

ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA DE VACAS RESISTENTES A LA DEPRESIÓN DE LA GRASA LÁCTEA

Siurana, A.¹, Gallardo, D.², Calsamiglia S.¹ y Cánovas A.³

¹Departament de Ciència Animal i dels Aliments; ²Servei Veterinari de Genètica Molecular;

³Departament de Genètica Animal, Centre de Recerca en Agrigenòmica (CSIC-IRTA-UAB-UB); ^{1,2,3}Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, España.

Sergio.Calsamiglia@uab.cat

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el consumidor ha desarrollado un interés creciente en el consumo de alimentos con actividades funcionales, como los productos enriquecidos con grasas omega-3 o ácido linoleico conjugado (CLA) (Parodi, 2004). En condiciones naturales, casi todo el CLA dietario procede del consumo de productos lácteos y cárnicos derivados de rumiantes (Ritzenthaler *et al.*, 2001). La biohidrogenación de ácidos grasos poliinsaturados en el rumen resulta en la acumulación de ácido vaccénico (*trans*-11 C18:1) en el rumen y la producción de CLA en la glándula mamaria. Sin embargo, bajo ciertas condiciones dietarias, las vías de la biohidrogenación ruminal se alteran y se producen ácidos grasos *trans*-10 que son potentes inhibidores de la síntesis de la grasa láctea con importantes implicaciones económicas (Bauman y Griinari, 2001). Durante la depresión de la grasa láctea (DGL) se ha observado que se produce una modificación en la expresión de varios genes implicados en las vías metabólicas relacionadas con la síntesis de grasa (Harvatine y Bauman, 2006; Kadegowda *et al.*, 2009; McFadden y Corl, 2010). Sin embargo, algunos animales no muestran la DGL con una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados.

Los objetivos de este estudio fueron: 1) Analizar el transcriptoma de animales resistentes y sensibles a la DGL 2) Identificar las rutas metabólicas y reguladores que están compensando la DGL en animales resistentes bajo diferentes condiciones dietarias (sin grasa suplementada o enriquecida con ácidos grasos poliinsaturados).

MATERIAL Y MÉTODOS

El conjunto de vacas de una granja comercial fueron sometidas de forma consecutiva a una dieta control (sin grasa suplementada) o suplementada con lino extrusionado (fuente de ácidos grasos poliinsaturados). En función del contenido en grasa de la leche se seleccionaron 4 vacas: 2 sensibles a la DGL y 2 resistentes a la DGL (Figura 1). La cantidad de grasa fue analizada mediante espectroscopia del infrarrojo cercano (NIRS). Después de 21 días de adaptación a ambas dietas se recogieron muestras de leche para los análisis de *RNA-Sequencing* y perfil de ácidos grasos de cadena larga en leche. Se extrajeron 100 ml de leche de 2 cuarterones para el análisis de *RNA-Sequencing*. Para el análisis de los ácidos grasos de cadena larga se recogieron muestras de leche representativas de un ordeño y se analizaron mediante cromatografía de gases. Las muestras para *RNA-Sequencing* se conservaron en hielo hasta el momento de extracción de células y se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos a 7°C para obtener el pellet de células somáticas. La extracción de ARN se realizó utilizando el método Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). La calidad del ARNm se evaluó a partir del número de integridad de RNA (RIN), obteniendo valores entre 7-9, indicando una buena calidad. Las muestras se secuenciaron mediante la tecnología *RNA-Sequencing* con la plataforma HiSeq2000 (Illumina, Inc). Las lecturas *paired-end* (100 pb) fueron mapeadas y anotadas de acuerdo al genoma de referencia bovino *Bos taurus* 4.6.1 utilizando *TopHat* 2.0.7 y *Bowtie2* 2.0.6. Los datos fueron normalizados calculando las lecturas por kilobase por cada millón de lecturas mapeadas (FPKM) para cada gen utilizando el paquete *Cufflinks* 2.0.2. Para realizar el análisis funcional e identificar las rutas metabólicas afectadas en la lista de genes diferencialmente expresados (FPKM>0,2; p-value<0,01 y Fold-change>2), se utilizó el software Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen, Silicon Valley, CA, EE.UU.).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los animales sensibles a la DGL alimentados con lino mostraron una disminución de la grasa láctea, un incremento del ratio de ácidos grasos insaturados/saturados (de 41/59 a 45/55) así como una disminución de la proporción de ácidos grasos de cadena corta y media (AGCM) (C4 a C14 y el 50 % de C16; AGCM; de 33,9 a 32,8%) comparado con la dieta

control, indicando una disminución de la síntesis de ácidos grasos cuando los animales estaban alimentados con lino. Por lo contrario, los animales resistentes a la DGL alimentados con lino, mostraron un incremento de la grasa láctea y del ratio de ácidos grasos insaturados/saturados (de 35/65 a 39/61). Además, no se observaron cambios en la proporción de AGCM (31,4%) sugiriendo que estos animales eran resistentes a la DGL. El análisis de expresión diferencial entre los animales sensibles a la DGL vs. Resistentes a la DGL permitió detectar un elevado número de genes diferencialmente expresados (DE) en ambas dietas (Figura 1). Además, se identificaron 726 genes DE entre dietas en los animales resistentes a la DGL mientras que se identificaron únicamente 38 en los animales sensibles a la DGL (Figura 1). Estos resultados sugieren que las vacas resistentes a la DGL podrían estar activando un mecanismo compensatorio para aumentar la síntesis de ácidos grasos en presencia de lino.

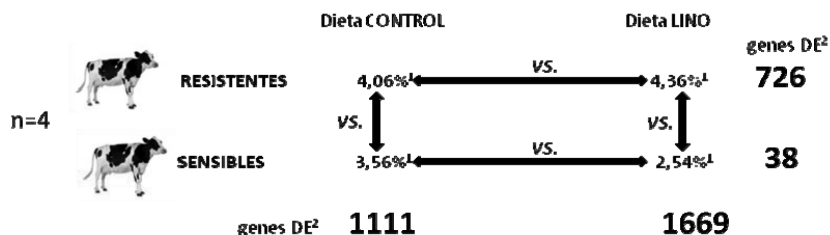


Figura 1. Número de genes diferencialmente expresados en las diferentes comparaciones realizadas en este estudio. ¹Contenido en grasa láctea. ²diferencialmente expresados

En este contexto, el análisis de las rutas metabólicas evidenció que los genes DE entre dietas en los animales resistentes a la DGL están involucrados en la ruta de síntesis y oxidación de ácidos grasos, observando una sobre-regulación de estos genes en los animales con la dieta lino (Tabla 1).

Tabla 1. Rutas metabólicas afectadas significativamente ($P < 0,01$) en animales Resistentes-DGL alimentados con lino.

Ruta metabólica	Genes, n	genes diferencialmente expresados, %	Tipo Regulación
Activación de TR/RXR	92	70,7	↑
Activación de PPAR α /RXR α	184	75,6	↑
Señalización de IGF-1	99	90,9	↑
Señalización de PI3K/AKT	128	88,3	↑
Señalización de AMPK	149	74,5	↑
Señalización de PPAR	94	79,8	↑

La Tabla 2 muestra una representación de los factores de transcripción y genes reguladores más significativos asociados al metabolismo lipídico, síntesis de ácidos grasos y adipogénesis que están actuando como reguladores en las rutas metabólicas sobre-expresadas en este estudio. Entre ellos, se encuentra el factor de transcripción *PPARA* que regula la expresión de 22 genes (p.e. *ACACA* y *FBP3*, relacionados con la síntesis de ácidos grasos). El gen *PPARA* es un factor de transcripción y un importante regulador del metabolismo de los lípidos, activando la regulación de los genes involucrados en el transporte de los ácidos grasos, la deposición de la grasa y la β -oxidación (Kersten *et al.*, 2014). Además, el gen *PPARG* (otro miembro de la familia PPAR) se ha identificado como regulador de 27 genes (Tabla 2). El gen *PPARG* regula el almacenamiento de ácidos grasos y el metabolismo de la glucosa. Los genes activados por *PPARG* estimulan la captación de lípidos y la adipogénesis por las células adiposas.

Los resultados preliminares sugieren profundizar en el estudio de las variantes estructurales presentes en el transcriptoma, ya que los animales resistentes a la DGL podrían estar activando un mecanismo compensatorio para aumentar la síntesis de ácidos grasos en presencia de lino evitando la reducción de la producción de grasa láctea.

Tabla 2. Factores de transcripción (FT) / Reguladores y genes regulados en animales resistentes a la DGL alimentados con lino.

FT/Regulador	Expresión	Genes regulados
FOXO3	x 6,3	↑SLC7A1, ↑CDH1, ↑CLDN1, ↑MKI67, ↑APAF1, ↑TNFSF10, ↓JUNB, ↓FOS
KRAS	x 2,8	↑ABCA1, ↑VCAN, ↑MX2, ↑HYOU1, ↑ABCC4, ↑REST, ↑BCL2, ↑CDH1, ↑AHR, ↑OAS1, ↑SMPD3, ↑CASP2, ↑BMI1, ↑THBS1, ↑PLD1, ↓GZMK, ↓IRF9, ↓FOS, ↓TESC, ↓CXCL8, ↓UPP1, ↓IER3, ↓IL1B, ↓LAMB3
MTOR	x2,4	↑PRKAR2A, ↑BCL2, ↑CDH1, ↑AKAP13, ↑OAS1, ↑ACACA, ↑ST6GAL1, ↑TNFSF10, ↓RPL32, ↓TCEB2, ↓FADD, ↓MUC1
RXRA	x 1,8	↑ABCA1, ↑ACACA, ↑BRCA1, ↓CYP26A1, ↓FABP3, ↓FOS, ↓GCK, ↓GPD1
PPARA	x 1,6	CCNT1, ABCA1, TPP1, ↑MASP2, ↑GPD2, ↑SMC2, ↑MKI67, ↑STIM1, ↑ACACA, ↑ZNF236, ↑KIF20A, ↓EDN1, ↓NCF1, ↓FOS, ↓GPD1, ↓SERINC2, ↓LAMB3, ↓PAH, ↓FABP3, ↓G0S2, ↓CSN2, ↓GCK
PPARG	x 1,3	↑ABCA1, ↑HYOU1, ↑CDH1, ↑LNPEP, ↑TGFB1, ↑MKI67, ↑STIM1, ↑BRCA1, ↑HK2, ↑ACACA, ↑TNFSF10, ↓EDN1, ↓NCF1, ↓DGAT2, ↓CXCL8, ↓GPD1, ↓CCL5, ↓IL1B, ↓LAMB3, ↓KRT19, ↓FABP3, ↓CYP26A1, ↓IL9, ↓MUC1, ↓CXCL2, ↓CSN2, ↓GCK
VEGFA	x 1,2	↑SLC12A6, ↑RASGRP3, ↑BCL2, ↑E2F3, ↑PPAP2B, ↑THBS1, ↑ITGB1, ↑CEACAM1, ↓MRPL23, ↓EDN1, ↓JUNB, ↓CCRL2, ↓FOS, ↓CXCL8
SREBF1	x 1,08	↑ABCA1, ↑PDPK1, ↑PCYT1A, ↑BCL2, ↑HK2, ↑ACACA, ↑LPIN1, ↑HSPA13, ↓IL1B, ↓PTGDS, ↓GCK

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bauman, D.E. & Griinari J.M. 2001. *Livest. Prod. Sci.* 70:15-29 • Harvatine, K.J. & Bauman D.E. 2006. *J. Nutr.* 136:2468-2474 • Kadegowda, A. K. *et al.* 2009. *J. Dairy Sci.* 92(9):4276-4289 • Kersten, S. 2014. *Molecular Metabolism.* 3:354-371 • McFadden, J.W. y Corl, B.A. 2010. *J. Dairy Sci.* 93(10):4651-4658 • Parodi. 2004. *Aust. J. Dairy Technol.* 59:3-59 • Ritzenthaler, K.L. *et al.* 2001. *J. Nutr.* 131:1548-1554.

TRANSCRIPTOME PROFILE IN COWS RESISTANT TO MILK FAT DEPRESSION

ABSTRACT: Feeding linseed to dairy cows results in milk fat depression (MFD), but there is a wide range of sensitivity, i.e. from cows not showing any reduction in milk fat to cows having a strong MFD. The objective of this study was to compare the mRNA expression of transcripts expressed in milk somatic cells in cows resistant or sensitive to MFD. Four cows were selected from a dairy farm after a switch from a control diet to a linseed-rich diet: two cows (R-MFD) were resistant to MFD showing high milk fat content in both control (4.06%) and linseed-rich diet (4.36%) (R-MFD); and two cows (S-MFD) were sensitive to MFD decreasing milk fat content after the change into the linseed diet (3.56 to 2.54 %). Fresh milk samples were collected from each cow the week before and two weeks after the diet change. Transcriptome analysis was performed using RNA-Sequencing technology with a HiSeq2000 platform. Results showed an overexpression in genes and pathways related to fatty acid synthesis and lipid metabolism such as a TR/RXR and PPARα/RXRα Activation pathways. Also, several genes and transcription factors such as *FOXO3*, *MTOR*, *PPARA*, *PPARG* and *SREBF1* were identified acting as key regulators in R-MFD cows with linseed-rich diet suggesting the possibility to select cows resistant to MFD. Also, the study of the structural variation in the whole transcriptome of S-MFD and R-MFD cows will contribute to the better understanding of molecular mechanisms affecting the MFD in cows.

Keywords: Milk fat depression, fatty acid synthesis, RNA-Sequencing, mRNA expression