

## **EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES TIPO TOLL EN EL EPITELIO RUMINAL DE CABRAS DESDE EL NACIMIENTO HASTA LOS 28 DÍAS DE EDAD EN DOS SISTEMAS DE ALIMENTACIÓN**

Abecia, L., Jiménez, E., Martínez-Fernández, G., Ramos-Morales, E., Martín-García A.I. y Yáñez-Ruiz, D.R.

Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Profesor Albareda 1, 18008, Granada  
david.yanez@eez.csic.es

### **INTRODUCCIÓN**

El tracto gastrointestinal alberga una población microbiana diversa y abundante por lo que su epitelio está continuamente expuesto a la microbiota comensal, patógenos y antígenos de la dieta, formando una barrera entre el hospedador y el ambiente digestivo. El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa que impide la invasión y diseminación de los patógenos. Las células de este sistema reconocen un patrón molecular común y constante de la superficie de los microorganismos a través de los receptores reconocedores de patrones, como los receptores tipo Toll (TLRs). Estos son proteínas transmembrana altamente conservadas a través de la evolución, que desempeñan tres funciones básicas frente a la respuesta inmune innata, i) detectando la presencia y reconociendo el tipo de patógeno en función de su inmunógeno estimulador, ii) generando una respuesta instantánea frente al patógeno y iii) estimulando el desarrollo de una respuesta adaptativa permanente y más eficaz (Rakoff-Nahoum et al., 2004). Los componentes de la microbiota juegan un papel crucial en el desarrollo postnatal y activación del sistema inmune. Podrían ser de especial relevancia en las primeras etapas del desarrollo del rumen cuando se produce la colonización microbiana y se ensamblan los distintos nichos ecológicos (Malmuthuge et al., 2012). Se ha sugerido que existe una co-evolución entre la microbiota y el sistema inmune del hospedador contando ambos con similares mecanismos de diversificación y selección (Tlaskalová-Hogenová, et al., 2004). Recientemente Abecia et al. (2013) han mostrado que intervenciones nutricionales aplicadas en las primeras semanas de vida modulan la colonización microbiana del rumen en desarrollo y que, en gran medida, los efectos permanecen en el animal adulto, abriendo la posibilidad de programar el ecosistema microbiano del rumen en la fase adulta mediante la modificación de dicho ecosistema en edades tempranas. Sin embargo, se desconoce hasta qué punto el sistema inmune innato del animal determina la tolerancia de la población microbiana simbiote que se pueda establecer inicialmente en el rumen.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de los TLRs en el epitelio ruminal de cabras durante los primeros 28 días de vida criadas con dos sistemas de lactancia diferentes (maternal vs. artificial) que promovieron un patrón de colonización microbiana distinto (Abecia et al., 2014).

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se seleccionaron 24 cabras Murciano Granadinas gestantes de dos fetos. Se alojaron individualmente (1,7x1,2 m) con acceso libre al agua y alimentadas una vez al día con heno de alfalfa *ad libitum* y con 600 g/d de concentrado administrados dos veces al día. Tras el parto, uno de las crías permaneció con la madre y la otra fue inmediatamente separada y alimentada durante 2 días con calostro del grupo de madres y después con lacto-reemplazante (Sello azul, Lemansa, León). Ambos grupos tuvieron libre acceso a heno de alfalfa y concentrado desde su nacimiento. Los animales se pesaron semanalmente. Se sacrificaron grupos de 4 chotos de cada uno de los sistemas de alimentación a los 3, 5, 7, 14, 21 y 28 días de vida y se tomaron muestras del epitelio ruminal y tras el lavado con 0,01M solución de salina (pH 6,8) se guardaron con solución RNAlater (Qiagen) estabilizadora y congelaron a -80 °C. Posteriormente las muestras se homogeneizaron con el reactivo TRIzol (ambion, Madrid) siguiendo las instrucciones del fabricante para la extracción de ARN. El homogeneizado se precipitó en las columnas del kit RNeasy Mini (Qiagen), se trató con el Set RNase-Free DNase (Qiagen) y se eluyó en 50 µL de volumen. La integridad del ARN se midió en un equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent).

El ARN extraído se transcribió inversamente usando el kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen) siguiendo el protocolo del fabricante. El ARN se usó como molde para la evaluación por PCR cuantitativa de la expresión de los genes que codifican los 10 tipos de

TLR descritos para bovino en el epitelio ruminal usando cebadores específicos (Charavaryamath et al., 2011) y empleando como gen de referencia la  $\beta$ -actina (Malmuthugea et al., 2012) Se amplificaron 25 ng de cDNA con cada par de cebadores usando los siguientes parámetros: 55 °C durante 2 minutos para eliminar los restos de dUTP, 95 °C durante 8,5 minutos, después 45 ciclos de 95 °C durante 15 segundos; 58 °C durante 30 segundos; y 72 °C durante 30 segundos en un equipo Bio-Rad iCycler (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, ON). Los datos de amplificación se expresaron como cambios en el ciclo umbral ( $\Delta$ Ct) y se calcularon de la siguiente manera: ( $\Delta$ Ct = ciclo umbral del gen de interés – ciclo umbral de la  $\beta$ -actina). Un menor valor de  $\Delta$ Ct significa un transcrito más abundante. Los datos de expresión génica y los cambios relacionados con la edad y el sistema de alimentación fueron analizados usando el procedimiento mixto de SAS (versión 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El peso de los animales en el momento del sacrificio a 28 días de edad fue superior ( $P = 0.002$ ) en el grupo NAT en comparación con los animales en ART (8,1 vs 6,1 kg;  $P=0,002$ ). Este incremento de peso se puede relacionar con la presencia o ausencia de la madre con los lactantes más que con las diferencias en la composición de la leche, ya que se ha observado que la presencia de animales adultos con animales lactantes estimula el aprendizaje alimenticio (De Paula Viera et al., 2012), lo que deriva en mayor consumo de dieta sólida y mayor crecimiento. El nivel de expresión más bajo se obtuvo para los TLRs 2 y 5 mientras que el TLR6 fue el que mostró una mayor abundancia de ARNm (Tabla 1). Se observó un efecto en la expresión de algunos genes debido a la edad: los días 3 y 5 se detectaron unas abundancias de ARNm significativamente menores de los TLRs 2, 8 y 10, después se produjo un incremento y posteriormente una estabilización a partir del día 14. El patrón de expresión de los TLRs puede explicarse como un aumento inicial, en respuesta al incremento en la biomasa bacteriana del rumen que se produjo a partir del día 5 (Abecia et al., 2014), y un posterior descenso como adaptación del animal para evitar una respuesta inflamatoria continua y patológica de la mucosa ruminal (Malmuthuge et al., 2012).

**Tabla 1.** Efecto de la alimentación (A) y la edad (E) en la expresión génica de los 10 TLRs en el epitelio ruminal de cabras a lo largo del primer mes de vida.

A	Edad	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6	TLR7	TLR8	TLR9	TLR10
Natural	3	11,5	23,9	12,0	9,64	22,3	9,95	10,8	15,0	11,8	17,0
	5	11,5	24,2	12,8	10,5	24,0	9,58	11,2	14,9	12,2	16,6
	7	10,1	18,9	10,9	9,32	23,9	8,76	9,12	11,7	10,3	14,3
	14	11,4	20,4	10,9	10,6	25,2	8,61	12,4	12,7	13,2	15,0
	21	11,3	ND	11,9	10,7	23,7	10,4	12,6	13,1	11,3	15,2
	28	11,9	19,6	10,7	10,3	22,2	9,07	9,71	13,1	10,5	15,7
Artificial	3	10,5	24,8	10,5	9,9	20,8	8,59	10,9	14,5	11,5	16,5
	5	10,6	24,7	10,9	10,2	20,9	8,88	10,9	14,1	12,2	16,8
	7	11,1	19,9	11,4	10,2	23,7	8,86	10,5	13,4	11,5	15,9
	14	11,6	18,9	11,9	10,7	22,6	9,01	10,3	13,5	11,2	15,8
	21	11,3	ND	10,7	10,2	23,0	9,23	10,6	13,2	11,1	16,2
	28	11,6	20,2	10,7	10,4	23,2	9,43	10,6	13,9	11,4	15,7
	SED	0,64	1,12	0,92	1,10	1,38	0,61	1,82	1,12	1,49	0,83
P-valor	A	0,47	0,49	0,13	0,82	0,023	0,078	0,609	0,41	0,87	0,101
	E	0,081	<0,0001	0,39	0,51	0,06	0,15	0,54	0,0208	0,52	0,0108
	A x E	0,18	0,62	0,099	0,85	0,16	0,066	0,49	0,43	0,56	0,29

ND: No detectado;

El TLR2 juega un papel importante en la respuesta del hospedador a los componentes de la pared celular de bacterias patógenas Gram positivas y levaduras. Aunque la expresión de este TLR fue de las más bajas, se han descrito funciones de los TLRs 1, 6 y 10 para formar heterodímeros con TLR2 aumentando la especificidad por sus ligandos (Akira et al., 2006) aunque también funciona de manera independiente (Ozinsky et al., 2000). Esto sugiere que

las variaciones observadas a lo largo del crecimiento del animal en la población bacteriana pueden representar variaciones en los ligandos bacterianos con un papel importante tanto en la modulación de la expresión de los TLRs como en la respuesta inmune innata. Las diferencias observadas con la edad en la expresión del TLR10 pueden indicar la variación en la maduración del tejido ruminal de los animales, ya que una mayor expresión de TLR10 puede ser importante en el desarrollo temprano del sistema inmune. El único TLR que vio afectada su expresión por efecto del manejo alimenticio fue el 5, que reconoce flagelinas (Hayashi *et al.*, 2001), el principal componente del flagelo de las bacterias y un factor de virulencia. La estructura de la población de bacterias que colonizaron el rumen de las crías fue muy distinta entre la lactancia natural y artificial a partir del día 5 y esta diferencia se incrementó hasta el último muestreo (Abecia *et al.*, 2014). Sin embargo, este patrón distinto de colonización solo se tradujo en diferencias en el nivel de expresión TLR5 ( $P=0,02$ ). Estos resultados sugieren que la actividad de los TLRs responde al incremento de la biomasa bacteriana que coloniza el rumen a lo largo de su desarrollo, ejerciendo un mecanismo regulatorio para mantener un equilibrio entre la mucosa y el sistema inmune. Se ha descrito, en animales gnotobioticos que los componentes de la microbiota inducen en el intestino una respuesta inflamatoria "fisiológica" seguida por una respuesta equilibrada y controlada (self-limiting response) (Tlaskalová-Hogenová, *et al.*, 2004). De ser así, modulaciones inducidas en cuanto al tipo de microbiota que coloniza el rumen no sería rechazado por el sistema inmune innato después de estos primeros 5-10 días de coexistencia, lo que apoyaría la posibilidad de 'programar' el ecosistema microbiano del rumen en edades tempranas. Nuestro grupo trabaja en la actualidad en confirmar estos resultados en rumiantes y en relación a la población epimural del rumen, que tiene una composición y actividad metabólica diferenciada de la asociada a la digesta y fracción líquida (Zhou *et al.*, 2012).

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abecia, L., *et al.* 2013. *J. Anim. Sci.* 1. 4832-4840
- Abecia, L., *et al.* 2014. *Anim. Prod. Sci.* 54, 1449-1454.
- Akira *et al.* 2006 *Cell* 124: 783-801.
- Charavaryamath C. *et al.* 2011. *Gut Microbes* 2: 134-144
- De Paula Vieira A, *et al.* 2012. *J. Dairy Sci.* 95: 3218-3224.
- Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004. *Cell* 118: 229-241
- Hayashi F, *et al.* 2001. *Nature* 410: 1099-1103
- Hemmi, H. *et al.* 2002. *Nature Immunol.* 3: 196-200.
- Malmuthuge, N, *et al.* 2012. *Vet. Immunol. Immunopat.* 146: 18-16.
- Ozinsky A, *et al.* 2000. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13766-13771.
- Tlaskalová-Hogenová H *et al.*, 2004. *Immunol Lett.* 93:97-108.
- Zhou L. *et al.* 2012 *Vet. Microbiol.* 155: 72-80.

**Agradecimientos:** Este trabajo ha sido financiado por el CSIC (Proyecto Intramural, CSIC 201440E048).

#### GENE EXPRESSION OF TOLL-LIKE RECEPTORS IN THE RUMEN OF GOAT KIDS FROM BIRTH TO 28 DAYS OLD IN TWO FEEDING MANagements

**ABSTRACT:** The aim of this work was to evaluate the effect of feeding management and subsequent microbial colonization pattern during the first month of life on the expression of toll-like receptors (TLRs) in the rumen epithelium. Twenty four pregnant goats carrying two fetuses were selected. At birth one kid was taken immediately away from the doe and fed milk replacer (ART) while the other remained with the mother (NAT). Groups of four kids (from ART and NAT experimental groups) were slaughtered at 3, 5, 7, 14, 21 and 28 days of life. On the sampling day, epithelial tissue was collected from rumen wall. Expression TLRs 2, 8 and 10 were lower at day 3 and 5 compared to the other sampling days. Only TLR5 showed different level of expression according to the feeding system, presenting higher mRNA abundance in ART group. These results suggest that the expression of TLRs is related to the rumen development process and bacterial biomass colonization and co-evolve with the commensal microbiota that colonizes after birth. We hypothesize that there might be a stronger link between TLRs activity and the epimural microbial community, which is currently being investigated.

**Keywords:** Toll-like receptors, rumen, early life, goat kids, innate immunity