



**Universidad**  
Zaragoza

Trabajo Fin De Máster



**“ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA INCLUSIÓN  
DE DIFERENTES NIVELES DE VITAMINA E EN LA  
DIETA DE CORDEROS DE RAZA RASA  
ARAGONESA EN LA EXPRESIÓN DE GENES EN  
YEYUNO MEDIANTE LA METODOLOGÍA DEL GEN  
CANDIDATO”**

BELÉN GARCÍA MANRIQUE  
DIRECTOR: DR. JORGE H. CALVO LACOSTA  
PONENTE: DRA. MARÍA ITURRALDE NAVARRO  
MÁSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR  
Septiembre 2013



*ESTE TRABAJO HA SIDO FINANCIADO A TRAVÉS DE UN PROYECTO DEL PROGRAMA DE RECURSOS Y  
TECNOLOGÍA AGRARIAS (RTA) DEL INIA PERTENECIENTE AL MINISTERIO DE ECONOMÍA Y  
COMPETITIVIDAD (INIA RTA2012-0041) Y A LOS FONDOS PARA EL DESARROLLO REGIONAL DE  
LA COMUNIDAD EUROPEA (FEADER), Y AL DEPARTAMENTO DE INDUSTRIA E INNOVACIÓN DEL  
GOBIERNO DE ARAGÓN ENTIDAD FINANCIERA DEL GRUPO CONSOLIDADO DE INVESTIGACIÓN  
RECONOCIDO POR EL GOBIERNO DE ARAGÓN “ALIMENTACIÓN Y GENÉTICA MOLECULAR APLICADA  
A LA CALIDAD Y SEGURIDAD DE LOS PRODUCTOS AGROALIMENTARIOS EN RUMIANTES (A-49)”.*



## AGRADECIMIENTOS.

En primer lugar quiero dar las gracias a las personas más importantes en mi vida, a mis padres y hermanas que, aunque no me entendiesen cuando les explicaba en qué consistía todo esto, nunca dejaron de escucharme.

Gracias a mi director de Trabajo Fin de Máster, Jorge Hugo Calvo Lacosta, por acogerme en su equipo estos últimos años de mi vida y enseñarme, ya que gracias a él, a Laura y, por supuesto, a Pilar, no sabría casi nada de lo que sé ahora mismo.

Gracias a todo el equipo que trabaja en la unidad de Tecnología en Producción Animal en el Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria del Gobierno de Aragón (CITA), pero especialmente GRACIAS al equipo del laboratorio de Genética Molecular.



# ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. GENERALIDADES.....	3
1.2. LA VITAMINA E.....	5
1.3. METABOLISMO DE LA VITAMINA E.....	8
1.4. GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DE LA VITAMINA E.....	12
1.4.1. <i>LPL</i> .....	12
1.4.2. <i>APOE</i> .....	13
1.4.3. <i>ABCA1</i> .....	14
1.4.4. <i>SCARB1</i> y <i>PDZK1</i> .....	15
1.4.5. <i>NPC1L1</i> .....	16
1.4.6. <i>TTPA</i> .....	16
1.4.7. <i>CYP4F2</i> .....	17
1.4.8. <i>PPARA</i> y <i>PPARG</i> .....	17
1.4.9. <i>SREBF1</i> .....	19
1.4.10. <i>CEBPB</i> .....	19
1.5. LA GENÓMICA NUTRICIONAL.....	20
2. OBJETIVO.....	23
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
3.1. MATERIAL ANIMAL.....	25
3.1.1. Diseño experimental.....	25
3.1.2. Sacrificio y toma de muestras.....	26
3.2. EXTRACCIÓN DE mRNA.....	27

3.3.	SÍNTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO (CDNA).....	29
3.4.	DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL CDNA SINTETIZADO. ....	30
3.5.	ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA.....	31
3.5.1.	Diseño y optimización de cebadores. ....	31
3.5.2.	Comprobación de la identidad génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). ....	34
3.6.	PCR A TIEMPO REAL.....	35
3.7.	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS Y ESTADÍSTICOS.....	37
3.7.1.	Análisis bioinformáticos.....	37
3.7.2.	Análisis estadísticos.....	37
3.7.2.1.	Contenido de $\alpha$ - tocoferol.....	37
3.7.2.2.	Expresión génica.....	38
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
4.1.	CONTENIDO DE $\alpha$ - TOCOFEROL EN MÚSCULO. ....	41
4.2.	COMPROBACIÓN DE LA IDENTIDAD GÉNICA Y DE LA EXPRESIÓN TISULAR ESPECÍFICA. ....	42
4.3.	ELECCIÓN DE LOS MEJORES GENES DE REFERENCIA PARA NORMALIZAR LOS RESULTADOS. ....	43
4.4.	ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE $\alpha$ -TOCOFEROL EN LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DE LA VITAMINA E MEDIANTE RT-QPCR. ....	44
5.	CONCLUSIONES.....	53
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

## RESUMEN.

En el presente trabajo se ha estudiado la interacción gen-alimentación en corderos de la raza Rasa Aragonesa, de peso ternasco a partir de tejido intestinal procedente del yeyuno de estos animales.

Se estudió la expresión diferencial de genes implicados en la captación, transporte y eliminación de  $\alpha$ -tocoferol (*SCARB1*, *ABCA1*, *NPC1L*, *LPL*, *TTPA*, *APOE*, *CYP4F2*), así como de genes que codifican factores de regulación de los mismos (*PDKZ1*, *PPARG*, *PPARA*, *SREBP1* and *CEBPB*) en el intestino delgado (yeyuno), en 58 animales agrupados según los diferentes días de finalización con concentrado suplementado con vitamina E (concentrado + 500 dl- $\alpha$ -tocoferol acetato/kg durante 0 (T), 7-14 (VE10d), 18-25 (VE20d) y, 29-36 (VE30d) días antes del sacrificio), así como 8 de ellos alimentados con alfalfa en pastoreo.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa a tiempo real ha sido la técnica elegida para el análisis de expresión diferencial de estos genes. Previo a la PCR a tiempo real se estudió la expresión tisular específica de cada gen mediante PCR convencional en el músculo *Longissimus dorsi*, grasa subcutánea, hígado, y tres partes diferenciadas de intestino delgado (duodeno, íleon y yeyuno) con diferente actividad en la absorción de grasas y vitamina E. En yeyuno han amplificado todos los genes excepto *PDKZ1* que no amplificó en ninguna muestra analizada, y *TTPA* que sólo amplificó en 25 de todas las muestras analizadas.

El gen más estable bajo los distintos tratamientos analizados en este estudio fue el gen candidato *APOE*, seguido del gen de referencia (GR), *RPL19*. Ninguno de los tres GR testados fue más estable que *APOE*, por lo que la normalización de *APOE* se realizó con *RPL19*, un gen menos estable, y asumiendo que podíamos estar cometiendo un error en la estima de la expresión génica. En cuanto a la expresión de los genes candidatos, se obtuvo que *LPL* y *SCARB1* podrían estar regulados mediante un mecanismo de retroalimentación negativa (“feedback”) del  $\alpha$ -tocoferol sobre su expresión. Dichos genes muestran una regulación de la expresión génica mediada por  $\alpha$ -tocoferol a corto plazo, que produce un incremento en su expresión cuando se suplementa vitamina E durante pocos días, seguido

de una disminución en su expresión al incrementar los días de suplementación con vitamina E. La menor expresión génica fue encontrada en los animales que pastaban continuamente alfalfa (rica en carotenos y vitamina E), lo que sugiere una disminución en la expresión de dichos genes en estos animales, que podría estar mediado por los carotenos.

# 1. INTRODUCCIÓN.

## 1.1. GENERALIDADES.

Los graves problemas actuales debidos a las sucesivas crisis alimentarias que venimos sufriendo en los últimos años (encefalopatías, dioxinas, promotores del crecimiento...), así como a la contaminación medioambiental, han propiciado que las actuales directrices de la Unión Europea se centren en fomentar el desarrollo de sistemas ganaderos sostenibles que, además de garantizar el bienestar animal y preservar el medio ambiente, permitan obtener productos de alta calidad, más saludables y libres de residuos. Asimismo, en países desarrollados, el consumidor está cada vez más concienciado en cuanto a la necesidad de buscar una mayor calidad nutricional de los alimentos, orientando su dieta hacia una reducción de grasas y una mayor ingesta de ácidos grasos poliinsaturados. El consumidor exige un producto sano y de calidad, respaldado por un conocimiento científico que, de momento, resulta ciertamente escaso (Morbidini *et al.*, 2001).

Los factores que influyen en la calidad del producto de origen animal son variados, destacando: la raza; el estado fisiológico del animal o la edad; la alimentación; el mercado al cual va dirigido ese producto; la sanidad y, por supuesto, el bienestar animal. La alimentación de los animales destinados al consumo humano es uno de los factores más valorados por el consumidor. Estas circunstancias, junto con la actual reforma de la Política Agraria Común, favorecen los sistemas de producción animal de tipo extensivo, basados en el aprovechamiento máximo de zonas pastorales, teniendo entre los consumidores europeos una mejor imagen en comparación con los de tipo intensivo, cuyos animales son criados en cebaderos con dietas constituidas por concentrados. Además, no se puede olvidar que la información científica apunta claras ventajas sobre la salud humana de los productos animales obtenidos en extensivo (Enser *et al.*, 1998; Corcoran *et al.*, 2001; Chilliard *et al.*, 2001; Schmid *et al.*, 2006).

Con estos antecedentes se hace necesario el desarrollo de estrategias que, además de incrementar la calidad de los productos agroalimentarios de origen animal, tales como la carne, grasa etc., permita a los productores mantener una posición competitiva en el

mercado, merced al valor añadido de producciones diferenciadas. Una de estas estrategias propuestas por la FAIP (Farm Animal Industrial Plattform, 2003) para lograr estos fines es incorporar la genómica a los esquemas de selección de las razas. En este sentido, la nutrigenómica supone una nueva aproximación de las investigaciones en nutrición, que aúna la aplicación de las poderosas tecnologías de la genómica funcional (transcriptómica, proteómica, metabolómica), junto a la bioinformática y la biología molecular, con técnicas nutricionales y bioquímicas clásicamente establecidas. Entre sus objetivos esenciales está determinar los efectos y mecanismos por los cuales la alimentación, sus componentes individuales y las combinaciones de ellos, regula los procesos metabólicos dentro de las células y tejidos del organismo, así como las aplicaciones de estos nuevos conocimientos. En consecuencia la integración de la nutrigenómica en la producción animal permitirá conocer las interacciones gen-nutriente sobre caracteres relacionados con la calidad de la carne, o de la grasa, tanto en el aspecto sensorial, como en su relación con la salud humana: contenido de ácidos grasos saturados, % de grasa y de proteína, colesterol, de los isómeros de ALC (ácido linoleico conjugado), o contenido de vitaminas u otros metabolitos.

Hasta la fecha, en rumiantes, especialmente en la especie ovina, pocos son los trabajos cuyos objetivos sean abordar y proporcionar información sobre las relaciones “dieta-gen” en el perfil de ácidos grasos (AG) o contenido de metabolitos de importancia en producción animal o salud humana en diferentes tejidos. Dentro del concepto de calidad podemos incluir muchos puntos de vista diferentes, unos de ellos, quizás el más importante en el momento actual en el que los productos funcionales y el marketing a ellos asociados están de moda, es la composición del producto, fundamentalmente su composición química, asociada a una composición tisular, particularmente en lo relacionado con su composición en AG, proteína y otros nutrientes. Entre estos nutrientes destaca la vitamina E, que es un antioxidante con reconocidas virtudes sobre la salud humana (prevención de enfermedades cardiovasculares, Parkinson y otras enfermedades nerviosas), que además de encontrarse de forma natural en los forrajes, se adiciona en los piensos comerciales utilizados en el cebo de corderos. Por otra parte, esta vitamina proporciona una estabilidad oxidativa de los productos animales y mejora el mantenimiento del color, aspecto muy importante especialmente en la carne (Dufrasne et al., 2000), ya que alarga la vida útil del producto

(Lauzurica *et al.* 2005) (Ripoll *et al.* 2013), con el incremento de la ganancia económica que esto puede suponer para las cooperativas y centros distribuidores.

En el presente trabajo se pretende abordar el estudio de expresión diferencial de genes claves en el metabolismo de la vitamina E de animales sometidos a distintos sistemas de producción, y periodo de finalización con pienso enriquecido con vitamina E obteniendo de esta forma un perfil bioquímico a nivel de expresión de RNA de los mismos en yeyuno. La detección de genes sobre o bajo-expresados asociados a una dieta determinada nos permitirá determinar genes candidatos sobre los que buscar mutaciones individuales que puedan afectar a parte de la varianza del carácter en estudio (por ejemplo, contenido de vitamina E). Además, el estudio conjunto de genes implicados en la captación de vitamina E, transporte, así como de elementos reguladores nos permitirá tener una visión integradora de la regulación de estos genes en función de los nutrientes y de las relaciones entre los mismos. Por otra parte, las investigaciones de los últimos años han revelado la importancia de las vitaminas como reguladores celulares universales. En este sentido las vitaminas afectan la expresión de genes modulando el metabolismo celular, y por lo tanto existe una respuesta diferencial del organismo a los cambios de dieta (Fang *et al.*, 2010). El presente trabajo, se ha llevado a cabo en corderos tipo ligero de Rasa aragonesa (peso ternasco, de 22 a 24 kg PV), que son los más comunes en España, y que dan lugar a un tipo de producto comercial, ternasco, con 8.5-11.5 kg de canal (Sañudo *et al.* 1998).

A continuación se va a llevar a cabo una breve revisión de aspectos relacionados con la vitamina E, objeto de este estudio, y su metabolismo, así como de los genes analizados en este trabajo.

## 1.2. LA VITAMINA E.

La vitamina E pertenece al grupo de vitaminas liposolubles ampliamente distribuida en los alimentos. Su principal función es como antioxidante natural. Reacciona con los radicales libres solubles en los lípidos de las membranas, y con los pigmentos del grupo hemo (parte esencial de la hemoglobina). Pertenece a una familia de compuestos poliprenoides y en su estado natural tiene ocho diferentes formas isoméricas, cuatro

tocoferoles y cuatro tocotrienoles. Todos los isómeros tienen un anillo aromático (cromano), con un grupo hidroxilo y una cadena poliprenoide saturada. Existen formas alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ ) y delta ( $\delta$ ) para ambos isómeros, y se determina por el número de grupos metílicos en el anillo aromático. El más difundido y el que tiene mayor valor biológico como vitamina es el  $\alpha$ -tocoferol. El  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  difieren del  $\alpha$ -tocoferol en la ausencia de uno o dos grupos metilo del anillo aromático de los tres que se encuentran presentes en el  $\alpha$ -tocoferol. Estos son bastante menos activos como vitaminas que el  $\alpha$ -tocoferol.

Todas las acciones de los tocoferoles parecen estar determinadas por su carácter antioxidante y, en particular, previenen las reacciones de peroxidación de lípidos insaturados (enranciamiento). Este fenómeno consiste en una serie de reacciones, en el que los radicales oxigenados dan lugar a su vez a una serie de compuestos (aldehídos, ácidos y cetonas) que son los responsables de las características desagradables de los productos enranciados, como el mal olor. Además, inducen en otras estructuras (como en proteínas de membrana) alteraciones que comprometen gravemente su función.

La vitamina E, que es un antioxidante beneficioso para la salud humana (previniendo enfermedades cardiovasculares, la enfermedad de Parkinson y otras enfermedades nerviosas) que, además de encontrarse de forma natural en los forrajes, se adiciona en los piensos comerciales utilizados en el cebo de corderos. Como se ha comentado con anterioridad, esta vitamina proporciona una estabilidad oxidativa de los productos animales, retrasando el fenómeno de la oxidación de los lípidos, que produce la aparición de olores y sabores a rancio, además de alterar el color y la textura de los mismos, así como disminuir el valor nutritivo al perderse algunas vitaminas y ácidos grasos poliinsaturados.

El contenido de vitamina E de los alimentos es variable, pudiendo llegar el coeficiente de variación al 50%. En cuanto a los productos de origen vegetal, depende de la especie y del grado de maduración, las plantas verdes contienen entre 80-200 UI de vitamina E/kg de MS, aunque la concentración de  $\alpha$ -tocoferol en los forrajes decrece rápidamente a medida que el estado fenológico de la planta avanza, y tras la siega por la acción del oxígeno y los rayos solares. El contenido de  $\alpha$ -tocoferol en concentrados es bajo, con la excepción de la semilla de soja cruda, pero el tratamiento de la semilla con calor destruye prácticamente todo el contenido de vitamina E. Los productos comerciales para suplir vitamina E usualmente

contienen all-rac- $\alpha$ -tocoferol acetato, que es más estable que los compuestos de alcohol y, por consiguiente, las pérdidas en la actividad biológica por el almacenamiento son más bajas, de aproximadamente el 1% mensual. All-rac- $\alpha$ -tocoferol acetato consiste en una mezcla de los 8 isómeros y está claramente establecido que su actividad biológica es menor que la forma natural.

En las dietas de corderos sometidos a sistema intensivo se añade una dosis de all-rac- $\alpha$ -tocoferol acetato que corresponde a un aporte de vitamina E de unos 45 mg/d lo cual resulta muy costoso para las explotaciones ganaderas. Una reducción en los días del aporte de vitamina E en el pienso, o el aporte de manera natural con forraje, supondría una importante disminución en los costes derivados de la alimentación de los animales (Ripoll *et al.*, 2013). La inclusión de antioxidantes en la dieta animal es un método efectivo para incrementar la estabilidad oxidativa del músculo y de las grasas, lo que puede resultar especialmente útil cuando se desea alargar la vida útil de la carne. La vitamina E es, posiblemente, el antioxidante natural más ampliamente analizado y estudiado como aditivo en la producción de carne en las diversas especies ganaderas y en la industria cárnica. La suplementación con vitamina E puede ejercer una influencia sobre la composición de ácidos grasos del producto y la eventual modificación del contenido de vitamina E en el músculo (Cilla *et al.*, 2007). Se comprueba que los animales suplementados con vitamina E, por encima de las dosis comerciales, son capaces de retener hasta cuatro veces más dicho componente, en comparación con otros animales no suplementados (Cilla *et al.*, 2007). Este hecho implica que modificaciones a través de la dieta origina importantes cambios en la composición muscular, pudiendo establecer posibles orientaciones que permitan adaptarse a las necesidades tecnológicas y a la demanda del consumidor. En general, la tendencia es a reducir la proporción de componentes derivados de la oxidación que favorezcan la extensión de la vida útil de la carne, con el fin de mejorar la calidad de la misma durante su conservación.

### 1.3. METABOLISMO DE LA VITAMINA E.

La absorción de la vitamina E es relativamente pobre, se ingiere unida a los lípidos de la dieta y sólo el 20-40 % de la dosis ingerida es absorbida, dependiendo esta absorción de la capacidad de digerir y absorber las grasas. Al ser una vitamina liposoluble, su absorción depende en gran medida de la funcionalidad biliar y pancreática, y de la composición de la dieta, de forma que las dietas ricas en triglicéridos de cadena media aumentan su absorción, mientras que las dietas ricas en ácidos grasos poliinsaturados la disminuyen. La vitamina E es transportada por lipoproteínas por lo que su concentración plasmática depende en gran medida de los niveles de lípidos plasmáticos, siendo posteriormente el tocoferol circulante acumulado lentamente por los tejidos. En este sentido, el incremento de la eficacia de la absorción, transporte y acumulación de la misma supondría un incremento de la cantidad de vitamina E depositada en el músculo y, por lo tanto, sería necesario una menor dosis de vitamina E y/o menor tiempo de ingesta de pienso con vitamina E para llegar a la misma concentración en el músculo, con el consiguiente ahorro económico.

Para la absorción intestinal de la vitamina E se requiere la presencia de ácidos biliares, ésta es absorbida por los enterocitos y después es secretada en forma de quilomicrones al sistema linfático y estos son transportados al sistema circulatorio. También se ha demostrado que puede ser secretada junto a HDL (Lipoproteínas de alta densidad). Los quilomicrones se forman en el intestino. Contienen ApoA1 (Apolipoproteína A1) y A2 y la ApoB48. Su componente lipídico son los triglicéridos y el colesterol de la dieta (1/3 del colesterol que se absorbe) y por el colesterol proveniente de la bilis (2/3 restantes). Se absorben por vía linfática y en circulación reciben ApoC y E desde las HDL. En la pared vascular de los tejidos son hidrolizados por la lipoproteína lipasa periférica (LPL), liberando ácidos grasos y glicerol, vitaminas y otros metabolitos liposolubles. En este sentido, parte de los tocoferoles presentes en los quilomicrones son transferidos a estos tejidos extrahepáticos. Estos son captados a nivel tisular, originándose partículas denominadas remanentes de quilomicrones, con un contenido proporcional menor de triglicéridos. Estos transfieren ApoC y entregan ApoA1 a las HDL y son captados por los receptores hepáticos B48: E, en donde continúan su catabolismo por acción de la lipoproteína lipasa hepática (LPL). En el hígado, por acción de la "proteína transferidora de  $\alpha$ -tocoferol" ( $\alpha$ -TP), una

parte sustancial del  $\alpha$ -tocoferol es incorporado a las VLDL (Lipoproteínas de muy baja densidad) nacientes, mientras que el resto, junto a las otras formas de vitamina E, es eliminado por la bilis, tras ser metabolizadas ( $\omega$ -hidroxilación) por un miembro de la familia citocromo P450, el CYP4F2, que permitirá la formación de metabolitos polares que serán excretados por la orina. Al tener el  $\alpha$ -tocoferol un transportador específico es la forma de la vitamina E que menos se elimina. La importancia de  $\alpha$ -TTP la muestra que un defecto genético es responsable de inducir una severa deficiencia de vitamina E caracterizada por una enfermedad neurodegenerativa, ataxia con deficiencia de vitamina E.  $\alpha$ -TTP juega un rol esencial en el mantenimiento de las concentraciones de  $\alpha$ -tocoferol en el plasma y tejidos. El mecanismo exacto por el cual  $\alpha$ -TTPA regula el tráfico intracelular tanto como la secreción de  $\alpha$ -tocoferol al plasma y VLDL no se conoce del todo. Una hipótesis es que  $\alpha$ -TTP facilita la secreción de  $\alpha$ -tocoferol asociado a VLDL a través de la ruta mediada por el aparato de Golgi. Sin embargo, estudios con sustancias inhibidoras de  $\alpha$ -TTPA han visto que no está acoplada la secreción de VLDL a la de  $\alpha$ -tocoferol. Otros estudios muestran que la vitamina E no es secretada por células del hepatocito mediante una ruta dependiente del aparato de Golgi. Demostrando que el  $\alpha$ -tocoferol llega a los orgánulos vesiculares intracelulares donde se co-localiza con  $\alpha$ -TTP antes de ser transportado a la membrana plasmática de una manera dependiente de  $\alpha$ -TTP, y que la secreción de  $\alpha$ -tocoferol desde los hepatocitos es inhibida por un metabolito inhibidor de varios transportadores de vitamina E, como el ABCA1.

Una vez secretadas a la circulación, las VLDL son convertidas en IDL (Lipoproteínas de densidad intermedia) y LDL (Lipoproteínas de baja densidad) por acción de la LPL, y compuestos de superficie (incluyendo el  $\alpha$ -tocoferol) son transferidos a las HDL. Sin embargo, la mayor parte de vitamina que alcanza el hígado es en forma de quilomicrones remanentes. Las VLDL se forman en el hígado. Su síntesis está regulada por la formación de ApoB100 y por los triglicéridos sintetizados en el hígado. Contienen ApoB100, C y E, y en circulación reciben ApoC y E desde las HDL. Al igual que los quilomicrones son hidrolizadas en tejidos extrahepáticos por el sistema LPL. Un 70%, son rápidamente captadas como remanentes de VLDL por los receptores hepáticos ApoB100: E y otra parte sigue hidrolizando sus triglicéridos y pierde ApoE, transformándose en LDL. Las LDL son el producto del catabolismo de las VLDL, y contienen sólo ApoB100 y son ricas en colesterol libre y

esterificado. Son principalmente captadas a nivel hepático por los receptores B100: E en competencia con las IDL y por los receptores periféricos B100. Los receptores la internalizan y permiten su catabolismo celular, liberando colesterol libre que inhibe a la hidroximetilglutaril-CoA reductasa (HMGCoAR), enzima clave para la síntesis de colesterol. El colesterol libre reduce la síntesis de receptores y estimula la acil colesterol acil transferasa (ACAT) que lo esterifica. De esta forma se regula la concentración del colesterol a nivel celular. Aproximadamente, 20-30% de las LDL son captadas por receptores inespecíficos de los macrófagos (Scavenger Receptor SR-A (SCARB1)).

Finalmente, las HDL son fundamentales en el transporte reverso del colesterol desde los tejidos hacia el hígado, único órgano capaz de excretarlo (vía biliar). Sintetizadas por el intestino e hígado. Su forma naciente (HDLn) es una bilámina de fosfolípidos y ApoA. Interactúa con los sistemas transportadores transmembrana de colesterol (ATP Binding Cassette – ABCA1 y G1/G4). El colesterol libre en la superficie de la molécula es esterificado e internalizado por acción de la lecitina colesterol acil transferasa (LCAT), dejando nuevos sitios para captar más colesterol u otras sustancias liposolubles, transformándose en partículas esféricas HDL3 y luego HDL2. El colesterol captado por las HDL puede dirigirse hacia el hígado para su excreción por la bilis por acción de la proteína transportadora de esteres de colesterol (CEPT), que transfiere el colesterol esterificado hacia las VLDL y LDL que lo entregan así a través de receptores B100: E o por captación selectiva a través del receptor Scavenger SR-B1 (SCARB1). La HDL no es catabolizada y vuelve a la periferia para captar más colesterol. Los receptores SR-B1 se encuentran distribuidos por todos los tejidos del organismo.

ABCA1 inicia la formación de HDL maduro facilitando la lipidación de apolipoproteína A-I. En un estudio se obtuvo una evidencia directa de que ABCA1 está envuelto en la secreción de  $\alpha$ -tocoferol desde los hepatocitos (Shichiri *et al.* 2010). Como se ha indicado con anterioridad, SR-B1 (*SCARB1; Scavenger receptor*) juega un rol esencial en el metabolismo de HDL facilitando el transporte de colesterol libre y esterificado y otros lípidos entre células. SR-B1 altera el colesterol de la membrana plasmática y la organización de lípidos de forma que facilita el flujo de colesterol y/o inicia eventos de señalización. Además

SR-BI interactúa con moléculas señalizadoras y activa rutas envueltas en ateroprotección. Otros estudios sugieren que HDL media en la ateroprotección, siendo el transporte reverso de colesterol (RCT) el mecanismo mejor estudiado. RCT consiste en la eliminación de colesterol de membrana desde las células, incluyendo macrófagos en la pared arterial, y su transporte al hígado para la biosíntesis de ácido biliar, excreción o reciclado de nuevas lipoproteínas o a tejidos esteroidogénicos para la producción de hormonas esteroideas. El primer paso en la ruta RCT envuelve la lipidación de apoA-I por ABCA1 llevando por último a la formación de partículas esféricas que aceptan colesterol adicional y fosfolípidos por otros transportadores. Este proceso secuencial de lipidación conlleva la eliminación neta de colesterol desde células periféricas y lleva a la formación de ésteres de colesterol enriquecidos con partículas de HDL, siendo el ligando preferido de SR-BI. Aparte del rol en la ruta RCT, HDL también tiene propiedades antiinflamatorias, antitrombóticas y antioxidantes y promueve la reparación endotelial, además muchas de estas acciones ateroprotectivas de HDL parecen ser mediadas por interacciones con SR-BI (Trigatti *et al.* 2011). Dado que el vehículo de transporte en el plasma de la vitamina E y carotenoides son las lipoproteínas, es razonable plantear la hipótesis de que el estado de estos micronutrientes en el plasma está gobernado por proteínas envueltas en el metabolismo de las lipoproteínas, como las apolipoproteínas (apoB, apoE, apoA-IV, apoC-III, etc.), lipoproteinlipasa (LPL), lipasa hepática, proteína transferidora de fosfolípidos, proteína transferidora de ésteres de colesterol y lecitina colesterol acil transferasa. Igualmente, se ha demostrado que además de los transportadores ABCA1 y SR-BI existen otros transportadores como el “Niemann-Pick C1-like1” que se ha encontrado relacionado con el transporte a nivel intestinal de partículas liposolubles, y por lo tanto de  $\alpha$ -tocopherol, o el transportador “multidrug resistance ATP binding cassette (ABC)”.

## 1.4. GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DE LA VITAMINA E.

A continuación, haremos una breve revisión sobre algunos genes y enzimas involucrados en el metabolismo del vitamina E que se han estudiados en este trabajo.

### 1.4.1. *LPL*.

La lipoproteína lipasa es una proteína que cataliza la hidrólisis de triglicéridos captados por la glándula mamaria, músculo, tejido graso, y otros, liberando selectivamente los AG, así como la transferencia de tocoferoles presentes en los quilomicrones a tejidos extrahepáticos. El gen ovino se localiza en el cromosoma Oar2, y tiene 22973 pares de bases (pb) y 10 exones (GenBank acc. nº NW\_004080165). El cDNA ha sido aislado en ovino por Edwards et al. (1993) (GenBank acc. NM\_001009394, X68308 y AF228667).

En bovino se ha visto que existe una regulación compleja a nivel transcripcional, post-transcripcional y post-translacional en el que intervienen factores nutricionales y hormonales. En esta especie, *LPL* ha sido objeto de extensos estudios en el tejido adiposo y glándula mamaria. La actividad y los niveles de mRNA de *LPL* son mayores en los músculos oxidativos, el tejido adiposo y corazón, mientras que en intestino delgado, riñón, bazo, pulmones y glándula adrenales presenta una actividad muy baja (Hocquette *et al.*, 1998). En ovino, la actividad y los niveles de expresión de *LPL* en el tejido adiposo perirrenal y músculo cardíaco están sobre regulados a nivel transcripcional por la insulina (Bonnet *et al.*, 2000), peso al nacimiento, sexo (Muhlhausler *et al.*, 2008), por el crecimiento y por la ingesta de niveles altos de energía (Andersen *et al.*, 1996; Yong *et al.*, 2008). Varios SNPs descritos en zona promotora, exones e intrones, afectan a la actividad del promotor, la estructura y la función de la enzima, interfiriendo en la expresión del gen (Yang *et al.*, 1995; Nicklas *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2004; Torigoe *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009). Variaciones en el gen de *LPL* se han descritos en bovino, caprino (Tank y Pomp, 1994; Badaoui *et al.*, 2007). Algunas de estas variaciones se han asociado con la cantidad de la grasa en la leche en cabras siendo interesante por su papel en la hidrólisis de los triglicéridos, a partir de quilomicrones y VDLs

(Badaoui *et al.*, 2007). Asimismo, controlando la liberación de AG, LPL puede afectar el contenido de grasa en leche o en la carne (Badaoui *et al.*, 2007; Hocquette *et al.*, 1999).

#### 1.4.2. *APOE*.

La Apolipoproteína E (APOE) es una proteína de 34 kDa que transporta colesterol y otros lípidos en plasma, y en otros tejidos, como el sistema nervioso central uniéndose a los receptores de superficie de APOE. En la periferia, transporta VLDL de síntesis hepática, quilomicrones sintetizados en intestino, y sus remanentes, así como una subclase de HDL, actuando como un ligando para la captación de estas partículas mediante receptores específicos. Es el principal componente de las apolipoproteínas en los quilomicrones. En cerebro, es sintetizada por astrocitos y microglía. Para que la APOE sea estable tiene que asociarse con lípidos, ya que ratones "knockout" para el gen *ABCA1* (responsable de la unión de lípidos a APOE) tienen una marcada reducción de la expresión de *APOE* en cerebro.

El gen ovino se localiza en el cromosoma Oar14, y tiene 2687 pb y 4 exones (GenBank acc. nº NW\_004080177), produciendo un mRNA de 1154 pb. (GenBank acc. nº NW\_004080177). Diferentes polimorfismos de *APOE* en humana se han asociado a la enfermedad de Alzheimer y a enfermedades cardiovasculares, encontrándose que ratones transgénicos para *ApoE4* se asocian a una menor retención de vitamina E en tejidos periféricos, produciendo una alteración del metabolismo de las lipoproteínas (Huebbe *et al.*, 2010). En ovino, Komatsu *et al.* (1998) caracterizaron el gen *APOE*, encontrándolo altamente expresado en tejido adiposo en humanos y ratones, siendo el estado nutricional un regulador de su expresión (Huang *et al.*, 2007). Estos autores describieron que la obesidad produce una reducción de la expresión de este gen, mientras que el ayuno y la pérdida de peso la incrementaban en modelos murinos. *APOE* se encuentra regulado por *ABCA1* (Wahrle *et al.*, 2004), y el receptor Scavenger clase B tipo 1 (*SCARB1*: Huang y Mazzone, 2004) ambos objeto de este estudio. En un estudio reciente polimorfismos de este gen se asocian con un mayor contenido de  $\alpha$ -tocoferol en el plasma en humanos (Borel *et al.*, 2007).

#### 1.4.3. *ABCA1*.

Esta proteína pertenece a la familia de proteínas ABC (ATP- binding cassette), que utilizan ATP para generar la energía necesaria para transportar metabolitos a través de membranas. Está formada por 2 mitades con estructura similar (Fitzgerald et al., 2001), siendo las estructuras tetraméricas de esta proteína la estructura funcional mínima requerida para la lipidación de partículas de apoA-I. La función más conocida de *ABCA1* es la de promover el flujo de colesterol y fosfolípidos a través de membranas, así como la formación de HDLs. En este sentido, ratones “knockout” para *ABCA1* mostraron bajos niveles de *APOE*, y de la secreción de *APOE* en astrocitos y células de la microglía (Wahrle et al., 2004). Oman et al. (2001) y Shichiri et al. (2010) obtienen evidencias de que *ABCA1* es un transportador de membrana de  $\alpha$ -tocopherol en los tejidos periféricos. En concreto, Reboul et al. (2009) demostraron que *ABCA1* es responsable de la absorción intestinal de tocoferol unido a HDL, y de la regulación del contenido de vitamina E en plasma. En 2010, Schichiri et al. demostraron su implicación en el transporte vitamina E en hígado.

El gen ovino se localiza en el cromosoma Oar2, y tiene 114838 pb y 50 exones (GenBank acc. nº NW\_004080165), produciendo un mRNA de 10664 pb. (GenBank acc. nº NW\_004080165). La expresión de *ABCA1* está regulada por una red transcripcional altamente sofisticada, mediada en parte por diversos grupos de factores de transcripción. Aunque hay evidencia de que la regulación de la expresión de *ABCA1* en el adipocito es específica de tejido, se sabe poco sobre su función. Le Lay et al. (2003) encontraron que *ABCA1* se veía inducido durante la diferenciación de pre-adipocitos 3T3-L1. Esta inducción no causó cambios en el contenido total de colesterol en la célula, pero sí en su distribución intracelular durante el proceso de diferenciación. Esto sugiere que el adipocito tiene poca capacidad para eliminar el colesterol y, que probablemente funcione como una molécula de señalización. En humana, múltiples estudios han buscado asociaciones de SNPs de *ABCA1* con los niveles de HDL-C y/o la presencia de aterosclerosis, encontrando que los SNPs del gen *ABCA1* contribuyen a la variación de los niveles de HDL y apoA-I en las poblaciones estudiadas. Sin embargo, los SNPs que se asocian a menores niveles de HDL tienen una frecuencia muy baja (< 1%) en las poblaciones estudiadas (Cohen et al., 2004).

#### 1.4.4. *SCARB1* y *PDZK1*.

Receptor Scavenger clase B tipo 1 (*SCARB1*) es una proteína transportadora que interactúa con HDL y LDL, así como con la vitamina E (Reboul et al. 2006, Witt et al., 2000, Reaven et al. 1998). Estos estudios demostraron que la absorción de la vitamina E no es sólo un proceso de difusión pasiva sino que esta mediado por transportadores, siendo el más importante el Scavenger receptor clase B tipo I. La proteína SR-BI/*SCARB1* tiene 509 aminoácidos con dos dominios hidrofóbicos que abarcan la membrana flanqueados por un grande y pesado dominio extracelular N-glicosilado. Tiene dos colas citoplasmáticas cortas de 10 y 40 aminoácidos que corresponden a los extremos N y C terminal, respectivamente. Los 4 residuos terminales del extremo C-terminal de SR-BI interactúan con una proteína adaptadora, la “PDZ domain containing 1” (*PDZK1*), una proteína citosólica que se ha demostrado que es importante para la estabilidad de SR-BI en los hepatocitos del hígado. Se ha sugerido que los niveles de vitamina E regulan la expresión de este gen mediante el estudio en células HepG2 (Sporstol et al., 2005). Además, se ha demostrado una regulación post-transcripcional del gen mediada por  $\alpha$ -tocoferol (Landes et al., 2003).

El gen ovino se localiza en el cromosoma Oar17, y tiene 94216 pb y 13 exones (GenBank acc. nº NW\_004080180), produciendo un mRNA de 2698 pb. (GenBank acc. nº NW\_004080180). Diversos polimorfismos del gen se han asociado con un mayor contenido de  $\alpha$ -tocoferol y carotenos en plasma humano (Borel et al., 2007), degeneración macular asociada a la edad (Zerbib et al., 2009) o enfermedades cardiovasculares. Mediante un análisis de asociación de genoma completo (GWAS) se identificaron tres regiones asociadas a contenido de  $\alpha$ -tocoferol en plasma humano: una cercana a *APOA4*, *APOA4*, y *APOC3*, otra a *CYP4F2* y la última a *SCARB1*.

En hígado, la expresión de *SCARB1* está regulada por *PDZK1*. Fenske et al. (2008) demostraron que la sobreexpresión de *PDZK1* inhibe la expresión de *SCARB1*. En ratones “knockout” para *PDZK1* se promueve la arterioesclerosis temprana, probablemente por la reducción de la actividad de *SCARB1* (Kocher et al., 2003). Igualmente, en humana se ha demostrado que polimorfismos del gen se asocian con el riesgo a padecer síndrome metabólico en hombres y mujeres obesas (Junyent et al., 2009). El gen ovino se localiza en el

cromosoma Oar1, y tiene 37712 pb y 9 exones (GenBank acc. nº NW\_004080164), produciendo un mRNA de 2068 pb. (GenBank acc. nº NW\_004080164).

#### 1.4.5. *NPC1L1*.

La absorción intestinal de colesterol y esteroles es un proceso complejo en el que intervienen distintas enzimas y transportadores, como la proteína *NPC1L1* (*Niemann-Pick C1-Like 1*). En humanos, se encuentra localizada normalmente en compartimientos intracelulares, desplazándose a la membrana plasmática del enterocito en función de la disponibilidad de colesterol. Diversos estudios han demostrado la influencia de variantes genéticas de *NPC1L1* sobre la concentración del colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (cLDL) en respuesta a la inhibición de la absorción por ezetimiba (Simon et al., 2005). Narushima et al. (2008) demostraron su implicación en la captación de  $\alpha$ -tocoferol. Se ha descrito una regulación de la expresión de *NPC1L1* a través de la proteína de membrana CD36, relacionada con la captación de AG y degradación de lipoproteínas (Silverstein y Febbraio, 2009), siendo a su vez la expresión de *CD36* regulada por  $\alpha$ -tocoferol (Ricciarelli et al., 2000). El gen ovino se localiza en el cromosoma Oar4, y tiene 21127 pb y 19 exones (GenBank acc. nº NW\_004080167), produciendo un mRNA de 4002 pb. (GenBank acc. nº NW\_004080167). Por otra parte, recientemente se ha observado que hay una asociación entre los polimorfismos de *NPC1L1* y la variación en la absorción intestinal de colesterol,  $\alpha$ -tocoferol, esteroles y la concentración plasmática de LDL-c en población normolipémica (Cohen et al., 2006; Yamanashi et al., 2009).

#### 1.4.6. *TTPA*.

La función de la proteína transferidora de  $\alpha$ -tocoferol (TTPA) es mantener los niveles plasmáticos de  $\alpha$ -tocoferol, transfiriéndolo desde los hepatocitos a las lipoproteínas circulantes. Mutaciones en este gen producen ataxia con deficiencia en vitamina E, que es un desorden autosómico recesivo caracterizado por bajos niveles de vitamina E en plasma y una neurodegeneración progresiva (Ouahchi et al. 1995). Se expresa en hígado, pulmones, bazo, riñón, glándula adrenal, cerebro, útero y placenta (Gohil et al., 2004; Hosomi et al., 1998; Kaempf-Rotzoll et al., 2003). El gen ovino se localiza en el cromosoma Oar9, y tiene 38351 pb y 5 exones (GenBank acc. nº NW\_004080167), produciendo un mRNA de 1098 pb (GenBank acc. nº HQ268507). Luo et al. (2012) caracterizaron el gen en ovino mostrando

que la expresión de *TTPA* en hígado aumentaba en ovejas sometidas a bajos niveles de  $\alpha$ -tocoferol.

#### 1.4.7. *CYP4F2*.

Citocromo P450 4F2 (*CYP4F2*) cataliza la  $\omega$ -hidroxilación de la cadena lateral de los tocoferoles y tocotrienoles, convirtiéndolos en metabolitos polares para poder ser eliminados por la urea. Bardowell et al. (2010) mostraron que diferentes mutaciones de este gen producían una alteración en la actividad enzimática y el metabolismo de la vitamina E en células de insectos que expresaban el gen humano. El gen ovino se localiza en el cromosoma Oar5, y tiene 23421 pb y 12 exones (GenBank acc. nº NW\_004080168), produciendo un mRNA de 2350 pb (GenBank acc. nº NW\_004080168). En un análisis de asociación de genoma completo (GWAS) se identificó una región asociada al contenido de  $\alpha$ -tocoferol en plasma, pudiendo de esta manera contribuir a parte de la varianza de este carácter.

#### 1.4.8. *PPARA* y *PPARG*.

Los receptores activados por proliferadores peroxisomales (PPAR) son factores de transcripción que pertenecen a una superfamilia de receptores de esteroides nucleares. Se han identificado 3 isoformas: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta$ , llamado  $\delta$  también, y PPAR $\gamma$ . PPAR $\alpha$  se expresa predominantemente en el tejido adiposo marrón e hígado, luego en riñón, corazón y músculo esquelético. PPAR $\beta$  se expresa en muchos tejidos, pero presenta los niveles más altos en intestino, riñón y corazón. Mientras PPAR $\gamma$  se expresa principalmente en el tejido adiposo y menos en colon, retina y sistema inmune (Desvergne y Wahli, 1999; Kersten et al., 2000). A nivel molecular los PPAR funcionan como otros receptores nucleares. Primero se unen a los elementos específicos en el promotor de los genes diana en forma de heterodímeros con el receptor X retinoide (RXR). Posteriormente activan la transcripción de genes como respuesta de unión de los ligandos a los receptores (Kliewer et al., 1992; Clarke et al., 2000; Kersten et al., 2000). Los AG palmítico, oleico, y varios AGPI son ligandos potentes de los PPAR y ejercen su efecto en la expresión de genes a través de los PPAR. En general los PPAR son más sensibles a los AG de cadena larga, (18-22 átomos de carbono, n-6 y n-3), comparado con los saturados y los monoinsaturados (Krey et al., 1997; Kliewer et al., 1997; Forman et al., 1997) Los genes diana de PPAR $\alpha$  son un grupo homogéneo que

participan en el catabolismo y captura de los AG, la unión de AG en la célula, la oxidación y el transporte y ensamblaje de las lipoproteínas.

Debido a su papel central en el metabolismo de lípidos y siendo los AGPI ligandos potentes de PPAR $\alpha$ , el gen ha sido propuesto como interesante ya que puede alterar la expresión de genes relacionados con el metabolismo de las grasas. El gen ovino se localiza en el cromosoma Oar3, y tiene 22171 pb y 6 exones (GenBank acc. nº NC\_019460), produciendo un mRNA de 1886 pb. (GenBank acc. nº GAAI01000509). La expresión de *PPARA* se incrementa en fetos de ovino cuyas madres han sido sobrealmimentados antes del parto indicando un efecto importante de la dieta en la expresión de *PPARA* (Tong *et al.*, 2008). La variación de *PPARA* también se ha explorado en animales de interés económico (Gill *et al.*, 2010). Las mutaciones 82 A>G y 232 C>G encontrados en el gen *PPARA*, en bovino, han sido asociados con el peso de pieza de carne analizada después de la maduración y con la jugosidad, respectivamente (Gill *et al.*, 2010).

El gen que codifica PPAR $\gamma$  se denomina *PPARG* (Fajas *et al.*, 1997) y da lugar a dos isoformas proteicas, PPAR $\gamma$ 1 y PPAR $\gamma$ 2. El gen ovino se localiza en el cromosoma Oar19, y tiene 45440 pb y 6 exones (GenBank acc. nº NW\_004080182), produciendo un mRNA de 1428 pb. (GenBank acc. nº NM\_001100921). De todos los PPARs, el receptor nuclear PPAR $\gamma$ , es el más adipogénico y se expresa en la etapa del preadipocito, siendo un regulador muy importante de adipogénesis (Hu *et al.*, 1995). La expresión de PPAR $\gamma$  en el tejido adiposo dirige la diferenciación de las células pluripotentes a células adipogénicas (Tontonoz *et al.*, 1994). El PPAR $\gamma$  tiene influencia en el almacenamiento de AG en el tejido adiposo. Junto con los factores de transcripción C/EBP induce la diferenciación y maduración de los preadipocitos en adipocitos (Hu *et al.*, 1995). La gran mayoría de genes diana de PPAR $\gamma$  están involucrados en las rutas lipogénicas. En ovino los trabajos que exploran la diversidad del *PPARG* son escasos. Tong *et al.* (2008) reportan un papel crucial del gen *PPARG* en el desarrollo del tejido adiposo encontrando que en fetos cuyas madres estaban sobrealmimentadas durante la gestación la expresión de PPAR $\gamma$  aumentaba. Todos estos datos convierten *PPARG* en un gen candidato para la calidad de la carne.

#### 1.4.9. *SREBF1*.

Las proteínas de unión a los elementos de respuesta a los esteroles (SREBPs) pertenecen a la familia de factores de transcripción unidos a la membrana, que activan genes involucrados en la síntesis de colesterol y de los AG, y la captación de los mismos de las lipoproteínas de plasma (Hua *et al.*, 1995). El gen ovino se localiza en el cromosoma Oar11, y tiene 15531 pb y 21 exones (GenBank acc. nº NW\_004080174), produciendo un mRNA de 3621 pb. (GenBank acc. nº XM\_004013336). Tres formas de SREBPs han sido descritos *SREBP-1a*, *SREBP-1c* y *SREBP2* que estimulan la expresión de más de 30 genes involucrados captación y síntesis de colesterol, AG, triglicéridos y fosfolípidos (Horton *et al.*, 2003). *SREBF1* está involucrado en la diferenciación de los adipocitos (Briggs *et al.*, 1993; Tontonoz *et al.*, 1993; Yokoyama *et al.*, 1993) y en la síntesis de AG y colesterol. Se expresa en el tejido adiposo, hígado (Kim *et al.*, 1996; Shimano *et al.*, 1997), y músculo (Shimomura *et al.*, 1997). La variabilidad del gen ha sido explorada en animales de interés económico cuyos productos están destinados al consumo humano. En bovino, Hoashi *et al.* (2007) describen una inserción/ delección de 84 pb en el intrón 5 de *SREBF1* y lo asocian con la composición de la grasa intramuscular. La misma inserción/ delección fue asociado con el contenido del C14:1 cis - 9 en la grasa subcutánea en bovino de la raza Fleckvieh (Barton *et al.*, 2010). Conte *et al.* (2010), no encontraron asociación con la composición de AG en leche.

#### 1.4.10. *CEBPB*.

Las proteínas de unión a CCAAT/enhancer (C/EBPs) pertenecen a la familia de factores de transcripción bZIP (*basic leucine zipper*). Son muy importantes en la diferenciación, desarrollo y función celular, y en la respuesta a daños celulares (Seagroves *et al.*, 2000; Muller- Tidow y Koschmieder, 2008). Se expresan en varios tejidos y su distribución tisular no se limita sólo al tejido adiposo (Lekstrom-Himes y Xanthopoulos, 1998). La regulación de la expresión de varios miembros de la familia C/EBP se ha observado durante el proceso de adipogénesis y estudios de pérdida o ganancia de función, indicando que estas proteínas juegan un papel muy importante en la diferenciación y desarrollo del adipocito (Wu *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1995). El gen que codifica para la isoforma C/EBP $\beta$  es *CEPB* y en ovino se localiza en el cromosoma Oar13, y tiene 395 pb y 1 exón (GenBank acc. nº NW\_004080176), produciendo un mRNA del mismo tamaño (GenBank acc. nº

NW\_004080176). El gen se expresa de forma constitutiva en hígado, intestino, pulmón, y tejido adiposo. Sin embargo, en ratón también se ha detectado su expresión en corazón, riñón y bazo (Cao *et al.*, 1991). Se ha demostrado que regulan la composición corporal, las hormonas relacionadas con el balance energético, genes involucrados en la homeostasis de glucosa y de los lípidos (Kaestner *et al.*, 1990; El Jack *et al.*, 1999; Jurado *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2004; Staiger *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 2010), y en la producción de adiponectinas (Miller *et al.*, 1996; Seo *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2004), uniéndose a las cajas CCAAT presentes en los promotores de los genes diana. Algunos de estos son la adiponectina (Park *et al.*, 2004), leptina (Salma *et al.*, 2006), factor de crecimiento de insulina 1 (IGF- 1) (Staiger *et al.*, 2009), GLUT4 (Wertheim *et al.*, 2004), fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PPEK) (Jurado *et al.*, 2002), y *acetil CoA carboxilasa α* (ACACA) (Shi *et al.*, 2010), entre otros. La expresión de PPARG antecede la inducción de CEBPB en la cascada de eventos que conducen a la diferenciación de los adipocitos (Tontonoz *et al.*, 1995). En este sentido, se ha observado que su coexpresión en fibroblastos tiene un efecto sinérgico sobre la inducción del proceso de conversión en adipocitos, de ahí la importancia del estudio conjunto de ambos genes.

### 1.5. LA GENÓMICA NUTRICIONAL.

La secuenciación del genoma humano y los importantes avances en este campo, han puesto de manifiesto que nuestro genoma es sensible al entorno nutricional en un doble sentido: los nutrientes pueden regular los genes y, por otra parte, los genes modulan el efecto de la dieta (Ordovás, 2006; Carmena, 2008; Pérez- Martínez *et al.*, 2008). De esta forma, nace una nueva disciplina, la Genómica Nutricional, que estudia el efecto de la nutrición en el genoma y promete una mayor personalización de las dietas con el propósito de mejorar los resultados terapéuticos para las enfermedades y, quizás los más importante, prevenir las enfermedades (Ordovás y Corella, 2006).

La genómica nutricional es el estudio que engloba la nutrición y el genoma, incluyendo todas las demás “ómicas”, destacando la interacción entre la nutrigenética y la nutrigenómica (Mooser y Ordovás, 2003; Gómez Ayala, 2007; Ordovás y Corella, 2006). De esta forma, la ciencia de la nutrición en el siglo XXI incorpora el conocimiento del metabolismo, de las interacciones gen-nutriente y de los alimentos, con la finalidad de

mejorar la alimentación y la salud, y ofrecer una nutrición personalizada. La nutrigenética estudia la respuesta distinta de los individuos a la dieta en función de las variaciones o polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el genoma. Esto incluye la identificación y la caracterización de las variantes génicas asociadas a las diferentes respuestas frente a los nutrientes o responsables de ellas (Pérez- Martínez *et al.*, 2008). Describe las interacciones entre los nutrientes (o hábitos dietéticos) y las características de las personas, que hasta cierto punto vendrán determinadas por su dotación genética. Por tanto, el objetivo de la nutrigenética es generar recomendaciones específicas sobre la mejor composición de la dieta para el óptimo beneficio de cada individuo (Pérez- Martínez *et al.*, 2008).

La nutrigenómica estudia cómo influyen los nutrientes bioactivos de la dieta sobre el genoma, proteoma y metaboloma (Debusk *et al.*, 2005). Además, estudia también la posible contribución del genoma de cada individuo a la aparición de enfermedades que están relacionadas con la dieta y se puede definir como la ciencia que estudia la relación molecular entre los estímulos nutricionales y la respuesta de los genes (Chavez y Muñoz de Chavez, 2003). Aporta al entendimiento de cómo la nutrición influye en las rutas metabólicas y homeostasis, así como esta regulación se altera en la fase temprana de una enfermedad relacionada con la dieta.

Es una ciencia que se está desarrollando actualmente, existiendo estudios incipientes en Europa y en España. En este sentido, su aplicación permitirá detectar las interacciones gen-nutriente, pudiendo crecer en diversas direcciones. Por una parte, el estudio de la influencia de los nutrientes sobre la regulación de la expresión génica (nutrigenómica) y, por otra, conocer la influencia de las variaciones genéticas interindividuales en la respuesta del organismo a los nutrientes (nutrigenética). Estas variaciones individuales de la expresión de genes detectados al mismo nivel de alimentación sobre caracteres de calidad y salud humana mediante la nutrigenómica, podrán ser utilizados como marcadores de calidad y en esquemas de selección en la producción animal. Esta posibilidad es una estrategia de alto interés para desarrollar con más eficiencia los programas de mejora, en estos caracteres de calidad que en general presentan una baja heredabilidad.



## 2. OBJETIVO.

El objetivo del presente trabajo es: determinar el grado de influencia de diferentes sistemas de producción (diferentes días de finalización con concentrado suplementado con vitamina E) en corderos ligeros tipo ternasco en la expresión de genes implicados en la captación, transporte y eliminación de  $\alpha$ -tocoferol (*SCARB1*, *ABCA1*, *NPC1L*, *LPL*, *TTPA*, *APOE*, *CYP4F2*), así como de genes que codifican factores de regulación de los mismos (*PDKZ1*, *PPARG*, *PPARA*, *SREBP1* and *CEBPB*) en el intestino delgado (yejuno).

Mediante la realización del presente trabajo se pretende avanzar en el conocimiento de la base genética e interacción gen-nutriente de los mecanismos moleculares implicados en el metabolismo de la vitamina E en el intestino delgado (yejuno) de corderos ligeros tipo ternasco.



## 3. MATERIAL Y MÉTODOS.

### 3.1. MATERIAL ANIMAL

Para realizar el ensayo se utilizó las instalaciones del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (CITA) del Gobierno de Aragón en Montaña (Zaragoza), 41° 3'N, 0° 47 'W; altitud 225m. Durante el ensayo los animales fueron estabulados en parques hasta el sacrificio, el cual se realizaba en el matadero experimental que el CITA posee. Los análisis genéticos se realizaron en laboratorio de Genética molecular animal del CITA.

#### 3.1.1. Diseño experimental.

El material animal estudiado ha constado de 58 corderos machos de raza Rasa Aragonesa sacrificados a los 22-24 kilogramos de Peso Vivo (PV) (peso Ternasco de Aragón). Todos ellos procedían de una cubrición controlada de un rebaño de 120 ovejas. Tras 40-45 días de lactación los corderos fueron destetados y distribuidos en 4 tratamientos teniendo en cuenta los días que habían ingerido vitamina E, y el peso y la edad. También se estudió un grupo de corderos alimentados en praderas de alfalfa:

- *Tratamiento 1 (Alfalfa, A)*: Los corderos (n=8) y las madres estaban en praderas de alfalfa hasta el sacrificio. Los corderos disponían de concentrado y no fueron destetados. Análisis realizados sobre el contenido de dl- $\alpha$ -tocoferol mostraron que la alfalfa tenía 11.5 mg  $\pm$  1.6 mg/kg de MS de alfalfa.
- *Tratamiento 2 (Testigo, T)*: Corderos estabulados (n=12), disponían de concentrado *ad libitum*. Los corderos fueron cebados con pienso de cebo estándar, sin adicionar vitamina E.
- *Tratamiento 3 (VE10d)*: Los corderos (n=13) tomaron pienso de cebo control que contenía 500 mg/kg de dl- $\alpha$ -tocoferol acetato en el pienso durante los últimos 7 a 14 días previos al sacrificio.
- *Tratamiento 4 (VE20d)*: Los corderos (n=14) tomaron pienso de cebo control que contenía 500 mg/kg de dl- $\alpha$ -tocoferol acetato en el pienso durante los últimos 18 a 25 días previos al sacrificio.

- **Tratamiento 5 (VE30d):** Los corderos (n=11) tomaron pienso de cebo control que contenía 500 mg/kg de dl- $\alpha$ -tocoferol acetato en el pienso durante los últimos 29 a 36 días previos al sacrificio.

En la Tabla 1 se puede ver la composición química del concentrado y la alfalfa.

Tabla 1. Composición química del concentrado y de la alfalfa de los corderos.

	MS*	CZ	PB	NDF	ADF	ADL
<b>Testigo</b>	89,75	5,21	17,2	17,59	4,55	0,34
<b>Pienso Vit E</b>	89,92	5,43	18,18	19,56	5,28	0,52
<b>Alfalfa</b>	95,78	10,22	15,42	32,56	20,43	3,55

\*Valor medio del contenido en materia seca (MS), cenizas (CZ), proteína bruta (PB), fibra neutro detergente (NDF), fibra ácido detergente (ADF), y lignina ácido detergente (ADL) como % sobre materia seca del concentrado y la alfalfa

### 3.1.2. Sacrificio y toma de muestras.

Semanalmente se pesaron los animales a primera hora de la mañana con una balanza electrónica (precisión  $\pm 100$  g). La ganancia media diaria (GMD, en g) se calculó por regresión lineal del peso vivo sobre el tiempo. Cuando los corderos alcanzaron los 22-24 kg PV se sacrificaron en el matadero experimental que el CITA posee en Zaragoza, siguiendo la normativa de la *Indicación Geográfica Protegida del Ternasco de Aragón* (Regulación (EC) Nº. 1107/96), que exige que los animales deben alcanzar los 22-24 kg de PV y tener menos de 90 días de edad. Los sacrificios fueron organizados semanalmente por grupos de animales según el peso final establecido. Se realizó respetando la normativa sobre protección de animales en el momento del sacrificio (Directiva 93/119/CE, RD 54/1995), supervisados por el Comité sobre bienestar animal del Centro (protocolo número 2009-01\_MJT).

Tras el sacrificio se aislaron muestras de: músculo *Longissimus dorsi*; hígado; ganglios linfáticos mesentéricos; grasa subcutánea a la altura de las vértebras Atlas y Axis, y tres partes diferenciadas de intestino delgado (duodeno, íleon y yeyuno) con diferente actividad en la absorción de grasas y vitamina E. Éstas fueron inmediatamente envueltas en papel de aluminio debidamente identificado e introducidas en nitrógeno líquido para, posteriormente, almacenarlas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para la posterior extracción de los ácidos nucleicos.

Este material animal se basa en grupos con valores extremos para el contenido de vitamina E en la carne, estando este contenido significativamente correlacionado con los valores de oxidación lipídica y pigmentos hemáticos (Ripoll et al., 2013). Es por ello que, el material animal generado resulta idóneo para la búsqueda de genes diferencialmente expresados en función del sistema de alimentación y del diferente contenido de vitamina E, y para permitirnos dilucidar los mecanismos bioquímicos relacionados con el metabolismo de la vitamina E en rumiantes, y su diferente contenido final en músculo. La detección de genes sobre o bajo-expresados asociados a una cantidad de vitamina E y a una dieta determinada nos permitirá determinar genes candidatos sobre los que buscar mutaciones individuales que puedan afectar a parte de la varianza del carácter en estudio.

### 3.2. EXTRACCIÓN DE mRNA.

El RNA total celular se extrajo y se purificó a partir del reactivo TRI- REAGENT y el kit “RNeasy <sup>®</sup> Lipid Tissue Mini kit” (QIAGEN). El protocolo está descrito a continuación. Se realizó la extracción de las 58 muestras de yeyuno. Igualmente para testar la especificidad tisular de la amplificación se llevó a cabo la extracción de RNA y de muestras de los músculos *Longissimus dorsi*, hígado, duodeno, íleon y grasa subcutánea de 3 animales de cada tratamiento (15 por tejido; n= 75).

- Protocolo de extracción del RNA.

Este método se basa en el uso de una solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para lisar las células. Posteriormente la muestra se separa en dos fases acuosa y orgánica, seguida por la extracción y precipitación de RNA total con cloroformo e isopropanol, respectivamente, a partir de la fase acuosa. El tejido se disgregó y se homogenizó utilizando el homogeneizador *OMNITIP*. Se siguió el siguiente protocolo de extracción:

- Sin dejar descongelar el tejido, se añadieron 750 µl de TRI-REAGENT (QiAzol Lysis Reagent) para, posteriormente, disgregar el tejido animal con la ayuda del homogeneizador *OMNITIP (International GLH)* para romper las estructuras celulares y liberar el RNA. A partir de este último paso, toda manipulación del homogenizado

que contiene el RNA extraído se realiza en campana vitrina de gases modelo BURDINOLA ST 1500. El tubo con el homogenizado se mantuvo a temperatura ambiente sobre la gradilla durante 5 minutos aproximadamente.

- Se añadieron 200  $\mu$ l de cloroformo a cada homogenizado para separar las fases obtenidas tras la lisis celular y se agitó cada tubo mediante un agitador vórtex. Se colocó cada tubo a temperatura ambiente durante 2-3 minutos para facilitar dicha separación.
- Se centrifugó a 12000 gx, a una temperatura de 4°C, durante 15 minutos en la centrífuga 5810R de Eppendorf. Tras este paso el resultado de la centrifugación son tres fases completamente diferenciadas: la fase superior de color acuoso contiene el RNA; una interfase de color blanco, y una fase inferior de color rojo que constituye la fase orgánica. (Para considerar una centrifugación correcta, el volumen de fase acuosa debe superar los 200  $\mu$ l).
- Se transfirió la fase acuosa, a un nuevo tubo eppendorf de 1'5 ml, en 600  $\mu$ l de etanol al 70 % y se agitó cada tubo.
- Posteriormente, se traspasaron 700  $\mu$ l de cada tubo a la columna *RNeasy mini* colocada en un tubo de 2 ml y se centrifugó a 8000 gx a temperatura ambiente durante 1 minuto. A partir de esta última centrifugación (incluida ésta) todas las siguientes fueron realizadas en la centrífuga Biofuge 3 de Heraeus Instruments.
- Tras este primer paso por la columna *RNeasy mini*, se descartó el eluido y se repitió el paso anterior utilizando el resto de la muestra, descartando de nuevo el eluido.
- Posteriormente, y manteniendo el tubo eppendorf colector, se adicionaron 700  $\mu$ l de buffer RW1 a la columna y se centrifugó a 8000 gx a temperatura ambiente (20°C aproximadamente), durante 1 minuto para limpiar la membrana, descartándose el eluido.
- Se añadieron a la columna 500  $\mu$ l de buffer RPE a la columna y se centrifugó a 8000 gx, a temperatura ambiente durante 1 minuto y se descartó el eluido. Se añadieron de nuevo 500  $\mu$ l de buffer RPE y se repitió la misma centrifugación, durante 2 minutos (esta centrifugación más larga favorece el secado de la membrana eliminando restos de etanol que pudieran interferir posteriormente).

- Se colocó la columna en un nuevo tubo eppendorf de 1'5 ml y se añadieron 35  $\mu$ l de agua libre de RNAsas directamente en el centro de la columna para obtener el eluido de RNA final. Se centrifugó 1 minuto a 8000 gx.
- Finalmente, todos los tubos eppendorf fueron congelados a -80°C.

Después de la extracción, se determinó la cantidad y la pureza del mRNA con el nanoespectrofotómetro (*Implegene*) mediante la cuantificación de la densidad óptica a 260 y 280 nanómetros respectivamente. La presencia de proteínas y otros inhibidores se estimó a partir de los ratios de absorbancia 260/280 y 260/230 considerando valores aceptables de  $[1.8 \pm 0.2]$ . Todos los tubos eppendorf fueron congelados a -80°C hasta la síntesis de cDNA. Los valores correspondientes a la concentración de RNA en el eluido nos indicaron qué volumen de cada muestra debe ser considerado para que 1  $\mu$ g de RNA sea retrotranscrita a DNA complementario (cDNA).

### 3.3. SÍNTESIS DE DNA COMPLEMENTARIO (cDNA).

Es muy importante que las muestras de RNA sean mantenidas en frío durante todo el proceso. La síntesis de cDNA se llevó a cabo tras el tratamiento con DNAsa (DEOXYRIBONUCLEASE I, AMPLICIFICATION GRADE), para eliminar el ADN que pudiese haber en la muestra y posterior utilización del kit SuperScript III First- Strand SuperMix (Invitrogen) (B).

#### Tratamiento de la muestra de RNA con DNAsa I:

- Se añadió en un tubo de 0'5 ml libre de RNAsas:
  - 1  $\mu$ g de RNA (de muestra)
  - 1  $\mu$ l de DNAsa I buffer de reacción 10X
  - 1  $\mu$ l de DNAsa I, Amplication Grade (1U/ $\mu$ l)
  - agua DEPC hasta 10  $\mu$ l de volumen final. El agua DEPC es agua tratada con dietilpirocarbonato al 0.1% (v/v en agua ultrapura). Durante la preparación de la solución de 0,1 % DEPC, esta se mezcla vigorosamente durante 1 minuto, se incuba a temperatura ambiente

durante toda la noche en la campana de extracción, y se autoclava la solución antes de su uso para inactivar el DEPC.

- Incubación a temperatura ambiente 15 minutos.
- Inactivación de DNAsa I: 1  $\mu$ l de EDTA 25 mM.
- Incubación a 65° C, 10 minutos en el termociclador BIOMETRA T 3000.

Síntesis de cDNA - kit SuperScript III First- Strand SuperMix (Invitrogen):

- Se preparó el mezcla de reacción trabajando en frío (hielo), añadiendo en un tubo libre de RNAsas de 0.5 ml:
  - 10  $\mu$ l de buffer 2x RT reaction mix
  - 2  $\mu$ l de enzima RT mix,
  - 7  $\mu$ l de mRNA (más de 1  $\mu$ g)
  - Agua libre de RNAsas (DEPC) hasta completar 20  $\mu$ l de volumen final.
- Incubación: 25° C 10 minutos; 50°C 30 minutos y, 85° C durante 5 minutos.
- Se añadió 1  $\mu$ l de RNAsa H (en baño de hielo) e incubar a 37° C durante 20 minutos. Se almacenó el cDNA a -20° C.

#### 3.4. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL CDNA SINTETIZADO.

Se realizó una PCR convencional del gen de *beta actina* (*ACTB*) de expresión constitutiva en todos los tipos celulares. La amplificación se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ l contenido 5 pmol de cada uno de los cebadores (F-5'GGACCTGACGGACTACCTCATG-3' y R- 5'GGCCATCTCCTGCTCGAAGT-3'), 200 nM dNTPs, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100 y 0.5 U Taq polymerasa (Biotools). La amplificación se realizó en el termociclador *Biometra T3000*. Se realizaron 35 ciclos de amplificación con un paso de desnaturación a 94°C durante 30 segundos, de hibridación a 60° C durante 30 segundos, y de extensión a 72° C durante 30 segundos. Los productos de amplificación de 136 pb fueron verificados en geles de agarosa al 2 % teñido con SYBRsafe, compuesto fluorescente similar al Bromuro de etidio pero menos citotóxico. La visualización de los geles se realizó en un

analizador de imágenes BiORAD modelo Gel Doc XR+ equipado con una pantalla de conversión XcitaBlue y con el software ImageLab vs. 4.0. La cantidad y la calidad del mismo fueron determinadas en un nanoespectrofotómetro (*Implegene*) mediante la cuantificación de la densidad óptica a 260 y 280 nm. Como en el caso del RNA la presencia proteínas y otros inhibidores de la PCR se estimaron a partir de los ratios de absorbancia 260/280 y 260/230 considerando valores aceptables de  $1.8 \pm 0.2$  y de  $2.0 \pm 0.2$ , respectivamente. La relación óptima 260/ 280 es 1.8- 2.0

### 3.5. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN GÉNICA.

Los genes analizados en este trabajo se han elegido por su relación con la variabilidad de contenido de vitamina E en suero en estudios en humana, o por su relación con las rutas metabólicas de la vitamina E. Igualmente se han seleccionado genes codificadores de factores de transcripción que pueden regular la expresión de los genes relacionados con el metabolismo de la vitamina E. Los genes inicialmente incluidos en el estudio fueron: *SCARB1* (Scavenger receptor clase B tipo 1), *PDZK1* ("PDZ domain containing 1"), *CYP4F2* (polipéptido 2 del citocromo P450 familia 4, subfamilia F), *ABCA1* (ATP-binding cassette A1), *APOE* (Apolipoproteína E), *NPC1L1* (Niemann-Pick C1-like1), *LPL* (Lipoproteína lipasa), *SREBP1* (Sterol regulatory element-binding protein 1), *PPARA* (peroxisome proliferator-activated receptor alpha), *PPARG* (peroxisome proliferator-activated receptor gamma), *CEBPB* (CCAAT/enhancer binding protein B), y *TTPA* (Transportador de alpha tocopherol). Para normalizar los resultados de expresión se eligieron 3 genes de expresión constitutiva: *RPL37* (proteína ribosomal 37), *RPL19* (proteína ribosomal 19), y *B2M* (microglobulina B2).

#### 3.5.1. Diseño y optimización de cebadores.

Los cebadores se diseñaron utilizando el programa Primer3 vs. 4.0 (<http://primer3.ut.ee/>). Cuando fue posible los cebadores fueron diseñados en la unión exón- exón, o en exones diferentes con el fin de poder evitar la amplificación de DNA genómico. Los cebadores diseñados amplifican secuencias entre 80- 160 pb, ya que ha sido descrita una máxima eficiencia de la amplificación para este tamaño. Para los genes *TTPA*, *NPC1L1*, *ABCA1*, *APOE*, *PDZK1* y *SCARB1*, de los cuales no existía secuencia de cDNA en las

base de datos GenBank, se obtuvo la secuencia de cDNA de bovino del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), y se realizó un estudio de identidad con el genoma ovino versión 3.1 mediante la herramienta BLAST (<http://www.livestockgenomics.csiro.au/blast/>). De esta forma se identificó la región genómica y cromosoma dónde están situados los genes, y se obtuvo la secuencia ovina de los mismos a través del genoma ovino (<http://www.livestockgenomics.csiro.au/sheep/oar3.1.php>) o del Genbank. Una vez identificados los exones se utilizó la herramienta PRIMER3 para el diseño de los cebadores.

- Cebadores de genes de expresión constitutiva o genes de referencia (GRs):

Los genes de expresión constitutiva se consideran un grupo de genes que se expresan en todas las células del organismo y codifican proteínas que son esenciales para el funcionamiento general de las células y son conocidos como “housekeeping genes”. Para obtener una medida precisa de la expresión de un gen es esencial normalizar los resultados del PCR a tiempo real en relación a la expresión fija de un gen de referencia, de tal forma que ésta no se vea afectada por las condiciones experimentales. Aunque la normalización con referencia a la expresión constitutiva de un gen “housekeeping” sea el método más común, no hay un gen de referencia universal que sea constante en todas las situaciones experimentales. Para normalizar los resultados de expresión de los genes de interés hemos testado la estabilidad de 3 genes de expresión constitutiva mediante modelos mixtos (Serrano et al., 2011) para seleccionar el mejor candidato para nuestras condiciones experimentales. Los cebadores de los genes de expresión constitutiva, el tamaño de amplicón y las condiciones de la RT-qPCR están descritos en la tabla 2.

Tabla 2. La secuencia de los cebadores de los genes de expresión constitutiva y las condiciones de amplificación por PCR Tiempo- Real.

Genes	Cebadores forward y reverse	Amplicón pb	Condiciones de PCR	
			TH	nM
<i>B2M</i>	F-5'ACGCTGAGTTCACTCCAAAC-3' R-5'GGTGCTGCTTAGAGGTCTCG-3'	109	59	600 600
<i>RPL19</i>	F-5'CAACTCCGCCAGCAGAT-3' R-5'CCGGGAATGGACATGTCACA-3'	76	60	200 200
<i>RPL37</i>	F-5'GAAGTCGACCTGTGGCAAGT-3' R-5'CTCATTGACCAGTCCCAGT-3'	105	60	200 200

TH: temperatura de hibridación; nM: concentración de cebadores en nano molar; F: cebador forward y R: cebador reverse.

- Cebadores de genes diana:

La secuencia de los cebadores, tamaño del fragmento amplificado, temperatura de hibridación y concentración de cebadores para los genes relacionados con el metabolismo de la vitamina E aparecen en la Tabla 3. El número de GenBank y la zona amplificada con los cebadores de los genes estudiados está mostrado en la tabla 4.

Tabla 3. La secuencia de los cebadores de los genes y las condiciones de amplificación para qPCR

GENES	Cebadores Forward y Reverse	Amplicón pb	Condiciones qPCR	
			TH	nM
<i>NPC1L1</i>	F-5'GCCAATAATTTCCATGCTG-3' R-5'GTGGAAGGATGTCTGGAAA-3'	131	60	600 600
<i>ABCA1</i>	F-5'GGTCAGGTGTCTGGCAGT-3' R-5'AGGGTCGACCTGCTATT-3'	94	60	900 900
<i>CYP4F2</i>	F-5'TGCAGAAATGCGTCTTCAGT-3' R-5'GCAGGAAGATCTGCTGGTTC-3'	117	60	200 200
<i>APOE</i>	F-5'GACGCTGTCTGACCAGGTG-3' R-5'TCACCTCCTTCATGGTCTCC-3'	92	60	600 600
<i>SCARB1</i>	F-5'GCAAGACTGTAGGGTTCCAAA-3' R-5'GCTCAGACTTTGGGACTGGT-3'	134	60	600 600
<i>LPL</i>	F-5'AATGAAGAGATGAACGGAACG-3' R-5'5GCACTTCCAACCAGGATGT-3'	119	60	900 900
<i>PPARA</i>	F-5'TGCCAAGATCTGAAAAAGCA-3' R-5'CCTCTGGCCAGAGACTTGA-3'	101	60	600 600
<i>TPPA*</i>	F-5'GCCAATAATTTCCATGCTG-3' R-5'GTGGAAGGATGTCTGGAAA-3'	131	56	900 900
<i>PDKZ1*</i>	F-5'GCCAATAATTTCCATGCTG-3' R-5'GTGGAAGGATGTCTGGAAA-3'	78	60	---
<i>PPARG</i>	F-5'CTTGCCTGTGGGGATGTCTC-3' R-5'GGTCAGCAGACTCTGGTTC-3'	121	60	600 600
<i>SREBF1</i>	F-5'CTGCTATGCAGGCAGCAC-3' R-5'GGTTGATGGGCAGCTTGT-3'	99	60	200 200
<i>CEBPB</i>	F-5'GACAAGCACAGCGACGAGT-3' R-5'GTGCTCGTCTCCAGGTT-3'	102	59	600 600

\*Estos genes no fue posible amplificarlos mediante PCR a tiempo real en muestras de yeyuno.

. (TH: temperatura de hibridación; nM: concentración de cebadores en nano molar; F: cebador forward y R: cebador reverse).

Tabla 4. Número de acceso al Genbank y zona amplificada con los cebadores de los genes de expresión constitutiva.

Genes	Nº acceso GenBank	Zona amplificada
<i>NPC1L1</i>	NW_004080167	exón 19- exón 20
<i>ABCA1</i>	NW_004080165	exón 48- exón 49
<i>CYP4F2</i>	XM_004009199	exón 12-exón 13
<i>APOE</i>	NW_004080177	exón 3- exón 4
<i>SCARB1</i>	NW_004080180	exón 12- exón 13
<i>PDKZ1</i>	NW_004080164	exón 3- exón 4
<i>TTPA</i>	NW_004080167	exón 4- exón 5
<i>LPL</i>	NM_001009394	exón 5- exón 6.
<i>PPARA</i>	AY369138	exón 6
<i>PPARG</i>	AY137204	exón 4 -exón 5
<i>SREBF1</i>	GU206528	exón 6- exón 7
<i>CEBPB</i>	AY371068	exón 1

*SCARB1* (*Scavenger receptor clase B tipo 1*), *CYP4F2* (*polipéptido 2 del citocromo P450 familia 4, subfamilia F*), *ABCA1* (*ATP-binding cassette A1*), *APOE* (*Apolipoproteína E*), *NPC1L1* (*Niemann-Pick C1-like 1*), *LPL* (*Lipoproteína lipasa*), *PPARA* (*peroxisome proliferator-activated receptor alpha*), *PPARG* (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), *CEBPB* (*CCAAT/enhancer binding protein B*), *TTPA* (*Transportador de alpha tocopherol*), *SREBP1* (*Sterol regulatory element-binding protein 1*), y *PDZK1* (*PDZ domain containing 1*).

La identidad de todos los genes, se confirmó previamente a la qPCR mediante secuenciación.

### 3.5.2. Comprobación de la identidad génica mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Previo a la cuantificación mediante PCR a tiempo real, se estudio mediante PCR convencional la expresión tisular diferencial de los genes candidatos analizados en este estudio. De manera que para el caso de yeyuno sólo se cuantificaron los genes que presentaron expresión tisular en el mismo. Estos estudios se realizaron mediante PCR convencional y visualización en geles de agarosa al 2% teñido con SYBRsafe. La visualización de los geles se realizó en un analizador de imágenes BiORAD modelo Gel Doc XR+ equipado con una pantalla de conversión XcitaBlue y con el software ImageLab vs. 4.0. La amplificación se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ l contenido: 5 pmol de cada uno de los cebadores; 200 nM dNTPs; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl; 0.1% Triton X-100, y 0.5 U Taq-polymerasa (Biotoools). Se realizó en el termociclador Biometra T3000, 35 ciclos de

amplificación con un paso de desnaturalización a 94° C durante 30 segundos, de hibridación durante 30 segundos (según la indicada en la tabla 3), y una fase de extensión a 72°C durante 30 segundos. Una vez comprobada la amplificación tisular específica, los productos de amplificación se secuenciaron con el fin de verificar la correcta amplificación de los genes a estudiar. Previamente a la secuenciación de los fragmentos interés fue necesario eliminar el máximo de impurezas presente en el producto PCR, debidas normalmente a la presencia de proteínas, cebadores u otras sales utilizadas. La purificación de los fragmentos se realizó mediante kits comerciales, como el QIAquick® Spin de QUIAGEN. Las muestras fueron preparadas y enviadas al servicio de secuenciación automática del CIB-CSIC de Madrid. Una vez recibidos los cromatogramas, archivos donde se registran los picos de fluorescencia de las bases nucleotídicas, se analizaron las secuencias nucleotídicas con el programa bioinformático Bioedit.

### 3.6. PCR A TIEMPO REAL.

La PCR a tiempo real (RT-qPCR) o PCR cuantitativa (qPCR) es una variación de la técnica PCR estándar que se emplea para la cuantificación tanto de cDNA como de mRNA contenida en una muestra (medida de la expresión génica). Esta técnica tiene varias ventajas como elevada precisión, exactitud en la cuantificación y elevada sensibilidad. La técnica se fundamenta en el uso de fluoróforos que emiten fluorescencia en función del número de copias del fragmento estudiado en la reacción. Durante la amplificación, la rapidez con que la señal fluorescente alcanza el nivel umbral (“threshold level”), se correlaciona con la cantidad inicial de DNA o cDNA inicial, permitiendo de esta manera poder cuantificarla. El número de ciclos necesarios para que la señal alcance el nivel umbral, se conoce como ciclo umbral (“threshold cycle” o Ct) y es el parámetro en el cual se fundamenta la cuantificación.

Para cuantificar la expresión de los genes de interés se ha utilizado el termociclador *Applied BioSystems 7500* y placas de 96 micropocillos para qPCR (Biocentrix Research Grade Labware) selladas con film adhesivo Platemax para qPCR. La cuantificación se realizó utilizando cebadores específicos para cada gen y utilizando el fluoróforo SYBR green (Applied Biosystem). El método utilizado para la cuantificación ha sido el de cuantificación relativa mediante la utilización de modelos mixtos (Steibel et al., 2009). Previamente a la

cuantificación, se estudió la eficiencia de la amplificación mediante la realización de una curva estándar, la cual se construyó utilizando seis diluciones seriadas 1, 1/4, 1/16, 1/64 y 1/1024, 1/4096, a partir de un stock de cDNA, formada por 3  $\mu$ l de cada uno de los cDNAs extraídos de yeyuno. La eficiencia de amplificación de todos los genes se calculó a partir de la fórmula  $E = [10^{(-1/\text{slope})}]$ , siendo “slope” la pendiente obtenida. La optimización de la concentración de los cebadores se realizó mediante la matriz de cebadores. La matriz de cebadores consiste en determinar la concentración mínima de cebadores que da el mínimo Ct y el máximo delta Rn (tabla 3).

Cada muestra fue analizada por triplicado (tres réplicas por muestra) cada una en un volumen final de 10  $\mu$ l, conteniendo 1  $\mu$ l de cDNA, 5  $\mu$ l de mezcla de SYBR Green (Applied Biosystem), la concentración correspondiente de cada pareja de cebadores y un volumen de agua DEPC hasta 10  $\mu$ l. Las condiciones de amplificación fueron: 95° C durante 10 minutos, y posteriormente 50 ciclos a 95° C durante 15 segundos y una temperatura de hibridación y elongación que vienen descritas en las tablas 2 y 3 durante 31 segundos. En cada experimento se incluyó un control negativo indicador de posible contaminación. También se incluyeron dos muestras comunes para cada gen y placa, que nos sirvieron para conectar placas para cada gen y evaluar si había efecto placa en el modelo experimental. Las muestras, controles y blancos se colocaron en diferentes posiciones en la placa para evitar posibles errores sistemáticos. La especificidad de la reacción de la PCR se verificó mediante la curva de disociación, y la temperatura de disociación y el tamaño de producto amplificado para cada gen. Como se ha indicado anteriormente, los resultados de la PCR a tiempo real se normalizaron con un gen de referencia (“housekeeping”).

Finalmente, se estimaron las variaciones de expresión relativa normalizada entre los diferentes grupos en ciclos de amplificación (“Ct”), y se expresaron en n-veces (en inglés fold-change: “FC”) entre dichos grupos.

### 3.7. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS Y ESTADÍSTICOS.

#### 3.7.1. Análisis bioinformáticos.

Se utilizaron programas relacionados con la búsqueda de datos en sistemas integrados y bases de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); diseño de oligonucleótidos (PRIMER3 vs. 4.0: <http://primer3.ut.ee/>); visualización de geles de agarosa (ImageLab vs. 4.0); alineamiento y búsqueda de secuencias (BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>; ClustalW:<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>; BioEdit:<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>); estudios de homologías (BLAST del NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Los análisis Cluster de la expresión de genes se llevaron a cabo con el programa *PermutMatrix* (Caraux and Pinloche 2005). Para organizar en clusters los genes según su expresión se utilizaron los datos normalizados de la expresión de genes (<http://www.lirmm.fr/~caraux/PermutMatrix/>). Finalmente, se utilizó el genoma ovino versión 3.1 (Ovine Genome Assembly v.3.1) que permite varias opciones como buscar regiones genómicas y realizar BLAST contra el propio genoma ovino, entre otras (<http://www.livestockgenomics.csiro.au/perl/gbrowse.cgi/oar3.1/>).

#### 3.7.2. Análisis estadísticos.

##### 3.7.2.1. Contenido de $\alpha$ -tocoferol.

El efecto del sistema de alimentación con  $\alpha$ -tocoferol en el contenido de  $\alpha$ -tocoferol en músculo se estudió utilizando el procedimiento GLM (General Linear Model) del programa SAS versión 9.3. En el modelo se incluyó la alimentación del animal como efecto fijo y el peso al sacrificio (PS) y la edad al sacrificio (ES) como covariables. Los datos del contenido de  $\alpha$ -tocoferol en músculo (*Longissimus dorsi*) de las muestras de los animales contempladas en este trabajo provienen del proyecto INIA RTA2009-00091-C02-01. No se pudo analizar el contenido de  $\alpha$ -tocoferol en yeyuno ya que no se disponía de muestra para la extracción de  $\alpha$ -tocoferol y posterior medición. Sin embargo, el estudio de  $\alpha$ -tocoferol en músculo nos permitió estudiar si los grupos en función de los días eran homogéneos, y existían diferencias de contenido final en los mismos. El contenido final de  $\alpha$ -tocoferol en músculo diversos autores lo relacionan con el contenido en suero, que depende de la absorción de esta vitamina en intestino.

### 3.7.2.2. Expresión génica.

Como las eficiencias de los genes fueron menores de 2, los valores  $C_T$  se transformaron usando la ecuación propuesta por Steibel et al. (2009) para reescalar y poder comparar los  $C_T$ :  $y = \log_2 (E^{-C_T})$ .

El método utilizado para la cuantificación de la expresión se ha basado en el análisis de los valores  $C_T$  de los genes candidatos (GC) y de referencia (GR) mediante la utilización de modelos mixtos (Steibel et al. 2009). Los análisis estadísticos de expresión se realizaron con el procedimiento MIXED del programa SAS versión 9.3. :

$$y_{gikm} = T_i + G_g + P_k + TG_{gi} + b(PS_m) + b(ES_m) + S_{im} + A_m + e_{gikm}$$

donde  $y_{gim}$  es el valor de  $C_T$  (valor transformado) obtenido por software del termociclador para cada gen (genes candidatos y de referencia), correspondiendo al animal  $m^{\text{th}}$  bajo el tratamiento  $i^{\text{th}}$  (C, VE10d, VE20d, VE30d, y A) en la placa  $k^{\text{th}}$ .  $T_i$  es el efecto fijo del tratamiento  $i^{\text{th}}$ ;  $G_g$  es el efecto fijo del gen  $g^{\text{th}}$  gene;  $P_k$  es el efecto fijo de la placa  $k^{\text{th}}$ ;  $TG_{gi}$  es el efecto fijo del tratamiento  $i^{\text{th}}$  en la expresión del gen  $g$ ;  $PS_m$  y  $ES_m$  son los efectos, incluidos como covariables, del peso al sacrificio y edad al sacrificio del animal  $m^{\text{th}}$ ;  $S_{im}$  es el efecto aleatorio de la muestra biológica  $S_{im} \sim N(0, \sigma_s^2)$ ;  $A_m$  es el efecto aleatorio del animal del cual las muestras fueron tomadas ( $A_m \sim N(0, \sigma_A^2)$ ); y  $e_{gim}$  es el efecto aleatorio del residuo. Se consideró una varianza residual heterogénea ligada al efecto del gen ( $e_{ojkmnr} \sim N(0, \sigma_{e_{ij}}^2)$ ).

Para estimar las diferencias de expresión por pares de tratamientos y gen (TG) de las estimas de los valores TG y obtener el FC se siguió la metodología descrita por Steibel et al. (2009):

$$\text{dif}_{GC} = (TG_{GCg1} - TG_{GRg1}) - (TG_{GCg2} - TG_{GRg1.2})$$

donde  $\text{dif}_{GC}$  es la estima en  $C_T$  de las diferencias de expresión por pares de tratamientos y gen (TG);  $TG_{GCg1}$  es la estima en  $C_T$  del tratamiento 1 en la expresión del gen candidato  $g1$ ;  $TG_{GRg1}$  es la estima en  $C_T$  del tratamiento 1 en la expresión del gen de referencia  $g1$ ;  $TG_{GCg2}$  es la estima en  $C_T$  del tratamiento 2 en la expresión del gen candidato  $g2$ ;  $TG_{GRg2}$  es la estima en  $C_T$

del tratamiento 2 en la expresión del gen de referencia g2. La significación de las diferencias de las estimas de los valores TG se calculó mediante el estadístico t de student.

Finalmente, se calcularon los intervalos de de confianza al 95% para cada valor de FC usando el error estándar de  $\text{dif}_{\text{GC}}$ :

$$\text{FC}_{\text{UP}} = 2^{-(\text{diffGC} - 1.96 \times \text{ES})}, \text{FC}_{\text{LOW}} = 2^{-(\text{diffGC} + 1.96 \times \text{ES})}$$

El FC se expresó en escala logarítmica.

Para la elección del gen control de expresión constitutiva se utilizó la metodología de modelos mixtos (Serrano *et al.* 2011). La estabilidad de la expresión se estableció en términos de sesgo y varianza calculando el Error Cuadrático medio ( $\text{ECM} = (\text{sesgo})^2 + \text{varianza}$ ). El modelo utilizado fue el mismo que el descrito para la cuantificación de la expresión pero tomando la interacción *TG* como efecto aleatorio en vez de efecto fijo.



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 4.1. CONTENIDO DE $\alpha$ -TOCOFEROL EN MÚSCULO.

Los datos del contenido de  $\alpha$ -tocoferol en músculo (*Longissimus dorsi*) de las muestras de los animales contempladas en este trabajo provienen del proyecto INIA RTA2009-00091-C02-01, y los resultados están reflejados en el trabajo de Ripoll et al. (2013), en el cual existían diferencias significativas de contenido de  $\alpha$ -tocoferol entre los diferentes grupos, con excepción del grupo A y VE10d, que presentaron contenido similar. Sin embargo, en ese trabajo se analizaron 64 muestras de músculo, y en este se han analizado 58 muestras, ya que de 6 muestras no se obtuvo muestra para extraer el RNA y realizar los estudios de cuantificación de la expresión. Por este motivo, se reanalizaron los datos de contenido de  $\alpha$ -tocoferol en músculo con los 58 animales contemplados en este estudio, encontrando resultados similares a los descritos por Ripoll et al. (2013). Es decir, se encontraron diferencias significativas en el contenido de  $\alpha$ -tocoferol entre los diferentes grupos, con excepción del grupo A y VE10d (Tabla 5). El peso al sacrificio y edad al sacrificio no fueron significativos en el modelo, mientras que el contenido de  $\alpha$ -tocoferol resultó significativo ( $P<0.0001$ ).

Tabla 5. Contenido de  $\alpha$ -tocoferol en el músculo *Longissimus thoracis* en mg /kg de músculo.  
Diferentes superíndices indican  $P<0.05$ .

	T	A	VE10D	VE20D	VE30D
$\alpha$ -tocoferol	0.183 $\pm$ 0.120 <sup>a</sup>	0.646 $\pm$ 0.164 <sup>b</sup>	0.890 $\pm$ 0.124 <sup>b</sup>	1.531 $\pm$ 0.117 <sup>c</sup>	2.058 $\pm$ 0.162 <sup>d</sup>

No se pudo analizar el contenido de  $\alpha$ -tocoferol en yeyuno ya que no se disponía de muestra. Sin embargo, diversos autores han mostrado que la acumulación de  $\alpha$ -tocoferol es mayor en tejido adiposo que en músculo esquelético (Lee, Waller, Melton, & Saxton, 2006; Liu, Lanari, & Schaefer, 1995), dependiendo de la dosis y el tiempo de suplementación (Alvarez et al., 2008; Lee et al., 2006). Estos mismos autores, relacionan el contenido final de  $\alpha$ -tocoferol en músculo con el contenido en suero, que depende de su correcta absorción en intestino, mediada en gran medida por algunos de los transportadores estudiados en este trabajo. Nuestros resultados confirmaron que los grupos establecidos en función de los días

de consumo de vitamina E eran homogéneos, y existían diferencias de contenido final de  $\alpha$ -tocoferol entre tratamientos.

#### 4.2. COMPROBACIÓN DE LA IDENTIDAD GÉNICA Y DE LA EXPRESIÓN TISULAR ESPECÍFICA.

Previo a la cuantificación mediante RT-qPCR, se estudió la expresión tisular de los genes analizados mediante PCR convencional. En la tabla 6 se pueden observar los resultados de la amplificación. En total, se analizaron 15 muestras por tejido (n= 90). Tras la PCR convencional se comprobó, mediante secuenciación de 5 animales por tejido, la identidad del fragmento amplificado. En todos los casos este presentó una identidad del 100 % con el gen correspondiente en relación al genoma ovino (el nº de acceso al GenBank para cada gen estudiado aparece en la información específica para cada gen del apartado 2.4)

Tabla 6. Expresión tisular de los genes candidatos analizados en este estudio.

Gen	Tejido					
	<i>M. Longissimus dorsi</i>	Duodeno	Yeyuno	Íleon	Hígado	Grasa subcutánea
<i>SCARB1</i>	X	X	X	X	X	X
<i>CYP4F2</i>	---	X	X	X	X	---
<i>ABCA1</i>	X	X	X	X	X	X
<i>APOE</i>	X	X	X	X	X	X
<i>NPC1L1</i>	---	---	X	X	X	---
<i>LPL</i>	X	X	X	X	X	X
<i>PPARA</i>	X	X	X	X	X	X
<i>PPARG</i>	X	X	X	X	X	X
<i>CEBPB</i>	X	X	X	X	X	X
<i>TTPA</i>	X	---	X <sup>1</sup>	---	X	X
<i>SREBP1</i>	X	X	X	X	X	X
<i>PDKZ1</i>	---	---	---	---	X	---

*SCARB1* (*Scavenger receptor clase B tipo 1*), *CYP4F2* (*polipéptido 2 del citocromo P450 familia 4, subfamilia F*), *ABCA1* (*ATP-binding cassette A1*), *APOE* (*Apolipoproteína E*), *NPC1L1* (*Niemann-Pick C1-like1*), *LPL* (*Lipoproteína lipasa*), *PPARA* (*peroxisome proliferator-activated receptor alpha*), *PPARG* (*peroxisome proliferator-activated receptor gamma*), *CEBPB* (*CCAAT/enhancer binding protein B*), *TTPA* (*Transportador de alpha tocopherol*), *SREBP1* (*Sterol regulatory element-binding protein 1*), y *PDKZ1* (*PDZ domain containing 1*).

<sup>1</sup>Este gen no amplificó en todas las muestras.

#### 4.3. ELECCIÓN DE LOS MEJORES GENES DE REFERENCIA PARA NORMALIZAR LOS RESULTADOS.

El uso de modelos matemáticos adecuados para estimar la estabilidad de la expresión de los genes bajo diferentes condiciones es un punto crítico. GeNorm (Vandesompele et al., 2002) y Normfinder (Andersen et al., 2004) son dos de los programas más utilizados para determinar GRs. El primero considera que todas las muestras proceden de un solo grupo y, por tanto, la estima de la estabilidad de la expresión se basa exclusivamente en las varianzas de la expresión entre los genes. El Normfinder permite estimar las varianzas de expresión de los genes entre y dentro de grupos y calcula la estabilidad combinando ambas fuentes de información. Sin embargo, NormFinder estima la varianza entre grupos por las diferencias en los niveles de expresión de éstos, asumiendo que el promedio de expresión de los genes es independiente del grupo y que el promedio de las variaciones entre grupos es cero. Esta última suposición requiere que se seleccionen los genes candidatos de un grupo del que a priori no se esperen diferencias de expresión entre grupos, lo cual es una incógnita en los casos donde se estudia la expresión de genes bajo nuevas circunstancias. Estas restricciones no son realistas y restan flexibilidad al modelo en el que la interacción entre genes y el ambiente se suponen parte de los mecanismos de regulación de la expresión génica. Recientemente, Serrano et al. (2011) usan la metodología de modelos mixtos para elegir los GRs más estables y normalizar los resultados de la PCR tiempo real. Esta metodología permite una selección más precisa de los GRs, y es la metodología que nosotros hemos utilizado. Por otra parte, a la hora de elegir los GRs es importante testar la estabilidad tanto de los GRs como los genes candidatos (GCs) como describe Salces-Ortiz et al. (2013). De esta manera evitaremos elegir GRs menos estables que los GCs para normalizar los resultados. La normalización de nuestros GCs por GRs menos estables podría producir un error en la estima de la expresión génica de los diferentes tratamientos. En la tabla 7 se muestra la estabilidad de todos los genes analizados en términos de error cuadrático medio (ECM).

Tabla 7. Error cuadrático medio (ECM) de todos los genes estudiados.

Gen	ECM
<i>APOE</i>	2.6373
<b><i>RPL19</i></b>	<b>2.7228</b>
<i>RPL37</i>	3.0190
<i>SREPB1</i>	3.5903
<i>CEBPB</i>	3.7788
<i>ABCA1</i>	3.7792
<i>PPARA</i>	3.9020
<i>PPARG</i>	4.6395
<i>B2M</i>	4.8228
<i>LPL</i>	4.8468
<i>CYP4F2</i>	5.6206
<i>SCARB1</i>	5.6833
<i>NPC1L1</i>	6.0600

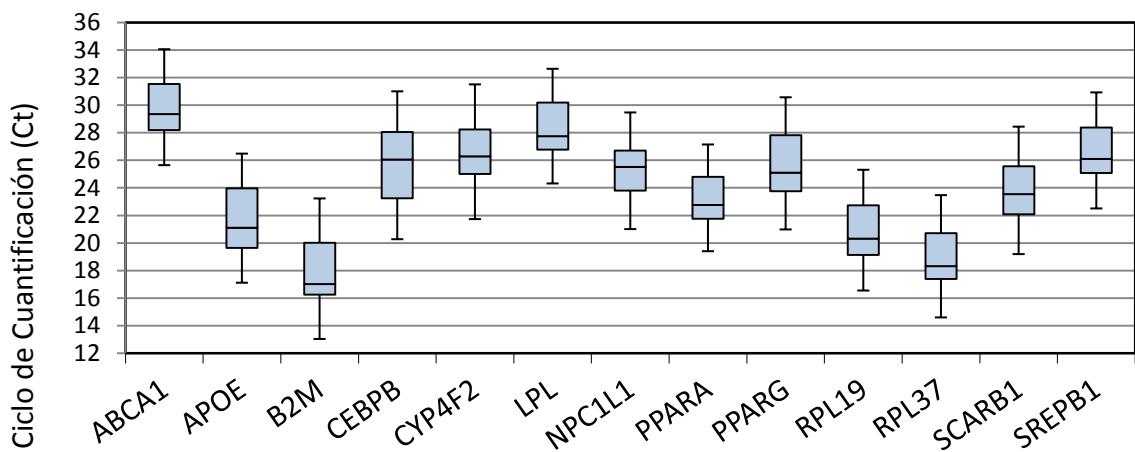
El gen más estable bajo los distintos tratamientos analizados en este estudio fue el gen candidato *APOE* (2.6373), seguido de un GR, *RPL19* (2.7228). Se decidió normalizar los resultados de expresión de todos los genes con el gen *RPL19*, el cuál era menos estable que *APOE*. Ninguno de los tres GR testados fue más estable que *APOE*, por lo que la normalización de *APOE* se realizó con *RPL19*, un gen menos estable, y asumiendo que podíamos estar cometiendo un error en la estima de la expresión génica.

#### 4.4. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN DE $\alpha$ -TOCOFEROL EN LA EXPRESIÓN DE GENES RELACIONADOS CON EL METABOLISMO DE LA VITAMINA E MEDIANTE RT-QPCR.

Los genes *SCARB1*, *ABCA1*, *LPL*, *APOE*, *NPC1L1*, *CYP4F2*, *PPARG*, *PPARA*, *SREBP1*, y *CEBPB* amplificaron en todas las muestras de yeyuno, mientras que *TTPA* amplificó en 25 muestras y no se consideró para los estudios de expresión. *PDKZ1* sólo amplificó en hígado. Estos dos genes no se cuantificaron mediante PCR a tiempo real en yeyuno.

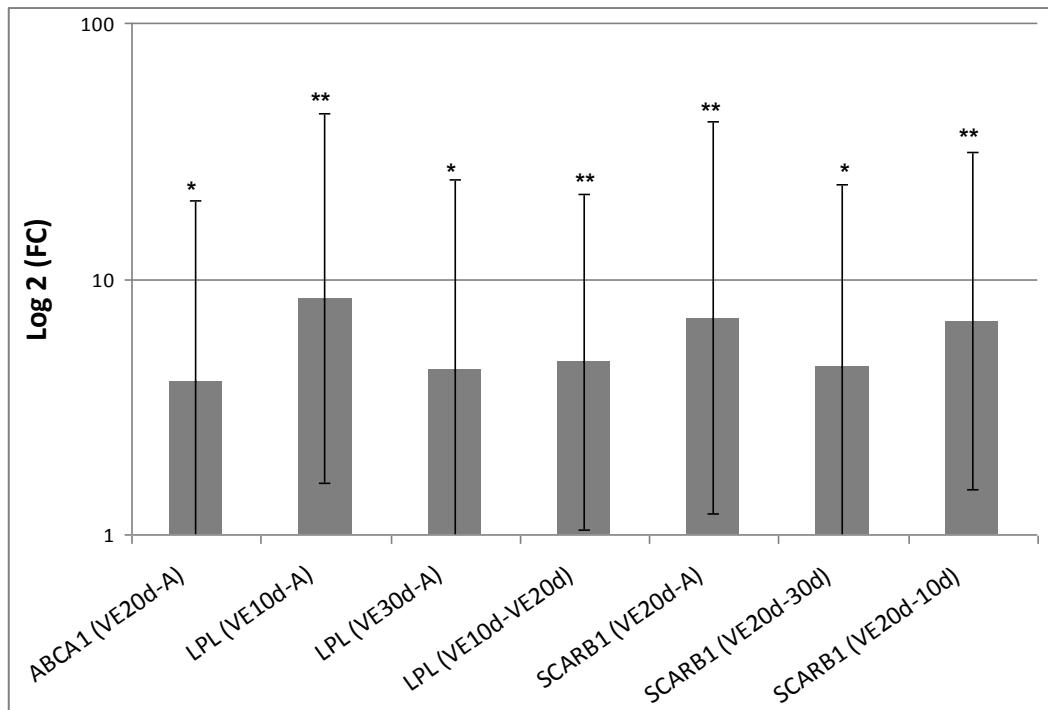
En la Figura 1, se pueden ver la distribución de los valores de Ct sin corregir por los diferentes efectos del modelo, es decir sin normalizar.

Figura 1. Distribución de los valores Ct para los GRs y genes candidatos. Las cajas muestran el rango de valores Ct para cada gen, la línea central la mediana, y las barras la desviación estándar de la media.



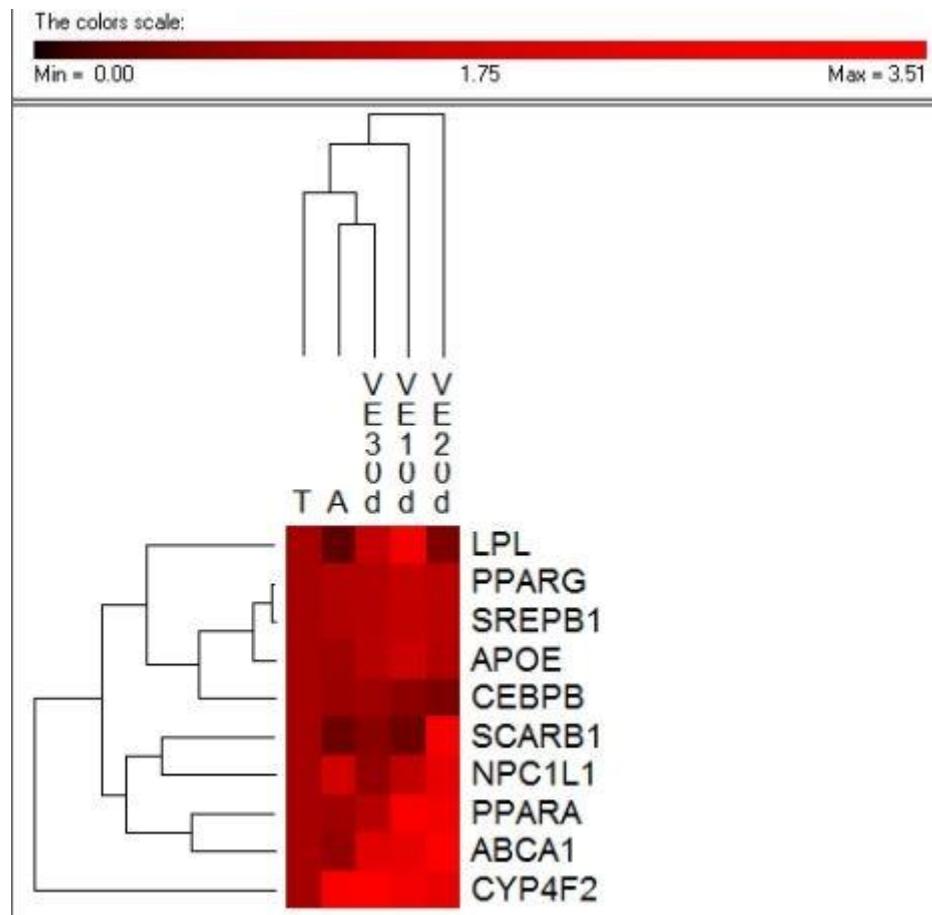
En la Figura se observa que *B2M* es el gen que más se expresa, ya que tiene el Ct más bajo (Ct= 17.02892), mientras que *ABCA1* presenta los niveles de expresión más bajos (Ct= 29.35077363). Finalmente el gen *CEBPB* es el que presenta la variabilidad más elevada pudiendo indicar *a priori* un mayor efecto de los tratamientos en la expresión del gen. El modelo descrito en el apartado 3.7.2. fue el que mejor BIC (criterio de información bayesiana) mostró. Los efectos fijos tratamiento ( $P<0.0001$ ), gen ( $P<0.0001$ ), peso al sacrificio ( $P<0.0001$ ), y edad al sacrificio ( $P=0.0228$ ) resultaron significativos, mientras que el efecto placa ( $P=0.1793$ ) y tratamiento x gen ( $P=0.3925$ ) no lo fueron. Esto muestra que utilizar diferentes placas para analizar todas las muestras de cada gen no tuvo influencia en la expresión de los mismos. Se encontraron diferencias significativas en la expresión de los genes *LPL* y *SCARB1*, así como tendencias en estos genes y *ABCA1* entre diferentes tratamientos (Figura 2). Hay que destacar que en todos los casos el intervalo de confianza fue muy grande.

Figura 2. Log2 del “fold change” (FC) para los contrastes para grupos alternativos con el sistema de alimentación por gen. Sólo se indican contrastes significativos. \*\*P<0.05, \*P<0.1. Las barras indican el intervalo de confianza al 95% (FCup-FClow).



El análisis cluster (Figura 3) mostró varios clusters principales de acuerdo con el sistema de alimentación. El primer cluster incluyó el tratamiento 4 (VE20d) que mostró una mayor expresión de los genes que el resto de tratamientos.

Figura 3. Resultados de análisis Cluster agrupados según de la expresión de genes, el tipo de alimentación en yeyuno.



El gen *LPL* mostró una expresión relativa de 8.39 y 4.72-veces más alta en el tratamiento VE10d que en los tratamientos A ( $P<0.05$ ) y VE20d ( $P<0.05$ ), respectivamente. Además, una tendencia fue también observada en el contraste entre, VE30d y A ( $P=0.096$ ), donde la expresión del grupo de VE30d fue 4.38-veces más alta que el grupo A (Tabla 8). El gen ABCA1 también muestra una tendencia en el contraste VE20d y A ( $P=0.0985$ ), donde la expresión de VE20d fue 3.99-veces mayor que en el grupo A. Finalmente, el gen *SCARB1*, presentó una aumento en su expresión de 7.03 y 6.82- veces en los animales

correspondientes al sistema VE20d con respecto a los del sistema A ( $P<0.05$ ).y VE10d ( $P<0.05$ ), respectivamente. Igualmente, SCARB1 mostró una expresión relativa de 4.53-veces más alta en el tratamiento VE20d que en el tratamiento VE30d ( $P= 0.074$ ). Con respecto al resto de genes y sistemas analizados no se observaron diferencias significativas en cuanto a su expresión diferencial.

La vitamina E ingerida por la dieta es captada por las células intestinales y secretada en los quilomicrones que son catabolizados por la LPL, siendo músculo y tejidos grasos los sitios de mayor expresión de *LPL*. Goti et al. (2002) mostraron que el contenido de  $\alpha$ -tocoferol en el cerebro de ratones knockout *LPL* fue inferior que en ratones control, sugiriendo el transporte de  $\alpha$ -tocoferol asociado a lipoproteínas y quilomicrones por parte de *LPL*. En este trabajo, la adición de  $\alpha$ -tocoferol en los grupos de animales alimentados con concentrado con VE produce una sobreexpresión de *LPL* en los primeros días de consumo de pienso (VE10D). Aunque los resultados no son significativos se observa que la expresión de VE10D es 2.80 y 1.92 veces mayor que los grupos T y VE30d, respectivamente. Este efecto, fue encontrado para los genes *ABCA1*, *LPL*, y *SCARB1* en músculo y grasa subcutánea para el mismo modelo animal utilizado en este trabajo en yeyuno (González-Calvo et al., 2013), y podría explicarse como una regulación por un mecanismo de retroalimentación (“feedback”) negativo del  $\alpha$ -tocoferol sobre la expresión de este gen. Kawahara et al. (2008) y Lobo et al. (2010) describieron un efecto de retroalimentación negativa de la vitamina D sobre la expresión del gen *PTH*, y de la vitamina A sobre los genes *BCMO1* y *SCARB1*. Además, las rutas metabólicas encargadas de la síntesis y captación de una gran variedad de moléculas esenciales y cofactores de vitaminas en bacterias están regulados mediante retroalimentación negativa (Lai, 2003). Finalmente, *SCARB1* ha sido relacionado con la captación a nivel intestinal de  $\alpha$ -tocoferol, y Major et al. (2011) encontraron una asociación significativa entre un SNP del gen *SCARB1* (rs11057830) y los niveles plasmáticos de  $\alpha$ -tocoferol en humanos. En nuestro estudio se observa un efecto similar al encontrado para *LPL* pero con una expresión mayor en los animales del tratamiento VE20d, para posteriormente volver a disminuir la expresión en los animales del tratamiento VE30D.

En nuestro estudio, es destacable la menor expresión de los genes en los animales alimentados con alfalfa (Figura 3), siendo las diferencias significativas entre tratamientos para los genes *LPL* (VE10d-A) y *SCARB1* (VE20d-A), y encontrando tendencias para *LPL* (VE30d-A) y *ABCA1* (VE20d-A) (Figura 3). Mengual et al. (2011) en un trabajo en el que estudiaban el efecto de la adición de  $\beta$ -carotenos sobre el transcriptoma de ratones salvajes (“wild type”) y ratones knockout para *BCMO1* describieron un efecto de disminución de la expresión de un 87% de los genes en el grupo en ratones salvajes que se les había adicionado  $\beta$  -carotenos con respecto a los que no. Además, este mismo efecto fue encontrado en el gen *LPL* por estos mismos autores, siendo esto consistente con lo encontrado en nuestro trabajo. En nuestro estudio, la menor expresión de los diferentes genes fue encontrada en el tratamiento 1, grupo A, que continuamente pastaban alfalfa que es rica en carotenos y vitamina E, sugiriendo un posible efecto de inhibición de la expresión en los animales alimentados con alfalfa mediado por los carotenos.

Los resultados de esta Tesis máster demuestran que el  $\alpha$ -tocoferol no es solo un antioxidante, sino que actúa también como regulador de la expresión génica , ya sea bien a través de factores nucleares y de transcripción (Eggermont, 2006) o mediante la activación directa de los genes. En este proyecto se ha realizado una primera aproximación a la detección de genes diferencialmente expresados en yeyuno de ovino asociados a la inclusión de diferentes niveles de vitamina E en la dieta mediante la metodología de gen candidato.

Tabla 8. Diferencias entre los contrastes con grupos alternativos para los diferentes tratamientos por gen. El estimador de la diferencia se indica en Ct. Se indica también el “fold change” (FC) y el intervalo de confianza al 95 % del FC (FC<sub>up</sub>-FC<sub>low</sub>).

Gen	Contraste	Estimador	ES	t	Pr >  t	FC	FCup	FClow
<b>ABCA1</b>	ABCA1 A-T	0.3058	1.1897	0.26	0.7977	0.81	4.07	0.16
	ABCA1 A-VE10d	1.4905	1.1582	1.29	0.2011	0.36	1.72	0.07
	<b>ABCA1 A-VE20d</b>	1.9976	1.1982	1.67	<b>0.0985</b>	0.25	1.28	0.05
	ABCA1 A-VE30d	1.378	1.2108	1.14	0.2578	0.38	1.99	0.07
	ABCA1 VE10d-T	-1.1847	1.0304	-1.15	0.2529	2.27	9.22	0.56
	ABCA1 VE10d-VE20d	0.5071	1.0366	0.49	0.6257	0.70	2.88	0.17
	ABCA1 VE10d-VE30d	-0.1124	1.0553	-0.11	0.9154	1.08	4.53	0.26
	ABCA1 VE20d-30d	-0.6195	1.0975	-0.56	0.5736	1.54	6.82	0.35
	ABCA1 VE20d-T	-1.6918	1.0744	-1.57	0.1184	3.23	13.91	0.75
	ABCA1 VE30d-T	-1.0723	1.0889	-0.98	0.3271	2.10	9.23	0.48
<b>APOE</b>	APOE A-T	0.1578	1.0855	0.15	0.8847	0.90	3.92	0.21
	APOE A-VE10d	0.8127	1.0587	0.77	0.4444	0.57	2.40	0.14
	APOE A-VE20d	0.3943	1.0989	0.36	0.7205	0.76	3.39	0.17
	APOE A-VE30d	0.4799	1.1163	0.43	0.6682	0.72	3.27	0.16
	APOE VE10d-T	-0.6549	0.9379	-0.7	0.4866	1.57	5.63	0.44
	APOE VE10d-VE20d	-0.4184	0.9464	-0.44	0.6593	1.34	4.83	0.37
	APOE VE10d-VE30d	-0.3328	0.9741	-0.34	0.7333	1.26	4.73	0.34
	APOE VE20d-30d	0.08567	1.0141	0.08	0.9328	0.94	3.74	0.24
	APOE VE20d-T	-0.2365	0.9807	-0.24	0.8099	1.18	4.47	0.31
	APOE VE30d-T	-0.3221	1.0026	-0.32	0.7486	1.25	4.88	0.32
<b>CEPB</b>	CEPB A-T	0.2113	1.1917	0.18	0.8596	0.86	4.36	0.17
	CEPB A-VE10d	-0.3142	1.161	-0.27	0.7872	1.24	6.02	0.26
	CEPB A-VE20d	-0.6454	1.2008	-0.54	0.5921	1.56	7.99	0.31
	CEPB A-VE30d	0.07312	1.2275	0.06	0.9526	0.95	5.04	0.18
	CEPB VE10d-T	0.5255	1.0281	0.51	0.6104	0.69	2.81	0.17
	CEPB VE10d-VE20d	-0.3311	1.0348	-0.32	0.7496	1.26	5.13	0.31
	CEPB VE10d-VE30d	0.3874	1.0693	0.36	0.7179	0.76	3.27	0.18
	CEPB VE20d-30d	0.7185	1.1126	0.65	0.5199	0.61	2.76	0.13
	CEPB VE20d-T	0.8566	1.0731	0.8	0.4266	0.55	2.37	0.13
	CEPB VE30d-T	0.1382	1.1028	0.13	0.9006	0.91	4.07	0.20
<b>CYP4F2</b>	CYP4F2 A-T	-1.6011	1.3515	-1.18	0.2393	3.03	19.03	0.48
	CYP4F2 A-VE10d	-0.2052	1.3281	-0.15	0.8775	1.15	7.00	0.19
	CYP4F2 A-VE20d	-0.3837	1.3564	-0.28	0.7779	1.30	8.24	0.21
	CYP4F2 A-VE30d	0.2159	1.3925	0.16	0.8772	0.86	5.71	0.13
	CYP4F2 VE10d-T	-1.3958	1.1796	-1.18	0.2398	2.63	13.07	0.53
	CYP4F2 VE10d-VE20d	-0.1785	1.1819	-0.15	0.8803	1.13	5.64	0.23
	CYP4F2 VE10d-VE30d	0.4211	1.2284	0.34	0.7326	0.75	3.96	0.14
	CYP4F2 VE20d-30d	0.5996	1.2597	0.48	0.6353	0.66	3.65	0.12
	CYP4F2 VE20d-T	-1.2173	1.2118	-1	0.3178	2.33	12.06	0.45
	CYP4F2 VE30d-T	-1.8169	1.2549	-1.45	0.1512	3.52	19.38	0.64
<b>LPL</b>	LPL A-T	1.5869	1.2453	1.27	0.2058	0.33	1.81	0.06
	<b>LPL A-VE10d</b>	3.0699	1.2214	2.51	<b>0.0137</b>	0.12	0.63	0.02
	LPL A-VE20d	0.8247	1.2554	0.66	0.5128	0.56	3.11	0.10
	<b>LPL A-VE30d</b>	2.1321	1.27	1.68	<b>0.0966</b>	0.23	1.28	0.04
	LPL VE10d-T	-1.483	1.1034	-1.34	0.1823	2.80	12.52	0.62

	LPL VE10d-VE20d	-2.2453	1.1099	-2.02	<b>0.046</b>	4.74	21.42	1.05
	LPL VE10d-VE30d	-0.9379	1.1316	-0.83	0.4094	1.92	8.91	0.41
	LPL VE20d-30d	<b>1.3074</b>	1.1658	1.12	0.265	0.40	1.97	0.08
	LPL VE20d-T	0.7623	1.1392	0.67	0.5051	0.59	2.77	0.13
	LPL VE30d-T	-0.5452	1.1569	-0.47	0.6386	1.46	7.03	0.30
<b>NPC1L1</b>	NPC1L1 A-T	-0.7651	1.3775	-0.56	0.58	1.70	11.04	0.26
	NPC1L1 A-VE10d	-0.286	1.3535	-0.21	0.8331	1.22	7.67	0.19
	NPC1L1 A-VE20d	0.4638	1.388	0.33	0.739	0.73	4.78	0.11
	NPC1L1 A-VE30d	-1.1209	1.4023	-0.8	0.4262	2.17	14.62	0.32
	NPC1L1 VE10d-T	-0.4791	1.2035	-0.4	0.6915	1.39	7.15	0.27
	NPC1L1 VE10d-VE20d	0.7498	1.2105	0.62	0.5372	0.59	3.08	0.11
	NPC1L1 VE10d-VE30d	-0.8349	1.2325	-0.68	0.4999	1.78	9.52	0.33
	NPC1L1 VE20d-30d	-1.5848	1.2674	-1.25	0.2143	3.00	16.78	0.54
	NPC1L1 VE20d-T	-1.229	1.2402	-0.99	0.3243	2.34	12.64	0.43
	NPC1L1 VE30d-T	0.3558	1.2581	0.28	0.778	0.78	4.32	0.14
<b>PPARA</b>	PPARA A-T	0.1188	1.2019	0.1	0.9215	0.92	4.71	0.18
	PPARA A-VE10d	1.7012	1.1692	1.46	0.1488	0.31	1.51	0.06
	PPARA A-VE20d	1.5539	1.2142	1.28	0.2035	0.34	1.77	0.07
	PPARA A-VE30d	0.4172	1.2376	0.34	0.7368	0.75	4.02	0.14
	PPARA VE10d-T	-1.5824	1.038	-1.52	0.1305	2.99	12.27	0.73
	PPARA VE10d-VE20d	-0.1473	1.0457	-0.14	0.8882	1.11	4.58	0.27
	PPARA VE10d-VE30d	-1.284	1.0789	-1.19	0.2368	2.44	10.55	0.56
	PPARA VE20d-30d	-1.1367	1.1244	-1.01	0.3144	2.20	10.13	0.48
	PPARA VE20d-T	-1.4351	1.0855	-1.32	0.1891	2.70	11.82	0.62
	PPARA VE30d-T	-0.2984	1.1136	-0.27	0.7893	1.23	5.58	0.27
<b>PPARG</b>	PPARG A-T	-0.22	1.2755	-0.17	0.8634	1.16	6.59	0.21
	PPARG A-VE10d	0.3176	1.2409	0.26	0.7985	0.80	4.33	0.15
	PPARG A-VE20d	0.169	1.2757	0.13	0.8949	0.89	5.03	0.16
	PPARG A-VE30d	0.03826	1.2982	0.03	0.9766	0.97	5.68	0.17
	PPARG VE10d-T	-0.5377	1.1006	-0.49	0.6263	1.45	6.47	0.33
	PPARG VE10d-VE20d	-0.1486	1.1006	-0.14	0.8929	1.11	4.94	0.25
	PPARG VE10d-VE30d	-0.2794	1.1262	-0.25	0.8046	1.21	5.61	0.26
	PPARG VE20d-30d	-0.1308	1.1647	-0.11	0.9108	1.09	5.33	0.22
	PPARG VE20d-T	-0.389	1.1397	-0.34	0.7336	1.31	6.16	0.28
	PPARG VE30d-T	-0.2583	1.1648	-0.22	0.825	1.20	5.82	0.25
<b>SCARB1</b>	SCARB1 A-T	1.231	1.2901	0.95	0.3424	0.43	2.46	0.07
	SCARB1 A-VE10d	0.04484	1.2555	0.04	0.9716	0.97	5.34	0.18
	SCARB1 A-VE20d	2.8148	1.2989	2.17	<b>0.0327</b>	0.14	0.83	0.02
	SCARB1 A-VE30d	0.6352	1.3312	0.48	0.6343	0.64	3.93	0.11
	SCARB1 VE10d-T	1.1862	1.1143	1.06	0.2898	0.44	2.00	0.10
	SCARB1 VE10d-VE20d	2.7699	1.1188	2.48	<b>0.015</b>	0.15	0.67	0.03
	SCARB1 VE10d-VE30d	0.5904	1.1614	0.51	0.6124	0.66	3.22	0.14
	SCARB1 VE20d-30d	-2.1795	1.2081	-1.8	<b>0.0744</b>	4.53	23.38	0.88
	SCARB1 VE20d-T	-1.5838	1.163	-1.36	0.1764	3.00	14.55	0.62
	SCARB1 VE30d-T	0.5958	1.1988	0.5	0.6204	0.66	3.37	0.13
<b>SREPB</b>	SREPB A-T	-0.1896	1.1767	-0.16	0.8723	1.14	5.64	0.23
	SREPB A-VE10d	0.2891	1.146	0.25	0.8014	0.82	3.88	0.17
	SREPB A-VE20d	0.1765	1.1854	0.15	0.8819	0.88	4.43	0.18
	SREPB A-VE30d	0.07152	1.2112	0.06	0.953	0.95	4.93	0.18
	SREPB VE10d-T	-0.4787	1.0174	-0.47	0.639	1.39	5.55	0.35
	SREPB VE10d-VE20d	-0.1126	1.0248	-0.11	0.9128	1.08	4.35	0.27
	SREPB VE10d-VE30d	-0.2175	1.0578	-0.21	0.8375	1.16	4.89	0.28
	SREPB VE20d-30d	-0.105	1.0988	-0.1	0.9241	1.08	4.79	0.24
	SREPB VE20d-T	-0.3661	1.0609	-0.35	0.7307	1.29	5.45	0.30
	SREPB VE30d-T	-0.2611	1.0901	-0.24	0.8112	1.20	5.27	0.27



## 5. CONCLUSIONES.

Las conclusiones del presente trabajo son los siguientes:

1. La estabilidad de los genes de expresión constitutiva es específica para cada modelo experimental y tipo de tejido, siendo un factor crucial en la cuantificación de expresión de genes de interés por lo que se recomienda testar varios genes de expresión constitutiva junto con los genes de interés con la finalidad de elegir los genes más estables posibles.
2. La expresión de *LPL*, y *SCARB1*, podrían estar regulados mediante un mecanismo de retroalimentación (“feedback”) negativa del  $\alpha$ -tocoferol sobre la expresión de estos genes. Dichos genes se muestran sobreexpresados en el tratamiento VE10D y VE20D para *LPL*, y *SCARB1*, respectivamente, disminuyendo la expresión en el tratamiento VE30D, mostrando una regulación de la expresión génica mediada por  $\alpha$ -tocoferol a corto plazo, que produce un incremento de la expresión de estos genes a los pocos días de ingesta, seguido de una disminución de la expresión al incrementar los días de consumo de pienso enriquecido con vitamina E (VE20D y VE30D).
3. En nuestro estudio, la menor expresión génica fue encontrada en el tratamiento A que continuamente pastaban alfalfa que es rica en carotenos y vitamina E, sugiriendo un posible efecto de inhibición de la expresión en los animales alimentados con alfalfa, que podría estar mediado por los carotenos.



## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Álvarez, I., De la Fuente, J., Díaz, M. T., Lauzurica, S., Pérez, C., & Caneque, V. 2008. Estimation of alpha-tocopherol concentration necessary to optimise lamb meat quality stability during storage in high-oxygen modified atmosphere using broken-line regression analysis. *Animal*, 2(9), 1405-1411.
- Andrade PVD, Schmidely P. Effect of duodenal infusion of trans10, cis12-CLA on milk performance and milk fatty acid profile in dairy goats fed high or low concentrate diet in combination with rolled canola seed. *Reprod. Nutr. Dev.* 2006. 46: 31-48.
- Borel, P., M. Moussa, E. Reboul, B. Lyan, C. Defoort *et al.*, 2007. Human plasma levels of vitamin E and carotenoids are associated with genetic polymorphisms in genes involved in lipid metabolism. *J of Nutr.* 137: 2653-2659.
- Campo, M.M., Olleta, J.L., Sañudo, C. 2008. Características de la carne de cordero con especial atención al Ternasco de Aragón. Agencia aragonesa de seguridad alimentaria. [http://www.aragon.es/estaticos/ImportFiles/12/docs/Areas/Seguridad\\_Agroalimentaria/Agencia\\_Aragonesa\\_Seguridad\\_Alimentaria/Dictamenes\\_informes/AASA/Caracteristicas/DOCUMENTO\\_ORIGINAL\\_CARACTERISTICAS\\_CARNE\\_CORDERO.pdf](http://www.aragon.es/estaticos/ImportFiles/12/docs/Areas/Seguridad_Agroalimentaria/Agencia_Aragonesa_Seguridad_Alimentaria/Dictamenes_informes/AASA/Caracteristicas/DOCUMENTO_ORIGINAL_CARACTERISTICAS_CARNE_CORDERO.pdf)
- Caraux, G., and S. Pinloche, 2005. PermutMatrix: A graphical environment to arrange gene expression profiles in optimal linear order. *Bioinformatics* 21: 1280-1281.
- Chávez A, Muñoz de Chávez M. Nutrigenomics in public health nutrition: short-term perspectives. *European J. Clinic. Nut.* 2003. 57: 97–100.
- Chilliard, Y., A. Ferlay and M. Doreau, 2001. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. *Livest. Prod. Sci.* 70: 31-48.
- Chilliard Y, Bonnet M, Delavaud C, Faulconnier Y, Leroux C, Djiane J, Bocquier F. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domest Anim Endocrinol.* 2001. 21: 271–295.
- Cilla, I., Sañudo, C., Campo, M. M., Acero, I., Cañeque, V., Olleta, J. I., Lara, P., Albertí, P., Granizo, J., Catalán, O., 2007. Influencia de la adición en la dieta de vitamina E y flavonoides en la composición de la grasa intramuscular de la carne de vacuno. *ITEA*, 28: 786-788.
- Cohen JC, Pertsemlidis A, Fahmi S, Esmail S, Vega GL, Grundy SM, Hobbs HH. Multiple rare variants in NPC1L1 associated with reduced sterol absorption and plasma low-density lipoprotein levels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Feb 7;103(6):1810-5. *Epub* 2006 Jan 31.

- Colomer, F., Morand Fehr, P., Kirton, A.H., Delfa, R. y Sierra, I. 1988. Métodos normalizados para el estudio de los caracteres cuantitativos y cualitativos de las canales caprinas y ovinas. MAPA. *Cuadernos INIA*, 17, 41 pp.
- Debusk RM, Fogarty CP, Ordovas JM, Kornman KS. Nutritional Genomics in Practice: Where Do We Begin? *J Am Diet Assoc.* 2005;105: 589-598.
- Dufrasne I., Marche C., Clinquart A., Hornick J.L., Van Eenaeme C., Istasse L., 2000. Effects of dietary vitamin E supplementation on performance and meat characteristics in fattening bulls from Belgian Blue breed. *Livest. Prod. Sci.* 65:197-201.
- Eggermont E. 2006. Recent advances in vitamin E metabolism and deficiency. *Eur J Pediatr.* 165(7):429-34.
- Enser, M., K. G. Hallett, B. Hewett, G. A. J. Fursey, J. D. Wood *et al.*, 1998 Fatty acid content and composition of UK beef and lamb muscle in relation to production system and implications for human nutrition. *Meat Sci.* 49: 329-341.
- Fang, F., Kang, Z., & Wong, C. (2010). Vitamin E tocotrienols improve insulin sensitivity through activating peroxisome proliferator-activated receptors. *Mol Nutr Food Res* 54:345-52
- Farke C., Viturro E., Meyer H. H. D. and Albrecht C. Identification of the bovine cholesterol efflux regulatory protein ABCA1 and its expression in various tissues. *J Anim Sci.* 2006, 84:2887-2894.
- Fisher, A. V. y de Boer, H. 1994 The EEAP Standard method of sheep carcass assessment. Carcass measurements and dissection procedures. *Livest. Prod. Sci.* 38, 149-159.
- Fitzgerald, M. L., Mendez, A. J., Moore, K. J., Andersson, L. P., Panjeton, H. A., and Freeman, M. W. (2001). ATP-binding cassette transporter A1 contains an NH<sub>2</sub>-terminal signal anchor sequence that translocates the protein's first hydrophilic domain to the exoplasmic space. *J. Biol. Chem.* 276, 15137-15145
- Garcia-Crespo, D., R. A. Juste and A. Hurtado, 2005 Selection of ovine housekeeping genes for normalisation by real-time RT-PCR; analysis of PrP gene expression and genetic susceptibility to scrapie. *BMC Veterinary Research* 1.
- Gohil K, Godzdanker R, O'Roark E, Schock BC, Kaini RR, Packer L, Cross CE, Traber MG. [alpha]-Tocopherol Transfer Protein Deficiency in Mice Causes Multi-Organ Deregulation of Gene Networks and Behavioral Deficits with Age. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1031:109-126.
- Gómez Ayala AE. Nutrigenómica y nutrigenética. La relación entre la alimentación, la salud y la genómica. *Rev Offarm.* 2007. 26: 78-85.

- González-Calvo, L., Alberti, C., Ripoll, G., Molino, F., Serrano, M., Joy, M., Calvo, J.H. 2013. Effect of finishing period length with  $\alpha$ -tocopherol supplementation on the expression of vitamin E-related genes in the muscle and subcutaneous fat of light lambs. *Meat sci.* (enviado).
- Goti, D., H. Reicher, E. Malle, G. M. Kostner, U. Panzenboeck *et al.*, 1998 High-density lipoprotein (HDL3)-associated  $\alpha$ -tocopherol is taken up by HepG2 cells via the selective uptake pathway and resecreted with endogenously synthesized apo-lipoprotein B-rich lipoprotein particles. *Biochemical J* 332: 57-65.
- Hosomi A, Goto K, Kondo H, Iwatsubo T, Yokota T, Ogawa M, Arita M, Aoki J, Arai H, Inoue K. Localization of alpha-tocopherol transfer protein in rat brain. *NeuroSci. Lett.* 1998;256:159–162.
- Huang, Z. H., Luque, R. M. Rhonda D. Kineman, R.D.,Mazzone, T. 2007 Nutritional regulation of adipose tissue apolipoprotein E expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293:E203-E209
- Huang ZH, Mazzone T. ApoE-dependent sterol efflux from macrophages is modulated by scavenger receptor class B type I expression. *J Lipid Res.* 2002 Mar;43(3):375-82.
- Huebbe P, Lodge JK, Rimbach G. Implications of apolipoprotein E genotype on inflammation and vitamin E status. *Mol Nutr Food Res.* 2010 May;54(5):623-30.
- Hui David Y., Labonté Eric D. and Howles Philip N. Development and Physiological Regulation of and cholesterol absorption. *Intestinal Lipid Absorption. III. Intestinal transporters* *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294:G839-G843
- Kaempf-Rotzoll DE, Horiguchi M, Hashiguchi K, Aoki J, Tamai H, Linderkamp O, Arai H. Human placental trophoblast cells express alpha-tocopherol transfer protein. *Placenta.* 2003;24:439–444.
- Kasimanickam, R. K., and V. R. Kasimanickam, 2011 Effect of tocopherol supplementation on serum 8-epi-prostaglandin F2 alpha and adiponectin concentrations, and mRNA expression of PPAR $\gamma$  and related genes in ovine placenta and uterus. *Theriogenology* 76: 482-491.
- Kersten, S., 2008 Peroxisome proliferator activated receptors and lipoprotein metabolism. *PPAR Res.*
- Lairon, D., B. Play and D. Jourdheuil-Rahmani, 2007 Digestible and indigestible carbohydrates: interactions with postprandial lipid metabolism. *J Nutr Biochem.* 18: 217-227.
- Landes, N., Pfluger, P., Kluth, D., Birringer, M., *et al.*, Vitamin E activates gene expression via the pregnane X receptor. *Biochem. Pharmacol.* 2003, 65, 269–273.
- Lauzurica, S., J. De La Fuente, M. T. Díaz, I. Álvarez, C. Pérez *et al.*, 2005 Effect of dietary supplementation of vitamin e on characteristics of lamb meat packed under modified atmosphere. *Meat Sci.* 70: 639-646.

- Le Lay S, Robichon C, Le Liepvre X, Dagher G, Ferre P, Dugail I. Regulation of ABCA1 expression and cholesterol efflux during adipose differentiation of 3T3-L1 cells. *J Lipid Res* 2003; 44:1499-507.
- Lee, J. H., Waller, J. C., Melton, S. L., & Saxton, A. M. (2006). Incorporation of alpha-tocopherol and linoleic acid in fresh lambs by feeding chemically treated dietary supplements containing DL-alpha-tocopheryl acetate and sunflower oil. *J Agric Food Chem.*, 54(2), 568-573.
- Liu, Q., Lanari, M., & Schaefer, D. (1995). A review of dietary vitamin E supplementation for improvement of beef quality. *J Anim Sci*, 73(10), 3131-3140.
- Major, J. M., K. Yu, W. Wheeler, H. Zhang, M. C. Cornelis *et al.*, 2011 Genome-wide association study identifies common variants associated with circulating vitamin E levels. *Human Molecular Genetics* 20: 3876-3883.
- Martínez, S., C. Barbas and E. Herrera, 2002 Uptake of alpha-tocopherol by the mammary gland but not by white adipose tissue is dependent on lipoprotein lipase activity around parturition and during lactation in the rat. *Metabolism: Clinical and Experimental* 51: 1444-1451.
- Mengual J, Gouranton E, van Helden YGJ, Hessel S, Ribot J, *et al.* (2011). Beta-Carotene Reduces Body Adiposity of Mice via BCMO1. *PLoS ONE* 6(6): e20644.
- Miller, S. A., D. D. Dykes and H. F. Polesky, 1988 A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16: 1215.
- Mooser V, Ordovas JM. 'Omic' approaches and lipid metabolism: are these new technologies holding their promises? *Curr. Opin. Lipid.* 2003. 14: 115-119.
- Morbidini L., Sarti D.M., Pollidori P., Valigi A., 2001. Carcass, meat and fat quality in italian merino derived lambs obtained with organic framing systems. Proceedings of Production systems and product quality in sheep and goats. *Options méditerranéennes.-Serie -A- Séminaires-Méditerranéens* 46: 29-33.
- Munteanu, A., M. Taddei, I. Tamburini, E. Bergamini, A. Azzi *et al.*, 2006 Antagonistic effects of oxidized low density lipoprotein and  $\alpha$ -tocopherol on CD36 scavenger receptor expression in monocytes: Involvement of protein kinase B and peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . *J of Biological Chemistry* 281: 6489-6497.
- Narushima K., Takada T., Yamanashi Y., and Suzuki H.. 2008. Niemann-Pick C1-Like 1 Mediates Tocopherol Transport *Mol Pharmacol* 74:42-49, 2008.
- Pérez-Martínez P, Miranda JL, Ordovás JM y Pérez-Jiménez F. Nutrición en la era de la genómica: hacia una alimentación personalizada. *Med. Clin. Barc.* 2008. 130: 103-108.

- Ricciarelli, R., Zingg, J. M., Azzi, A., Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells. *Circulation* 2000, 102, 82–87.
- Ripoll, G., González-Calvo, L., Molino, F., Calvo, J. H., & Joy, M. (2013). Effects of finishing period length with vitamin E supplementation and alfalfa grazing on carcass color and the evolution of meat color and the lipid oxidation of light lambs. *Meat Sci.*, 93(4), 906-913.
- Ripoll, G., M. Joy and A. Sanz, 2010 Estimation of carcass composition by ultrasound measurements in 4 anatomical locations of 3 commercial categories of lamb. *J Anim Sci.* 88: 3409-3418.
- Sañudo, C., A. Sanchez and M. Alfonso, 1998. Small ruminant production systems and factors affecting lamb meat quality. *Meat Sci.* 49: S29-S64.
- Schmid, A., Collomb M., Sieber R., Bee G. 2006. Conjugated linoleic acid in meat and meat products: a review. *Meat Sci.*. 73: 29-41.
- Selman, C., J. S. McLaren, C. Mayer, J. S. Duncan, A. R. Collins *et al.*, 2008. Lifelong  $\alpha$ -tocopherol supplementation increases the median life span of C57BL/6 mice in the cold but has only minor effects on oxidative damage. *Rejuvenation Res.* 11: 83-95.
- Serrano, M., N. Moreno-Sánchez, C. González, A. Marcos-Carcavilla, M. Van Poucke *et al.*, 2011. Use of Maximum Likelihood-Mixed Models to select stable reference genes: A case of heat stress response in sheep. *BMC Molecular Biology* 12.
- Shichiri, M., Y. Takanezawa, D. E. Rotzoll, Y. Yoshida, T. Kokubu *et al.*, 2010. ATP-Binding cassette transporter A1 is involved in hepatic  $\alpha$ -tocopherol secretion. *J Nutr Biochem.* 21: 451-456.
- Silverstein, R. L., Febbraio, M., CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci. Signal.* 2009, 2, re3.
- Simon JS, Karnoub MC, Devlin DJ, Arreaza MG, Qiu P, Monks SA, Severino ME, Deutsch P, Palmisano J, Sachs AB, Bayne ML, Plump AS, Schadt EE. Sequence variation in NPC1L1 and association with improved LDL-cholesterol lowering in response to ezetimibe treatment. *Genomics*. 2005 Dec;86(6):648-56. Epub 2005 Nov 16.
- Sporstol, M., Tapia, G., Malerod, L., Mousavi, S. A., Berg, T., Pregnan X receptor-agonists down-regulate hepatic ATPbinding cassette transporter A1 and scavenger receptor class B type I. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 331,1533–1541.
- Steibel, J. P., R. Poletto, P. M. Coussens and G. J. M. Rosa, 2009. A powerful and flexible linear mixed model framework for the analysis of relative quantification RT-PCR data. *Genomics* 94: 146-152.
- Stocker, R., 2001 How much is needed for the C-E bounce? *Redox Report* 6: 3-4.

- Trigatti, B. L., R. Brunet and M. How, 2011. Modulators of protein kinase C affect SR-BI-dependent HDL lipid uptake in transfected HepG2 cells. *Cholesterol* 2011.
- Vandesompele, J., K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy *et al.*, 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3.
- Wahrle SE, Jiang H, Parsadanian M, Legleiter J, Han X, Fryer JD, Kowalewski T, Holtzman DM. ABCA1 is required for normal central nervous system ApoE levels and for lipidation of astrocyte-secreted apoE. *J Biol Chem.* 2004; 279: 40987–40993.
- Yakaryilmaz, F., S. Guliter, B. Savas, O. Erdem, R. Ersoy *et al.*, 2007. Effects of vitamin e treatment on peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  expression and insulin resistance in patients with non-alcoholic steatohepatitis: Results of a pilot study. *Internal Medicine J* 37: 229–235.
- Yamanashi, Y., Takada, T., Suzuki, H., In vitro characterization of the six clustered variants of NPC1L1 observed in cholesterol low absorbers. *Pharmacogenet. Genomics* 2009, 19, 884–892.