

CAPÍTULO 1

RELACIÓN ENTRE EL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS EN PLASMA Y LA SENSIBILIDAD AMBIENTAL EN CONEJOS

Data de aceite: 01/03/2022

Iván Agea

Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Miguel Hernández University

María de la Luz García

Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Miguel Hernández University

Raquel Muelas

Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Miguel Hernández University

Thomai Mouskouftara

Biomic_AUTh, CIRI-AUTH Center for Interdisciplinary Research and Innovation Aristotle University of Thessaloniki

Helen Gika

Biomic_AUTh, CIRI-AUTH Center for Interdisciplinary Research and Innovation Aristotle University of ThessalonikiLaboratory of Forensic Medicine and Toxicology, School of Medicine, Aristotle University of Thessaloniki

Maria Jose Argente

Centro de Investigación e Innovación Agroalimentaria y Agroambiental (CIAGRO-UMH), Miguel Hernández University

RESUMEN: Se seleccionaron de forma divergente dos líneas de conejos para aumentar y disminuir la variabilidad ambiental del tamaño de la camada al nacimiento. La disminución de

la variabilidad del tamaño de la camada genera hembras más resilientes, con menos sensibilidad al estrés y las enfermedades, siendo un criterio de selección útil para mejorar la sensibilidad ambiental. Los ácidos grasos modulan la función de las células inmunitarias. Los ácidos grasos saturados (SFA) tienen un efecto inhibidor sobre la proliferación de linfocitos, los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) ejercen un efecto protector y antiinflamatorio sobre los macrófagos, y los ácidos grasos poliinsaturados n-3 (PUFA) afectan la respuesta de los linfocitos por medio de las citoquinas IL-1, IL-2, IL-6 y TNF, así como de la prostaglandina E2 y leucotrieno B4. El perfil de ácidos grasos plasmáticos se evaluó en 10 hembras de la línea homogénea y 12 hembras de la línea heterogénea de la 12^a generación de selección. La línea homogénea mostró niveles más altos de SFA (+3,98 ng / ml P = 0,90 para C14:0; +2,30 ng / ml P = 0,98 para C15:0; +54 ng / ml P = 0,90 para C16:0 y +29 ng / ml P = 0,90 para C18:0) y de MUFA (+12,0 ng / ml P = 0,98 para C16:1 y +53 ng / ml P = 0,90 para C18:1n9c) que la línea heterogénea. Además, esta línea también tenía una mayor cantidad de PUFA n-3 (+2,18 ng / ml P = 0,90 para C18:3n3 y +1,91 ng / ml P = 0,90 para C20:5n3) y una menor cantidad de PUFA n-6 (-3,66 ng / ml P = 0,96 para C20:3n6 y -0,28 ng / ml P = 0,90 para C20:4n6) que la heterogénea. En conclusión, la selección por sensibilidad ambiental muestra una respuesta correlacionada en el perfil de ácidos grasos plasmáticos.

PALABRAS CLAVE: MUFA, PUFA n-3, PUFA n-6, linfocitos, resiliencia, sensibilidad ambiental.

ABSTRACT: Two rabbit lines were divergently selected for increasing and decreasing environmental variability of litter size at birth. Decreasing litter size variability generates more resilient females with less sensitivity to stress and diseases, being a useful selection criterion to improve environmental sensitivity. Fatty acids modulate the immune cell function. Saturated fatty acids (SFAs) have an inhibitory effect on lymphocyte proliferation, monounsaturated fatty acids (MUFAs) exerts a protective and anti-inflammatory effect on macrophages, and n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) affect response of lymphocytes by mean of IL-1, IL-2, IL-6, TNF as well as prostaglandin E2 and leukotriene B4. Plasma fatty acids profile was assessed in 10 females from the homogeneous line and 12 females from the heterogeneous line from the 12th generation of selection. The homogeneous line showed higher levels of SFAs (+3.98 ng/ml P=0.90 for C14:0; +2.30 ng/ml P=0.98 for C15:0; +54 ng/ml P=0.90 for C16:0 and +29 ng/ml P=0.90 for C18:0) and MUFAs (+12.0 ng/ml P=0.98 for C16:1 and +53 ng/ml P=0.90 for C18:1n9c) than the heterogeneous line. Besides, this line had also a higher amount of n-3 PUFAs (+2.18 ng/ml P=0.90 for C18:3n3 and +1.91 ng/ml P=0.90 for C20:5n3) and a lower amount of n-6 PUFAs (-3.66 ng/ml P=0.96 for C20:3n6 and -0.28 ng/ml P=0.90 for C20:4n6) than the heterogeneous one. In conclusion, selection for environmental sensitivity shows a correlated response in the plasma fatty acids profile.

KEYWORDS: MUFA, PUFA n-3, PUFA n-6, lymphocytes, resilience, environmental sensitivity.

INTRODUCCIÓN

Se ha realizado con éxito un experimento de selección divergente por sensibilidad ambiental en conejos en la Universidad Miguel Hernández de Elche (Blasco et al., 2017). Este carácter se midió como la variabilidad ambiental del tamaño de la camada al parto. La selección para reducir la variabilidad del tamaño de la camada puede ser una forma útil de mejorar la resiliencia de la hembra, que se define como la capacidad de las hembras de verse mínimamente afectadas por las perturbaciones, o su capacidad para volver rápidamente al estado anterior a la exposición a una perturbación (Colditz y Hine, 2016). En este sentido, la línea seleccionada para reducir la variabilidad del tamaño de la camada mostró menos sensibilidad al estrés y las enfermedades que la heterogénea (Argente et al., 2019). La diferente susceptibilidad a la enfermedad entre líneas estaría relacionada con una respuesta inmune diferente. Se sabe que los ácidos grasos desempeñan diversas funciones en las células inmunitarias, modulando su respuesta; por ejemplo, se ha encontrado que regulan la fagocitosis, la producción de especies reactivas de oxígeno, la producción de citocinas y la migración de leucocitos, y también interfieren con la producción de antígenos por parte de los macrófagos (Yaqoob y Calder, 2007). Por lo tanto, las líneas divergentes para la sensibilidad ambiental podrían mostrar diferencias en los niveles de ácidos grasos en plasma.

El objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta correlacionada a la selección para la variabilidad del tamaño de la camada en el perfil de ácidos grasos en el plasma, con el fin de identificar biomarcadores específicos para la sensibilidad ambiental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y diseño experimental

Los animales de este estudio provienen de la duodécima generación de un experimento de selección divergente para la sensibilidad ambiental. La selección se basó en la varianza fenotípica del tamaño de la camada de cada hembra, después de corregir este carácter por el año-estación y el orden de parto-lactación (Blasco et al., 2017). Todos los animales fueron alojados en la granja de la Universidad Miguel Hernández de Elche (España). Los conejos fueron alimentados con una dieta comercial estándar (Nutricun Elite Gra®, de Heus Nutrición Animal, La Coruña, España). Se les proporcionó comida y agua *ad libitum*. Las hembras se alojaron en jaulas individuales (37,5 × 33 × 90 cm³) bajo un fotoperíodo constante de 16 h de luz continua: 8 h de oscuridad continua, y con ventilación controlada durante todo el experimento. Las hembras se aparearon por primera vez a las 18 semanas de edad.

Se tomó una muestra de sangre de la vena de la oreja a la segunda monta en 10 hembras no lactantes de la línea homogénea y en 12 hembras no lactantes de la línea heterogénea en tamaño de la camada. El segundo apareamiento es un punto clave y representativo en la vida reproductiva de la hembra. Las muestras se recogieron en tubos con K3-EDTA, y se centrifugaron inmediatamente a 4000 rpm durante 15 min. El plasma se almacenó a -80 °C hasta el análisis de lípidos. Todos los procedimientos experimentales con animales fueron aprobados por el Comité de Ética en Investigación de la Universidad Miguel Hernández de Elche (Número de referencia 2017/VSC/PEA/00212), de acuerdo con las Directivas del Consejo 98/58/CE y 2010/63/UE.

Análisis químicos

Se tomaron 200 µl de muestra de plasma en un tubo de vidrio con tapa scrum. La muestra de plasma se procesó siguiendo el método de Shirai et al. (2005). En el último paso, después de la evaporación con isooctano bajo una corriente de nitrógeno gaseoso, se añadieron 200 µl de hexano. Los ácidos grasos se midieron mediante un cromatógrafo de gases (GC-17A, Shimadzu, Kyoto, Japón) con detector de ionización de llama (FID), equipado con un CP-Sil 88 para columna capilar FAME (100 m x 0,25 mm x 0,36 mm; 0,20 µm espesor de película; Agilent Technologies, Madrid, España). El gas portador fue helio (flujo de 1,2 ml / min) con una inyección de 1:1. La rampa de temperaturas fue de 45 °C durante los primeros 4 min; de 13 °C/min hasta 175 °C a continuación; 4 °C /min hasta 215 °C mantenidos durante 30 min; temperatura del inyector, 250 °C; y temperatura del detector, 260 °C. Los ácidos grasos se identificaron comparando los tiempos de retención con el estándar FAME MIX (CRM47885, Supelco, España).

Análisis estadístico

El modelo utilizado para analizar el perfil de ácidos grasos plasmáticos incluyó los efectos de línea (línea homogénea y heterogénea) y mes (marzo, abril y mayo). Todos los análisis se realizaron utilizando metodología bayesiana (Blasco, 2017). Consideramos que había suficiente evidencia de una diferencia entre la línea heterogénea (H) y la línea homogénea (L) si la probabilidad (P) de la diferencia era mayor de 0,90.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En comparación con la línea heterogénea (Tabla 1), la línea homogénea mostró una mayor cantidad de ácidos grasos saturados (SFA) (+3,98 ng / ml P = 0,90 para C14:0; +2,30 ng / ml P = 0,98 para C15:0 ; +54 ng / ml P = 0,90 para C16:0 y +29 ng / ml P = 0,90 para C18:0) y ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) (+12,0 ng / ml P = 0,98 para C16:1 y +53 ng / ml P = 0,90 para C18:1n9c). En relación a los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), la línea homogénea también exhibió una mayor cantidad de PUFAAs n-3(+2.18 ng / ml P = 0,90 para C18:3n3; +1.91 ng / ml P = 0,90 para C20:5n3). Con respecto a los PUFA n-6, la línea homogénea tuvo una mayor cantidad de C22:2n6 (+0,55 ng / ml P = 0,96) y menor cantidad de C20:3n6 (-3,66 ng / ml P = 0,96) y C20:4n6 (-0,28 ng / ml P = 0,90) que la heterogénea.

Carácter (ng/ml)	Línea Heterogénea (H)		Línea Homogénea (L)			
	Media	D _{H-L}	Media	D _{H-L}	HPD9 _{5%}	
C8:0	7.74		4.09	3.65	-4.38, 11.9	0.81
C10:0	0.87		0.16	0.71	-0.59, 2.05	0.85
C11:0	0.07		0.35	-0.28	-0.79, 0.24	0.87
C12:0	1.70		1.29	0.41	-1.06, 1.93	0.71
C14:0	12.4		16.4	-3.98	-11.16, 2.44	0.90
C15:0	2.34		4.64	-2.30	-4.43, -0.20	0.98
C16:0	244		298	-54	-169, 45	0.90
C17:0	5.25		6.46	-1.21	-3.65, 1.31	0.84
C18:0	121		150	-29	-73, 17	0.90
C21:0	0.80		0.05	0.75	-0.51, 2.05	0.84
C22:0	1.07		0.10	0.97	-0.70, 2.40	0.79
C24:0	1.59		0.45	1.14	-0.70, 0.15	0.85
SFAs	400		483	-83	-249, 68	0.90
C14:1	1.76		1.55	0.21	-1.72, 2.10	0.59
C15:1	2.35		2.47	-0.12	-1.73, 1.54	0.55
C16:1	13.7		25.7	-12.0	-23.7, 0.1	0.98
C17:1	1.79		2.49	-0.70	-2.10, 0.72	0.85

C18:1n9c	176	229	-53	-135,	32	0.90
C20:1	1.16	0.94	0.22	-0.93,	1.41	0.65
MUFAs	197	262	-65	-159,	31	0.92
C18:2n6c	271	297	-26	-145,	95	0.67
C18:3n6	0.67	3.48	-2.81	-5.69,	1.17	0.84
C18:3n3	5.57	7.75	-2.18	-6.19,	0.98	0.90
C20:2	2.31	2.28	0.02	-1.46,	1.55	0.51
C20:3n6	4.44	0.76	3.66	-0.34,	7.80	0.96
C20:3n3	0.87	0.90	-0.03	-1.48,	1.47	0.51
C20:4n6	0.52	0.24	0.28	-0.12,	0.82	0.90
C22:2n6	0.36	0.91	-0.55	-1.16,	0.07	0.96
C20:5n3	1.59	3.50	-1.91	-7.59,	1.62	0.90
C22:6n3	1.77	0.36	1.41	-1.81,	3.71	0.81
n-3 PUFAs	9.87	11.97	-2.10	-9.59,	1.75	0.90
PUFAs	286	317	-31	-150,	98	0.67

D_{HL} : media de la diferencia entre líneas heterogéneas y homogéneas. HPD95%: región de densidad posterior más alta al 95%. P: probabilidad de que la diferencia sea >0 cuando $D_{HL} > 0$, y probabilidad de que la diferencia sea <0 cuando $D_{HL} < 0$. SFA: ácidos grasos saturados. MUFA: ácidos grasos monoinsaturados. PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados.

Tabla 1. Perfil de ácidos grasos en plasma a la monta en las líneas heterogénea y homogénea para la variabilidad del tamaño de la camada.

Los ácidos grasos participan en la regulación y activación de la respuesta inmune innata y adaptativa mediante la producción y síntesis de citocinas proinflamatorias, así como prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos y lipoxinas (Pompéia et al., 2000 en humanos). Por ejemplo, se ha encontrado un efecto negativo del ácido palmítico (C16:0) y el ácido esteárico (C18:0) sobre la proliferación de linfocitos y un efecto protector del ácido palmitoleato (C16:1) y el ácido oleico cis-9 (C18:1n9c) (Gorjão et al., 2007; Carrillo et al., 2012; Chan et al., 2015 en humanos), mientras que ácido α linolénico (ALA, C18:3n3), ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5n3) y docosahexaenoico ácido (DHA, C22:6n3) han mostrado un efecto antiinflamatorio por medio de la disminución en la producción de IL-1, IL-2, IL-6, TNF así como de la prostaglandina E2 y el leucotrieno B4 (Katayama et al., 2003 y Kelley et al., 1999 en humanos; Rodríguez et al., 2019 en conejos). La proteína C reactiva es una proteína de la fase aguda secretada por los hepatocitos durante la inflamación, en respuesta a las citocinas proinflamatorias (Pepys y Hirschfield, 2003), siendo un biomarcador útil en procesos inflamatorios. En un estudio anterior, Argente et al. (2019) detectaron una menor concentración de linfocitos y proteína C reactiva en la línea homogénea; por tanto, esta línea parece ser menos sensible a enfermedades y procesos inflamatorios que la heterogénea. Estos hallazgos concuerdan con una mayor cantidad de ácido palmítico, ácido esteárico, ácido α- linolénico y ácido eicosapentaenoico en la línea

homogénea.

CONCLUSIÓN

La selección por sensibilidad ambiental muestra una respuesta correlacionada en el perfil de ácidos grasos plasmáticos, corroborando una menor respuesta inflamatoria y menor sensibilidad a enfermedades en la línea homogénea.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (MCI) Agencia Estatal de Investigación (AEI) y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) "Una manera de hacer Europa" con el AGL2017-86083-C2-2-P, y con el proyecto de la Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural 2021/ VALORIZA/VSC/002.

REFERENCIAS

- Argente M.J., García M.L., Zbyňovská K., Petruška P., Capcarová M., Blasco A. 2019. Correlated response to selection for litter size environmental variability in rabbits' resilience. *Animal*, 13(10), 2348-2355.
- Blasco A., Martínez-Álvaro M., García M.L., Ibáñez-Escriche N., Argente M.J. 2017a. Selection for environmental variance of litter size in rabbits. *Genet. Sel. Evol.*, 49(1), 48.
- Blasco A 2017b. Bayesian data analysis for animal scientists. Springer. New York.Carrillo C., Cavia M.M., Alonso-Torre S. 2012. Role of oleic acid in immune system; mechanism of action: a review. *Nutr. Hosp.*, 27, 978-990.
- Chan K.L., Pillon N.J., Sivaloganathan D.M., Costford R.J., Liu Z., Theret M., Chazaud B., Klip A. 2015. Palmitoleate Reverses High Fat-induced Proinflammatory Macrophage Polarization via AMP-activated Protein Kinase (AMPK). *J. Biol. Chem.*, 290, 16979-16988.
- Colditz I.G., Hine B.C. 2016. Resilience in farm animals: Biology, management, breeding and implications for animal welfare. *Anim. Prod. Sci.*, 56, 1961–1983.
- Gorjão R., Cury-Boaventura M.F., de Lima TM., Curi R. 2007. Regulation of human lymphocyte proliferation by fatty acids. *Cell Biochem. Funct.*, 25, 305–315.
- Pepys M.B., Hirschfield G.M. 2003. C-reactive protein: A critical update. *J. Clin. Invest.*, 111(12), 1805–1812.
- Pompéia C., Lopes L.R., Miyasaka C.K., Procópio J., Sannomiya P., Curi R. 2000. Effect of fatty acids on leukocyte function. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 33, 1255-1268.
- Katayama S., Lee J.B. 2003. Prostaglandins and leukotrienes. In: Benjamin Caballero (Eds). *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition). Academic Press, 4798-4804.

Kelley D.S., Taylor P.C., Nelson G.J., Schmidt P.C., Ferretti A., Erickson K.L., Yu R., Chandra R.K., Mackey B.E. 1999. Docosahexaenoic acid ingestion inhibits natural killer cell activity and production of inflammatory mediators in young healthy men. *Lipids*, 34, 317-324.

Rodríguez M.G., Rebollar P., Mattioli S., Castellini C. 2019. n-3 PUFA Sources (Precursor/Products): A review of current knowledge on rabbit. *Animals*, 9(10), 806.

Shirai N, Suzuki H, Wada S. Direct methylation from mouse plasma and from liver and brain homogenates. *Anal Biochem*. 2005;343(1):48–53. doi:10.1016/j.ab.2005.04.037

Yaqoog P., Calder PC. 2007. Fatty acids and immune function: new insights into mechanisms. *Br J Nutr.*, 98:241-245.