

## EL PERFIL METABOLÓMICO DE SANGRE EN CABRAS LECHERAS ESTRESADAS POR FRÍO

Mehaba, N., Coloma García, W., Salama, A.A.K. y Caja, G.  
Grupo de Investigación en Rumiantes (G2R), Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra,  
08193, Barcelona, España.  
E-mail: ahmed.salama@uab.es

La variabilidad de las temperaturas produce olas de frío y calor extremas (IPCC, 2014). Ante estas circunstancias, la respuesta de los rumiantes al frío puede producirse mediante diferentes mecanismos. Por una parte, el estrés agudo por el frío produce un aumento de dos y cinco veces las concentraciones plasmáticas de epinefrina y norepinefrina en ovejas esquiladas, respectivamente (Thompson et al., 1978). Además, a través de la inervación somática, éstas provocan temblores, siendo la principal fuente de termogénesis en mamíferos adultos (Young, 1978). Estas catecolaminas producen un aumento en la concentración plasmática de glucosa y ácidos grasos libres (Thompson, 1973). En adición, producen también un cambio en los niveles de glucocorticoides y hormonas tiroideas, pero su actividad e interrelación en condiciones de estrés por frío y la adaptación fisiológica es indudablemente más compleja (Christopherson et al., 1978). Se ha observado la participación de las hormonas tiroideas en la termogénesis que representa aproximadamente el 50 % de la tasa metabólica basal en animales normales (Habeeb et al., 1992). Por su parte, la triiodotironina ( $T_3$ ) regula la lipólisis (Oppenheimer et al., 1991) y la tiroxina aumenta la resistencia al frío y la sensibilidad a la norepinefrina en animales pequeños de laboratorio (Johnson, 1976).

Se puede considerar que la adaptación fisiológica al estrés por frío es un proceso complejo. Por ello, el objetivo del presente estudio aplicó la técnica de resonancia magnética nuclear de protones (H-NMR) para evaluar los cambios en el perfil metabólico en sangre de cabras lecheras expuestas al estrés por frío.

### MATERIAL Y MÉTODOS

**Animales, manejo y tratamientos:** Los procedimientos utilizados fueron aprobados por el Comité de Ética de la facultad de veterinaria (1430/12). Se utilizaron 8 cabras lecheras multíparas de raza Murciano-Granadina ( $41,8 \pm 5,7$  kg PV) a mitad de lactación ( $77 \pm 2$  d;  $2,13 \pm 0,36$  L/d) pertenecientes al Servei de Granges i Camps Experimentals de la UAB en Bellaterra (Barcelona), previamente adaptadas a cajas metabólicas de tipo plástico con zona de reposo de goma y paredes con paneles cortaviento. Las cajas se situaron en la cámara climática ( $4 \times 6,2 \times 3,6$  m; ETS Lindgren-Euroshield Oy, Eura, Finlandia), equipada con un sistema de enfriamiento programable (Rele programable, Siemens logo; Inmasa, Tarragona) y registro de humedad (no programable).

Las cabras se asignaron aleatoriamente a 2 grupos a los que se aplicaron los tratamientos experimentales correspondientes a 2 temperaturas ambientales, con humedad relativa (60%) y fotoperiodo (luz-oscuridad, 12-12 h) constantes. Los tratamientos fueron:

- Termo-neutralidad (**TN**):  $15-20^\circ\text{C}$ , durante todo el día y noche.
- Estrés por frío (**EF**):  $-3$  a  $6^\circ\text{C}$ , con cambios graduales de temperatura ( $0,75^\circ\text{C/h}$ ) con mínima y máxima a las 2 h (noche) y 13 h (día).

El diseño experimental consistió en un crossover de 2 periodos (21 d cada uno) con 4 cabras en cada periodo. Las cabras recibieron una ración total mezclada (70% forraje y 30% concentrado) *ad libitum*, de acuerdo con sus necesidades (INRA, 2007) y se ordeñaron 2 veces al día (0800 y 1700 h) en el interior de la cámara utilizando un equipo portátil (GEA, Granollers) a 40 kPa, 120 ppm y 60:40% de pulsación. El agua se suministró libremente a temperatura ambiente.

**Muestreo y análisis:** Se recogieron las muestras de sangre semanalmente de la vena yugular en ayunas y antes del ordeño de la mañana, en un tubo de 10 mL con heparina de sodio (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ). Se obtuvo el plasma por centrifugación a  $1500 \times g$  durante 15 min a  $4^\circ\text{C}$  y se almacenó a  $-30^\circ\text{C}$  hasta el análisis por H-NMR. Para este estudio se analizaron las muestras recogidas en TN justo antes de pasar por el EF (wk1) y las muestras recogidas durante las 3 semanas de EF (wk2, wk3 y wk4).

Para realizar el análisis de metabolitos, el plasma se transfirió a tubos de RMN de 5 mm (Wilmad, VWR International, Eurolab, Barcelona) y se procesaron de acuerdo con la

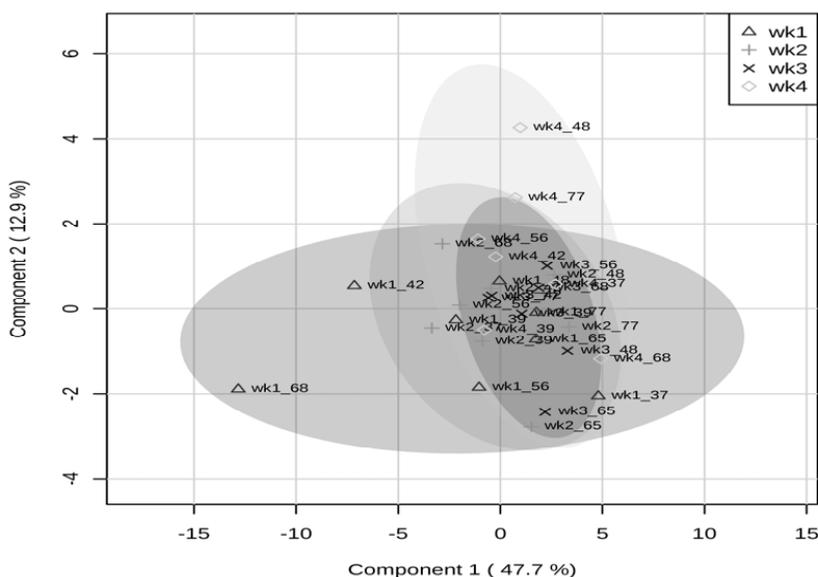
metodología descrita por Beckonert et al. (2007). Los espectros de NMR se obtuvieron utilizando un espectrómetro Bruker Avance-III operando a 600 MHz con temperatura de 298K. La detección de los espectros se controló con el software TopSpin 2.1 (Bruker, Germany).

**Análisis bioinformático:** Los datos se trataron con el paquete “Chemospec” del programa R. En primer lugar, se excluyó del análisis la región  $\delta$  5,0 a 4,6 ppm correspondiente al agua y se alinearon los picos. A continuación, se usó el programa MetaboAnalyst (v.3; <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. Los metabolitos se identificaron según la posición en el espectro, de acuerdo con la bibliografía disponible (Nicholson et al., 1995; Louis et al., 2014; Nagana et al., 2015) y la base de datos del metaboloma humano.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cabras bajo condiciones de EF (wk2, wk3 y wk4) tuvieron menos ( $P < 0,05$ ) temperatura rectal ( $-0.32^{\circ}\text{C}$ ), consumieron menos cantidad de agua ( $-1.25 \pm 0.24$  L/d;  $P < 0,05$ ) y produjeron menos ( $P < 0.01$ ) cantidad de leche ( $-0.19$  L/d) en comparación con el periodo TN (wk1). Estos resultados indican que las bajas temperaturas usadas en este experimento causaron un estrés por frío significativo en las cabras.

En la Figura 1 se observa una discriminación entre las 3 semanas del EF (wk2, wk3 y wk4) y la semana del TN (wk1). Esto indica un cambio significativo en el metabolismo cuando se exponen las cabras al EF.



**Figura 1.** Componentes principales del perfil de metabolitos de las cabras TN (wk1) antes de pasar al estrés por frío durante 3 semanas consecutivas (wk2, wk3 y wk4). Valores obtenidos por PLS-DA.

La Tabla 1 muestra los 10 metabolitos principales que marcan la diferencia entre semanas de experimento. Todos los metabolitos aumentaron bajo EF, a excepción de la leucina. El EF produjo un aumento de la fosfatidilcolina alcanzando el máximo nivel en la tercera semana de EF. La fosfatidilcolina está involucrada en la actividad de la fosfolipasa  $A_2$  que juega un papel esencial en la regulación de las propiedades fisicoquímicas de la membrana

neuronal, que influye en la función receptora y en la transducción de las señales (Farooki et al., 1995).

**Tabla 1.** Metabolitos que discriminan entre cabras en condiciones termo-neutras (TN; wk1) y durante 3 semanas (wk2, wk3 y wk4) bajo estrés por frío (EF). El color negro indica la intensidad más alta del metabolito mientras el color blanco indica la intensidad más baja.

Metabolito	Cambio químico (ppm)	TN	Tratamiento EF		
		Wk1	Wk 2	Wk3	Wk 4
Isoleucina	1,961	■	□	■	□
Fosfatidilcolina	3,599	□	■	□	■
Tirosina	3,029	□	■	□	■
Ketoleucina	0,941	□	■	■	□
Asparagina	2,999	□	□	■	■
β-glucosa	3,882 y 3,521	□	□	■	■
α-glucosa	5,263	□	□	■	■
Valina	2,307	□	□	■	■
Leucina	0,971	□	■	□	■

Es posible que algunos de los amino ácidos que aumentan durante el EF sean usados por el hígado para la gluconeogénesis. De acuerdo con esta observación los niveles de α- y β-glucosa fueron mayores durante las semanas de EF (Tabla 1). Finalmente, la tirosina es un precursor de las catecolaminas, cuyas concentraciones son altas durante el estrés por frío como se ha visto en el estudio de Talas y Yurekli. (2006), donde observaron niveles elevados de adrenalina, noradrenalina y tirosina hidroxilasa activada (catalizador de tirosina a dopamina) en plasma de ratas. En conclusión, el uso del H-NMR ha permitido detectar que el estrés por frío causa un cambio en el perfil metabolómico en las cabras lecheras. Este cambio se puede relacionar principalmente con la síntesis de glucosa y catecolaminas que ayudan al animal a hacer frente a estas condiciones ambientales extremas.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beckonert, O., et al. 2007. Nat Protoc.2 :2692-703.
- Christopherson, R. J., et al. 1978 Can. J. Physiol. Pharmacol.59 : 490.
- Farooqui, A. A., et al. 1995. Brain. Res. Rev. 21 :152-161.
- International Panel for Climate Change 2014.
- Louis, E. et al., 2014. Metabolomics.
- Nagana, G. A., et al., 2015. Anal Chem.
- Nicholson, J. K., et al. 1995. Lindon Anal. Chem. 67 (5), 793-811.
- Oppenheimer, J.H., et al. 1991. J Clin Invest. 87. 125–132.
- Talas, Z. S., & Yurekli, M. 2006. Cell Biochem Funct. 24 :537–540.
- Young, B. A. 1978. Joint Annu. Meet. of the ADSA & ASAS.
- Habeeb, A.A.M., et al.,1992. CAB Inter,Wal, UK, pp. 27–47.
- Johnson, H. D. 1976. Div. B.VOL. 1. Part 1.
- Thompson, G. E. 1973. J. Dairy Re. 40:441.
- Thompson, J. R. et al., 1978. Can. J. Anita. Sol. 58:23.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (Proyecto AGL2013-44061-R).

### BLOOD METABOLOMIC PROFILE OF COLD-STRESSED DAIRY GOATS

**ABSTRACT:** This study is an explorative investigation of the potential biomarkers of cold stress in dairy goats. Eight lactating Murciano-Granadina dairy goats (41.75 ± 2.02 kg BW, 70 ± 2 DIM, 2.13 ± 0.36 kg milk /d) were maintained in metabolic cages and divided into 2 groups: thermo-neutral (TN; 15 to 20°C) and cold stress (CS; -4 to 8°C). The experimental design was a crossover with 2 treatments in 2 periods (21d each). Blood samples were collected weekly before and during the CS. Plasma were separated and analyzed by H-NMR based metabolomics. The metabolomics approach along with the multivariate analysis indicated differences in the metabolomics profile due to the CS. Dairy goats under CS had higher α- and β-glucose in plasma which could result from the use of some amino acids for gluconeogenesis. Also, an increment in tyrosine that could be used for the synthesis of catecholamines was observed. In conclusion, the H-NMR was a useful technique to define differences in the metabolome by cold stress. The metabolic changes detected were mainly related to the increment in glucose and neurotransmitters syntheses.

**Keywords:** Metabolomics, H-NMR spectroscopy, cold stress, dairy goats