

ABUNDANCIA MITOCONDRIAL HEPÁTICA EN DOS GENOTIPOS HOLSTEIN EN PASTOREO

Mercedes García-Roche^{1,2 *}, Guillermo Cañibe¹, Daniel Talmón¹, Alejandro Mendoza³,

Adriana Cassina², Celia Quijano² y Mariana Carriquiry¹

1- Departamento de Producción Animal y Pasturas, Facultad de Agronomía, Universidad de la República, Uruguay

2- Centro de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay.

3- Programa de Producción de Leche, INIA "La Estanzuela", Uruguay; *Autor de correspondencia: mercedesg@fagro.edu.uy

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la abundancia mitocondrial hepática en dos genotipos Holstein en un sistema pastoril durante lactancia media-tardía. Para este trabajo se utilizaron vacas del genotipo Holstein neozelandés y del genotipo Holstein norteamericano, las mismas pastorearon una pastura mixta de *Medicago sativa* y *Dactylis glomerata* y suplementadas con concentrados y reservas forrajeras. Se tomaron biopsias de hígado y se analizó la expresión génica del factor de transcripción peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (controlador maestro de la biogénesis mitocondrial; *PPARGC1A*), la actividad citrato sintasa y la relación ADN mitocondrial / ADN nuclear. No se encontraron diferencias entre genotipos en la expresión de *PPARGC1A*, sin embargo, tanto la actividad citrato sintasa como la relación ADN mitocondrial / ADN nuclear fueron mayores para el genotipo Holstein neozelandés. Una mayor abundancia mitocondrial es clave para el mantenimiento de la homeostasis energética, elemento crucial para la mejor adaptación a los cambios fisiológicos.

SUMMARY

The aim of this work was to determine the hepatic mitochondrial abundance in two Holstein genotypes in a pastoral system during mid-late lactation. For this study, cows of the New Zealand Holstein genotype and the North American Holstein genotype were used. Cows grazed a mixed pasture of *Medicago sativa* and *Dactylis glomerata* and were supplemented with concentrate and forage reserves. Liver biopsies were taken and the gene expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha – (a master regulator of mitochondrial biogenesis, *PPARGC1A*)

transcription factor, the citrate synthase activity, and the mitochondrial DNA / nuclear DNA ratio were analyzed. No differences were found between genotypes in the expression of *PPARGC1A*, however, both citrate synthase activity and the mitochondrial DNA / nuclear DNA ratio were higher for the New Zealand Holstein genotype. Greater mitochondrial abundance is key to maintaining energy homeostasis, a crucial element for a better adaptation to physiological changes.

INTRODUCCIÓN

La lactancia es un proceso demandante, especialmente para vacas lecheras altamente productoras. En rumiantes, el hígado juega un rol central en el metabolismo energético ya que provee al resto del organismo con glucosa y cuerpos cetónicos y también es clave en la regulación del metabolismo de la glucosa y ácidos grasos (Drackley, 1999). Asimismo, la mitocondria representa el sitio principal de síntesis de ATP y la abundancia de la misma puede verse alterada según el estado fisiológico con el fin de mantener la homeostasis energética (Scarpulla, 2011; García-Roche et al., 2019).

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo en la Estación Experimental "La Estanzuela" del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA, Colonia, Uruguay) durante la primavera de 2017, 2018 y 2019 bajo el protocolo de experimentación animal aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal del INIA (#INIA 2017.2). Se utilizaron vacas de parición en otoño de genotipo neozelandés (HNZ, 512 ± 19 kg de peso vivo (PV) y 3,07 ± 0,12 puntos de condición corporal (CC), N = 12) y de genotipo norteamericano (HNA, 563 ± 29 kgPV y 3,10 ± 0,10 CC, N = 12) en un diseño com-

pleto al azar. Ambos genotipos tenían más de 87,5% de ascendencia probada neozelandés o norteamericana, respectivamente (Mejoramiento y Control Lechero Uruguayo; <https://www.mu.org.uy>). Las vacas pastorearon una pradera mixta de *Medicago sativa* y *Dactylis glomerata* ($11,2 \pm 0,9$ kgMS/VO/d (más de 5 cm) para HNZ y $14,9 \pm 1,5$ kgMS/VO/d (más de 5 cm) para HNA en dos sesiones de pastoreo) y se suplementaron con $6,8 \pm 0,4$ kgMS/d de concentrado para HNZ y $7,5 \pm 0,9$ kgMS/d de concentrado para HNA y $2,2 \pm 1,9$ kgMS/d de reservas forrajeras para HNZ y $2,9 \pm 1,7$ kgMS/d para HNA. La producción de leche se registró de forma diaria y se tomaron muestras para composición de leche cada 15 días. Se registró la condición corporal cada 15 días. Los datos se analizaron con un modelo mixto donde el año se utilizó como efecto aleatorio y el genotipo como efecto fijo.

Se estudió la expresión génica del factor de transcripción *PPARGC1A* por PCR en tiempo real donde se utilizaron los genes endógenos β -actin (*ACTB*) y hypoxanthine phosphoribosyl transferase (*HPRT1*) para la cuantificación de la abundancia relativa de ARNm. Para el estudio de la abundancia mitocondrial se determinó la actividad de la enzima citrato sintasa en homogeneizados de hígado. El método se basa en la reacción catalizada por citrato sintasa que forma citrato y coenzima A, a partir de acetil-CoA y oxalacetato. Se utilizó el reactivo de Ellman o ácido 5,5'-Ditio-bis (2-nitrobenzoico) (DTNB, 100 μ M), el cual al reaccionar con el tiol de la Coenzima A forma un compuesto de color amarillo con un coeficiente de extinción molar a $\lambda = 412$ nm de $13700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (García-Roche et al., 2019). Asimismo se estudió la relación de ADN mitocondrial/ADN nuclear por la reacción de PCR en tiempo real utilizando cebadores específicos que codifican para el genoma mitocondrial (cytochrome c oxidase I, *mt-CO1*) y nuclear (NADH:ubiquinoneoxidoreductase core subunit V1, *NDUFV1*) (Casal et al., 2018).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La producción de leche fue mayor para las vacas HNA vs. HNZ (30 vs. 24 ± 1 kg/d, $P < 0,0001$), sin embargo, la leche corregida por sólidos no difirió ($P = 0,39$) entre ellas. La CC

tampoco difirió entre genotipos ($2,59$ vs. $2,53 \pm 0,09$, $P = 0,18$). Estos resultados son consistentes con estudios anteriores donde si bien la producción de leche es mayor para el genotipo HNA, el genotipo HNZ produce mayor contenido de sólidos (Kolver et al., 2002; Talmón et al., 2020).

La expresión génica de *PPARGC1A* -un controlador maestro de la biogénesis mitocondrial (Scarpulla, 2011)- no difirió entre genotipos ($1,93$ vs. $0,84 \pm 0,31$, $P = 0,13$) para HNZ vs. HNA. Por otra parte, la actividad citrato sintasa -una enzima constitutiva de la matriz mitocondrial utilizada como marcador mitocondrial- fue mayor para las vacas HNZ vs. HNA ($16,5$ vs. $10,7 \pm 1,9$, $P < 0,05$). Estos datos coinciden con un reporte anterior sugiere que las vacas HNZ presentan mayor capacidad oxidativa (White et al., 2012). Asimismo, la relación ADN mitocondrial / ADN nuclear ($1,04$ vs. $0,69 \pm 0,10$, $P < 0,05$) fueron mayores para HNZ vs. HNA, respectivamente. Por otro lado, a pesar de no observar un efecto significativo en la expresión del factor de transcripción *PPARGC1A*, es posible que el mismo se active por modificaciones post-traduccionales y así medie en la modulación de la biogénesis mitocondrial (Cantó and Auwerx, 2009). En conclusión, nuestros resultados sugieren que las vacas HNZ tienen una mayor densidad mitocondrial hepática lo cual puede traducirse en un aumento de la capacidad oxidativa y a asimismo de la producción de energía.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Cantó, C., and Auwerx, J. (2009). PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr. Opin. Lipidol.* 20, 98–105. doi:10.1097/MOL.0b013e-328328d0a4.

Casal, A., Garcia-Roche, M., Navajas, E. A., Cassina, A., and Carriquiry, M. (2018). Hepatic mitochondrial function in Hereford steers with divergent residual feed intake phenotypes. *J. Anim. Sci.* 96, 4431–4443. doi:10.1093/jas/sky285.

Drackley, J. K. (1999). Biology of Dairy Cows During the Transition Period: the Final Frontier? *J. Dairy Sci.* 82, 2259–2273. doi:10.3168/

jds.S0022-0302(99)75474-3.

García-Roche, M., Casal, A., Mattiauda, D. A., Ceriani, M., Jasinsky, A., Mastrogiovanni, M., et al. (2019). Impaired hepatic mitochondrial function during early lactation in dairy cows: Association with protein lysine acetylation. *PLoS One* 14, 1–24. doi:10.1371/journal.pone.0213780.

Kolver, E. S., Roche, J. R., De Veth, M. J., Thorne, P. L., and Napper, A. R. (2002). Total mixed ratios versus pasture diets. Evidence for a genotype x diet interaction in dairy cow performance. *Proc New Zeal Soc An* 62, 246–251.

Scarpulla, R. C. (2011). Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1813, 1269–1278. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.09.019.

Talmón, D., Garcia-Roche, M., Mendoza, A., Mattiauda, D. A., and Carriquiry, M. (2020). Energy partitioning and energy efficiency of two Holstein genotypes under a mixed pasture-based system during mid and late lactation. *Livest. Sci.* 239, 104166. doi:10.1016/j.livsci.2020.104166.

White, H. M., Donkin, S. S., Lucy, M. C., Grala, T. M., and Roche, J. R. (2012). Short communication: Genetic differences between New Zealand and North American dairy cows alter milk production and gluconeogenic enzyme expression¹. *J. Dairy Sci.* 95, 455–459. doi:10.3168/jds.2011-4598.