

EL PERFIL METABOLÓMICO DE SANGRE EN CABRAS LECHERAS SUPLEMENTADAS CON METIONINA BAJO ESTRÉS POR CALOR

Mehaba, N., Coloma García, W., Such, X., Salama, A.A.K. y Caja, G.

Grupo de Investigación en Rumiantes (G2R), Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193, Barcelona, España; ahmed.salama@uab.es

INTRODUCCIÓN

Los mecanismos metabólicos del estrés por calor (EC) en cabras lecheras todavía no están bien definidos. La respuesta metabólica de las cabras lecheras al estrés por calor incluye modificaciones en el metabolismo lipídico, proteico y de hidratos de carbono, lo que permite al animal hacer frente al EC. Por ejemplo, Hamzaoui et al. (2013) observaron que, a pesar de la reducción de la ingestión, las cabras bajo EC fueron capaces de mantener niveles de glucosa en sangre similares a los de los animales en termo neutralidad (TN). Esto es posible en parte mediante el uso de algunos aminoácidos en la gluconeogénesis y la reducción de la descarga de insulina en las condiciones de EC (Salama et al., 2014).

Junto con los cambios metabólicos, el EC causa pérdidas de producción de leche y de sus componentes en caprino (Hamzaoui et al., 2013). En este sentido, la suplementación con metionina puede ser una buena estrategia para mejorar la calidad de leche en cabras bajo EC. Salama et al. (2019) aportaron evidencias *in vitro* de los efectos positivos de la suplementación con metionina sobre el metabolismo de la glándula mamaria.

La metabolómica permite el estudio masivo de los cambios en la concentración de diferentes metabolitos en una determinada muestra biológica. En el presente estudio, se ha usado la técnica de resonancia magnética nuclear de protones ($^1\text{H-NMR}$) para estudiar a fondo el perfil metabolómico de cabras lecheras expuestas al EC y suplementadas con metionina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales, manejo y tratamientos: Se utilizaron 8 cabras lecheras multíparas de raza Murciano-Granadina ($43,3 \pm 1,5$ kg PV) a mitad de lactación ($89,6 \pm 0,3$ d en ordeño, $2,40 \pm 0,06$ L/d), previamente adaptadas a los corrales individuales durante 17 días. Los corrales se situaron en el interior de una nave aislada o en una cámara climática ($4 \times 6,2 \times 3,6$ m; ETS Lindgren-Euroshield Oy, Eura, Finlandia), equipada con un sistema calentador y humidificador (Carel Control Ibérica, Barcelona) y con renovación continua de aire ($90 \text{ m}^3/\text{h}$). El diseño experimental consistió en un cuadrado latino repetido 4×4 (Tratamiento \times Periodo) de 4 periodos de 21 días cada uno y un periodo de transición de 7 días. Las cabras fueron asignadas secuencialmente a uno de los 4 tratamientos, según un diseño factorial 2×2 (Ración \times Ambiente) correspondientes a:

- Ambiente: termo-neutralidad (TN, $19,4 \pm 0,02^\circ\text{C}$; humedad $58 \pm 0,22\%$; THI = 65) o estrés por calor (EC, de 9-21 h a $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ y de 21-9 h a $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$ con $45 \pm 5\%$ de humedad relativa; THI = 83 y 76, respectivamente).
- Ración: control (Con) sin suplementación o suplementación con 2,6 g/d de metionina (Met; Smartamine M, Adisseo NA, Alpharetta, GA),

Esto resultó en 4 grupos experimentales: TN-Con, TN-Met, EC-Con y EC-Met.

Muestreo y análisis: Se obtuvieron muestras de sangre una vez por semana durante cada periodo en la vena yugular, en ayunas y antes del ordeño de la mañana, mediante un tubo de 10 mL con heparina sódica (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ). El plasma se obtuvo por centrifugación a $1500 \times g$ durante 15 min a 4°C , y se almacenó a -20°C hasta el análisis por $^1\text{H-NMR}$. Para realizar el análisis de metabolitos, el plasma se transfirió a tubos de NMR de 5 mm (Wilmad, VWR International, Eurolab, Barcelona) y se procesaron de acuerdo con la metodología descrita por Beckonert et al. (2007). Los espectros de NMR se obtuvieron utilizando un espectrómetro Bruker Avance-III, operando a 600 MHz, con temperatura de 298K. La detección de los espectros se controló con el software TopSpin 2.1 (Bruker, Germany).

Análisis bioinformático: Los datos se trataron con el paquete "Chemospec" del programa R. En primer lugar, se excluyó del análisis la región δ 5,0 a 4,6 ppm correspondiente al agua y se alinearon los picos. A continuación, se usó el programa MetaboAnalyst (v.4; <http://www.metaboanalyst.ca>) para la normalización de los datos y su análisis multivariante. Se aplicó el análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) para

determinar el cambio químico de los metabolitos importantes que marcan la diferencia entre grupos experimentales. Los metabolitos se identificaron según la posición en el espectro, de acuerdo con la bibliografía disponible (Nicholson et al., 1995; Gowda et al., 2015), la base de datos del metaboloma animal (<http://lmdb.ca>), y el banco de datos de resonancia magnética biológica (<http://www.bmrw.wisc.edu>). Además, identificamos la función de cada metabolito utilizando los mapas de vías metabólicas de la Enciclopedia de genes y genomas (KEGG) de Kyoto (<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cabras bajo condiciones de EC aumentaron la temperatura rectal ($1,02 \pm 0,02$ °C; $P < 0,001$), consumieron más cantidad de agua ($1,98 \pm 0,24$ L/d; $P < 0,001$), y tuvieron una menor ingestión ($-0,22 \pm 0,06$ kg/d), pero produjeron la misma cantidad de leche en comparación con las condiciones TN.

En la Figura 1 se observa la discriminación explicada por las variables seleccionadas por el AD-MCP, entre la combinación de los tratamientos de temperatura ambiente y la suplementación o no con metionina.

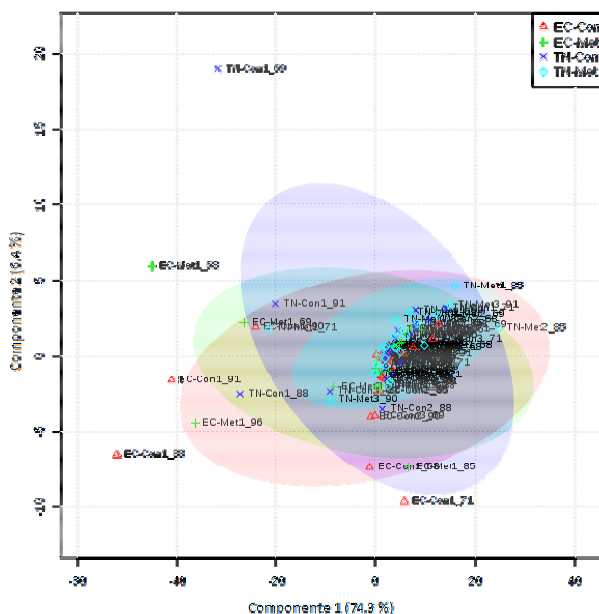


Figura 1. Componentes principales del perfil de metabolitos en sangre de las cabras en condiciones termo-neutras (TN) o estrés por calor (EC), y suplementadas con metionina (Met) o no (Con) durante 3 semanas consecutivas. Valores obtenidos por PLS-DA.

En la Tabla 1 se muestran los 9 metabolitos más importantes que marcan la diferencia entre los 4 grupos experimentales. La mayoría de los metabolitos detectados han sido aminoácidos relacionados con el metabolismo de la metionina. El acetil-L-lisina, un indicador de degradación de lisina, aumenta en EC comparado con el TN, aumentando más aún con la suplementación con metionina. Estos resultados están de acuerdo con lo observado por Gao et al. (2017) en vacas bajo EC, que tuvieron niveles más bajos de lisina. La suplementación con metionina aumentó los niveles de O-Acetil-serina independientemente de la condición ambiental, indicando un aumento en la degradación de metionina. Los niveles de seleno-metionina se incrementaron con el EC, y la suplementación con metionina en dichas condiciones los disminuyó, implicando un aumento en la disponibilidad metabólica de la metionina. El EC aumentó los niveles de homocisteína comparado con la TN. No obstante, la suplementación con metionina la disminuyó en ambas condiciones ambientales.

Tabla 1. Metabolitos que discriminan entre cabras en condiciones termo-neutras (TN) y estrés por calor (EC) durante 3 semanas. En ambas condiciones, las cabras fueron sin suplementar (Con) o suplementadas con metionina (Met). El color negro indica la intensidad más alta del metabolito mientras que el color blanco indica la intensidad más baja.

Metabolito	Cambio químico (ppm)	Tratamiento			
		TN		EC	
		Con	Met	Con	Met
N6-Acetil lisina	1,543				
O-Acetil serina	4,489				
L-Ornitina	1,796				
Selenometionina	5,757 y 5,803				
NADP ⁺	4,467				
Aspartato	2,817				
Homocisteína	2,652				
Acetoacetato	2,203				
Triptófano	7,783				

El aumento en los niveles de homocisteína en condiciones EC indica un aumento en la degradación de la metionina. El EC aumentó los niveles de ornitina, un aminoácido que interviene en la síntesis de arginina y el ciclo de formación de urea, mientras que la suplementación los disminuyó. Los niveles del acetoacetato, entre varias funciones, interviene en la degradación de la lisina, lo que concuerda con los niveles de acetil lisina. En conclusión, ¹H-NMR detectó que los cambios metabólicos debidos al EC están principalmente relacionados con el metabolismo de los aminoácidos. Además, ha confirmado que la metionina es un aminoácido limitante en el metabolismo basal de las cabras lecheras bajo EC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beckonert, O., H.C. Keun, T.M.D. Ebbels, J. Bundy, E. Holmes, J.C. Lindon, & J.K. Nicholson. 2007. Nat. Protoc. 2:2692–2703.
- Gao, S.T., J. Guo, S.Y. Quan, X.M. Nan, M.V.S. Fernandez, L.H. Baumgard, & D.P. Bu. 2017. J. Dairy Sci. 100:5040–5049.
- Gowda, G.A., Y.N. Gowda, & D. Raftery. 2015. Anal. Chem. 87:706–715.
- Hamzaoui, S., A.A.K. Salama, E. Albanell, X. Such, and G. Caja. 2013. J. Dairy Sci. 96:6355–6365.
- Nicholson, J.K., P.J. Foxall, M. Spraul, R.D. Farrant, and J.C. Lindon. 1995. Anal. Chem. 67:793–811.
- Salama, A.A.K., G. Caja, S. Hamzaoui, B. Badaoui, A. Castro-Costa, D.A.E. Façanha, M.M. Guilhermino, and R. Bozzi. 2014. Small Rumin. Res. 121:73–79.
- Salama, A.A.K., M. Duque, L. Wang, K. Shahzad, M. Olivera, and J.J. Loo. 2019. J. Dairy Sci. 102:1–12.

Agradecimientos: Proyecto AGL2013-44061-R (Ministerio de Economía y Competitividad); 2017 FI_B_00303 beca del Gobierno de Cataluña (AGAUR) a Nabil Mehaba.

BLOOD METABOLOMIC PROFILE OF DAIRY GOATS SUPPLEMENTED WITH METHIONINE UNDER HEAT STRESS CONDITIONS

ABSTRACT:

To gain insight on the impact of methionine supplementation to mid-lactating dairy goats under heat stress conditions on blood metabolites, we employed a comparative metabolomic approach to investigate the blood metabolome response. Eight multiparous Murciano-Granadina dairy goats (89.6 ± 0.3 DIM, 2.40 ± 0.06 L/d and 43.3 ± 1.5 kg BW) maintained in individual pens were used in 4×4 Latin square (4 periods; 21 d each). Factors were: 1) TN (15 to 20°C), 2) HS (12 h/d at 33.2 ± 0.12 °C and 12 h/d at 27.9 ± 0.07 °C), 3) control diet (Con), and 4) diet supplemented with 2.6 g/d rumen-protected methionine. Blood samples were collected weekly during the experiment. HS increased lysine degradation. Furthermore, methionine supplementation accentuated lysine degradation under HS conditions. In conclusion, the metabolic changes due to HS were mainly related to the metabolism of amino acids.

Keywords: Dairy goats, heat stress, ¹H-NMR, metabolomics, methionine.