested that ruminal hydration (an alternative metabolic pathway to BH) was affected to a different extent in cows and ewes.

Keywords: cattle, sheep, ruminal lipid metabolism, *trans* fatty acid.