

EFFECTOS A CORTO PLAZO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON BETA-GLUCANOS DE CEBADA A OVEJAS LECHERAS: 2. METABOLOMA

Contreras-Jodar, A., Torrent, N., Mehaba, N., Salama, A.A.K., Albanell, E. y Caja, G. Grup de Recerca en Remugants (G2R), Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, España. alexandra.contreras@uab.cat

INTRODUCCIÓN

Como continuación del trabajo previo (Torrent et al., 2017) en el que se evaluaron los efectos productivos y metabólicos a corto plazo de la suplementación con β -glucanos de cebada en ovejas lecheras al final de lactación, se estudiaron los efectos producidos en su metaboloma. Los efectos lactogénicos de extractos de cebada o de algunas fracciones de cerveza en animales y humanos son conocidos desde antiguo. Sawadogo y Houdebine (1988) indicaron que la inyección endovenosa de una solución de β -glucanos de cebada (100 mg) en ovejas, elevó sus niveles de prolactina y hormona de crecimiento en sangre. El componente activo y la relación con la secreción de prolactina se desconocen, pero entre ellos se han identificado los β -glucanos (Eslimi et al., 2008). Como posible hipótesis se ha sugerido que los β -glucanos, pectinas y sus derivados tienen homologías con la matriz extracelular de las células de la adenohipófisis (anterior) de los mamíferos y que, los compuestos activos de las plantas, podrían afectar a la secreción de prolactina debido a la afinidad con sus receptores (Eslimi et al., 2008).

Los β -glucanos son polisacáridos con enlaces β -1,3 ó β -1,4 de la glucosa, que constituyen una parte de la llamada fibra dietética, y son indigestibles para los mamíferos (aunque sí para muchas de las bacterias ruminales). En la actualidad se han desarrollado variedades de cebada de alto contenido en β -glucanos (7-10%; Newman y Newman, 2008), lo que puede tener interesantes aplicaciones en las raciones de especies lecheras.

Este trabajo explora la respuesta metabólica a corto plazo, en sangre, leche y orina, de la administración de un extracto de β -glucanos a ovejas lecheras y completa las tendencias detectadas previamente a nivel de producción y metabolismo (Torrent et al., 2017).

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales y diseño experimental: Se utilizaron 5 ovejas de raza Lacaune en lactación ($66,7 \pm 2,6$ kg PV; 202 ± 22 d y $1,58 \pm 0,12$ kg/d leche), alimentadas con alfalfa ad libitum y concentrado, que se adaptaron a cajas metabólicas y se sometieron a raciones de distinto contenido en β -glucanos consecutivamente: Control durante 20 d (P1, d 1-20) y suplementadas con β -glucanos de cebada ($1,26$ g BG/kg PV^{0,75}) durante 5 d (P2, d 21-25). El producto utilizado fue Glucagel (Zeus Ibérica, Barcelona) con un contenido de 77,5% de β -glucanos de cebada que se añadieron al concentrado suministrado 2 veces al día.

Toma de muestras: Se recogieron muestras de sangre, leche y orina para estudios de metabólica (Control, d 20; β -glucanos, d 25). La sangre fue centrifugada ($2000 \times g$ durante 15 min) para separar el plasma y todas las muestras se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Análisis de espectroscopía por Resonancia Magnética Nuclear (RMN): Para realizar el análisis de metabolitos con la técnica de RMN, todas las muestras de plasma, leche y orina se transfirieron a tubos de RMN de 5 mm (VWR International, Eurolab, Barcelona) y se procesaron de acuerdo con la metodología de Beckonert et al. (2007) con modificaciones.

Los espectros de RMN se obtuvieron utilizando un espectrómetro Bruker Avance-III operando a una frecuencia de protón a 600,13 MHz con temperatura de 25°C . La detección de los espectros se controló con el software TopSpin 2.1 (Bruker, Alemania).

Análisis bioinformático y bioestadístico de los datos: Se llevó a cabo utilizando R software v. 3.2.3. En primer lugar, se corrigió la línea base de los espectros y se excluyó del análisis la región δ 5,0 a 4,6 ppm correspondiente al agua. Los espectros de orina fueron estandarizados a creatinina (3,04 ppm) y también se excluyó la región δ 6,05-5,52 ppm correspondiente al pico de urea, tal y como recomiendan Pechlivanis et al. (2010). Los espectros de leche y plasma se estandarizaron en base a 100. Posteriormente, los datos fueron analizados por estadística multivariante. Inicialmente, por análisis de componentes principales (PCA), para obtener una visión general de los datos y observar posibles

muestras atípicas y luego un análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Finalmente, se seleccionaron los cambios químicos que contribuyeron a una mayor separación entre grupos experimentales, se comprobó su influencia calculando el *fold change* y el *P*-valor por comparación de medias en datos pareados. Los metabolitos se identificaron según posición en el espectro de acuerdo con la bibliografía disponible para plasma (Nicholson et al., 1995), leche (Sundekilde et al., 2013) y orina (Bouatra et al., 2013).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se observó ninguna muestra atípica de plasma, leche ni orina al realizar el análisis de componentes principales, por lo que no se descartó ninguna de ellas en los análisis estadísticos posteriores. La suplementación con β -glucanos durante 5 d produjo como resultado pequeñas diferencias en el metaboloma de las ovejas (Figura 1).

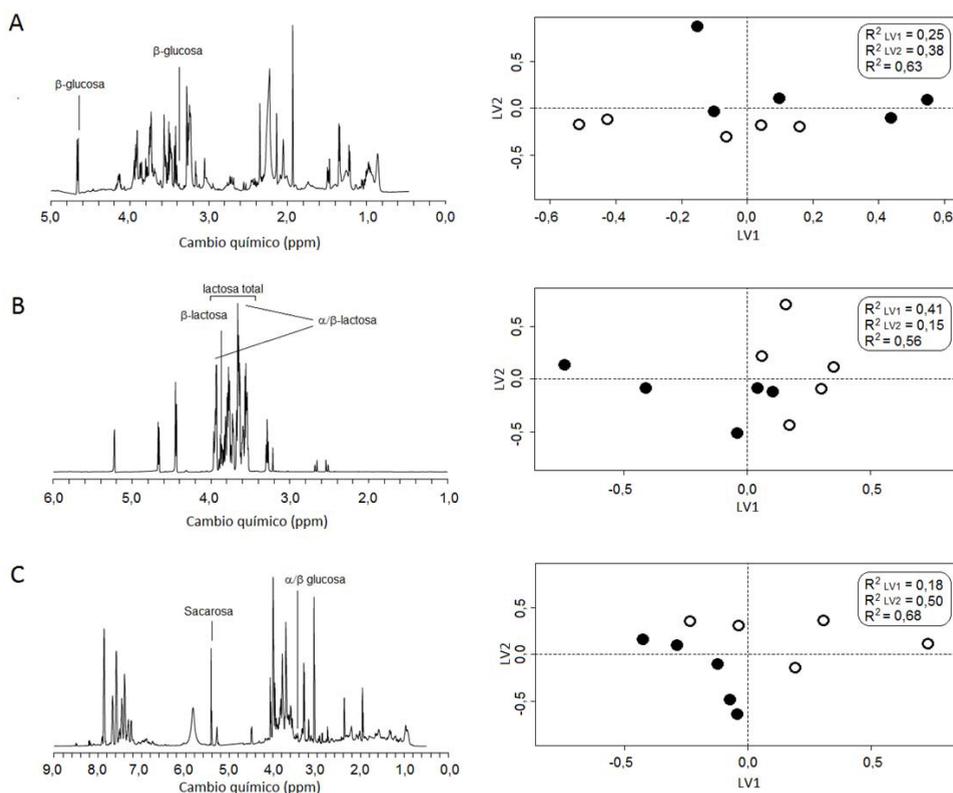


Figura 1. Espectros de ^1H RMN a 600 MHz y gráfico de análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales de A) plasma, B) leche y C) orina de oveja (\circ , Control; \bullet , β -glucanos).

Los metabolitos que contribuyeron a la diferenciación fueron los debidos a mayores contenidos de β -glucosa en plasma, α/β -lactosa y lactosa total en leche, así como a mayores excreciones de sacarosa y α/β -glucosa en orina en las ovejas suplementadas con β -glucanos (Tabla 1). Estos resultados podrían sugerir que los β -glucanos no se degradaron en su totalidad en el rumen, sino que fueron también absorbidos y transportados por el torrente sanguíneo. Aunque analíticamente no se hayan observado diferencias significativas en la cantidad de lactosa en leche entre tratamientos, sí se observó una mayor concentración de lactosa en el perfil metabólico de las ovejas suplementadas con β -glucanos por ^1H -RMN espectroscópica. Cabe destacar, que los efectos analizados en el

presente estudio son a corto plazo (5 d), por lo que no se puede descartar el efecto lactogénico de los β -glucanos o de sus derivados sobre los receptores de hormonas lactotrópicas (e.g., prolactina, hormona de crecimiento).

Tabla 1. Metabolitos que contribuyeron a la separación de metabolomas mediante PLS-DA.

Muestra	Metabolito	Cambio químico (ppm ¹)	Fold Change	P-valor
Plasma	β -glucosa	3,40 (H4t) ²	0,80	0,01
	β -glucosa	4,68 (H1d)	2,32	0,02
Leche	α/β -lactosa	3,65 (CH-4); 3,95 (1/2 CH2-6)	1,16	0,03
	β -lactosa	3,84 (CH-5)	1,20	0,047
	Lactosa total	3,77 (H2-6'); 3,72 (CH-5')	1,20	0,02
	Lactosa total	3,93 (CH-2); 3,54 (CH-2')	1,16	0,04
Orina	Sacarosa	5,40	1,53	0,004
	α/β -glucosa	3,41 (H4)	1,51	0,02

¹Cambio de frecuencia de resonancia. ²Posición del protón afectado por el cambio.

Por otro lado, la excreción de sacarosa detectada en orina podría estar relacionada con una mayor excreción de lactosa en animales en lactación (Wheelock y Rook, 1966). Las diferencias observadas en el perfil metabólico de leche y orina podrían indicar un mejor estado nutritivo en las ovejas suplementadas con β -glucanos de cebada. Estas conclusiones deberán ser comprobadas en estudios posteriores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beckonert, O., et al. 2007. Nat. Protoc. 2:2692-2703
- Bouatra, S., et al. 2013. PLoS One 8:e73076
- Eslimi, D., et al. 2008. Iran. Biomed. J. 3:167-172
- Newman, R.K. & Newman, C.W. 2008. Barley for food and health. J. Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA
- Nicholson, J.K., et al. 1995. Anal. Chem. 67:793-811
- Pechlivanis, A., et al. 2010. J. Proteome Res. 9:6405-6416
- Sawadogo, L. & Houdebine, L.M. 1988. Ann. Biol. Clin. 46:129-134
- Sundekilde, U.K., et al. 2013. Metabolites 3:204-222
- Torrent, N., et al. 2017. XVII Jornadas sobre producción animal AIDA, Zaragoza
- Wheelock, J.V. & Rook, A.F. 1966. J. Dairy Res. 33:37-42.

Agradecimientos: Proyecto AGL2015-69435-C3-3-R y beca FPI a A. Contreras-Jodar (Programa Estatal I+D+i, MINECO, España), al Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ) por una beca parcial de M.Sci. N. Torrent y a Zeus Ibérica (Barcelona).

SHORT-TERM EFFECTS OF BARLEY β -GLUCANS SUPPLEMENTATION TO DAIRY EWES: 2. METABOLOMA

ABSTRACT: This study is a short-term investigation of the potential lactogenic effects of a commercial barley β -glucans (Glucagel) supplementation in ewes. Five Lacaune lactating dairy ewes (66.7 \pm 2.6 kg BW; 202 \pm 22 DIM and 1.58 \pm 0.12 kg/d milk yield) were allocated in metabolic cages and submitted to 2 dietary treatments consecutively (CO, control; BG, β -glucans supplementation at a rate of 1.62 g/kg BW^{0.75}) during 25 d (CO, d1 to 20; BG, d21 to 25). ¹H Nuclear Magnetic Resonance based metabolomics was used as a tool to generate an integrated vision of the changes in the metabolic profile of blood plasma, milk and urine samples obtained at the end of the experimental periods. The metabolomics approach along with the multivariate analysis was able to differentiate between dietary treatments, showing the metabolites that contribute in greater variability between diets. Therefore, ewes fed β -glucans supplementation for 5 d had higher β -glucose in plasma, lactose in milk and higher excretion of sucrose in urine. The present study is the first metabolomic study of β -glucans supplementation in ruminants.

Keywords: lactating ewe, β -glucan, barley, metabolomic