

ESTUDIO DEL PERFIL TRANSCRIPCIONAL DE GENES IMPLICADOS EN EL METABOLISMO DE LOS ÁCIDOS GRASOS DE LA LECHE EN DOS RAZAS OVINAS.

Suárez-Vega, A., Gutiérrez-Gil, B. y Arranz, J.J.

Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 León. E-mail del autor responsable asuav@unileon.es

INTRODUCCIÓN

La producción mundial de leche de oveja es de unos 10 millones de toneladas anuales siendo la cuarta en importancia. España se sitúa como el séptimo productor mundial de leche de oveja (FAOSTAT, 2012), siendo la comunidad de Castilla y León la que genera un 70% de esta producción láctea (352.501.000 litros en 2011) (MAGRAMA, 2015). En general, la leche de oveja es procesada para la elaboración de productos lácteos, principalmente queso. Desde este punto de vista, el porcentaje de sólidos totales en leche o extracto quesero (grasa y proteína) adquiere una importancia relevante. La síntesis de lípidos en leche tiene especial interés debido a su influencia en el procesado y en las propiedades organolépticas que confieren al queso. Por ello, el conocimiento de los genes que desempeñan un papel relevante en la síntesis de grasa de la leche y de las variaciones en cuantitativas y cualitativas de los mismos a lo largo de la lactación en el ganado ovino, presentan un especial interés en la mejora de la producción lechera de dicha especie. Recientemente, las técnicas de secuenciación masiva paralela de RNA (RNA-seq) nos han permitido comparar los niveles de expresión génica entre distintos grupos de individuos y tejidos (Mortazavi et al., 2008; Wang et al., 2009). Para este estudio se han obtenido datos de RNA-seq de 8 animales pertenecientes a dos razas ovinas lecheras, Assaf y Churra, de las cuales se han tomado muestras de leche a lo largo de la lactación, en concreto los días 10, 50, 120 y 150 después del parto. Estas razas difieren en el porcentaje total de grasa en leche, un 6,65 % en Assaf y un 7,01 % en Churra (MAGRAMA, 2015). El metabolismo lipídico en la glándula mamaria puede subdividirse en: (i) captación de ácidos grasos del torrente circulatorio, (ii) síntesis *de novo* y desaturación de ácidos grasos y (iii) esterificación y secreción de la grasa mamaria. El número de genes que intervienen en estos procesos es elevado y sus interacciones complejas, para este trabajo inicial hemos analizado el perfil de expresión de 7 genes (*VLDLR*, *LPL*, *ACACA*, *FASN*, *SCD1*, *BTN1A1* y *XDH*) con influencia (Bionaz y Loor, 2008) en cada uno de los distintos procesos del metabolismo lipídico de la glándula mamaria a lo largo de la lactación en dos razas ovinas (Churra y Assaf).

MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se han utilizado muestras procedentes de 8 ovejas libres de mamitis y sometidas a la misma dieta, 4 ovejas de raza Assaf y 4 ovejas de raza Churra. De cada animal se recogieron 50 ml de leche los días 10, 50, 120 y 150 de lactación. Las muestras fueron recogidas una hora después del ordeño de las 8 de la mañana, coincidiendo con el punto de máxima concentración de células somáticas en leche, según lo expuesto por Gonzalo et al. (1994). El RNA se extrajo a partir de 50 ml de leche siguiendo el protocolo descrito por Wickramasinghe et al. (2012), con ciertas modificaciones. La integridad del RNA (valor RIN) se analizó utilizando el *Bioanalyzer Agilent 2100* (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA). Los valores de RIN de las muestras de RNA oscilaron entre 7 y 9. Las genotecas de RNA de extremos pareados (*paired-end libraries*) con fragmentos de 300 pb se crearon con el kit *True-Seq RNA-Seq simple preparation v2* (Illumina, San Diego, CA, USA). Los fragmentos fueron secuenciados en el CNAG en un secuenciador *Illumina Hi-Seq 2000*, generando lecturas *paired-end* de 75 pb.

El control de calidad de los datos brutos de secuenciación se realizó utilizando el programa *FastQC* (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Las lecturas fueron mapeadas contra el genoma ovino. (OAR v.3.1) utilizando el programa *STAR_2.3.0e* (Dobin et al., 2013). El paquete bioinformático *Cufflinks* (Trapnell et al., 2010) se utilizó para ensamblar las lecturas mapeadas y crear un archivo de anotación de referencia. La cuantificación del número bruto de lecturas por gen se llevó a cabo utilizando el programa *SigCufflinks* (<http://www.siggenae.org>).

El paquete de R *DESeq2* (Love et al., 2014), fue utilizado en el análisis de expresión diferencial. Nuestro experimento, está compuesto por 2 razas de animales (Churra y Assaf) y cuatro días diferentes de muestreo para cada grupo (Día 10, Día 50, Día 120 y Día 150).

Para el análisis de la expresión diferencial se utilizó el siguiente modelo: $Y = raza + día + (raza \times día) + error$. Una vez realizado el análisis con la función DESeq, se extrajeron los recuentos normalizados para los genes de interés con la función *plotCounts*. Para cada grupo de réplicas biológicas, se calculó la media, desviación estándar y error estándar para cada uno de los genes analizados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El nivel de expresión de los genes analizados es muy variable a lo largo de los diferentes momentos de la lactación. Ninguno de los genes seleccionados muestra diferencias significativas al comparar las distintas razas o los distintos puntos de lactación. Cuando nos fijamos en el perfil transcripcional de los genes analizados (Figura 1), podemos ver que, en general, la expresión en la raza Churra es ligeramente superior que en Assaf. Aunque cabe resaltar que la variabilidad entre los animales de raza Churra es también superior que entre las réplicas biológicas de la raza Assaf. La lipoproteína-lipasa (*LPL*) y el receptor de lipoproteína de muy baja densidad (*VLDLR*) están implicados en la captación de los ácidos grasos por la glándula mamaria. El *LPL* se expresa más que el *VLDLR* e incrementa su expresión a lo largo de la lactación. El gen *ACACA*, *FASN* y *SCD1* están relacionados con la síntesis *de novo* y la desaturación de ácidos grasos. Al igual que ocurre en el ganado bovino (Wickramasinghe et al., 2012), el gen *ACACA* tiene una expresión muy baja en relación con el gen *FASN*, sin embargo, ambos tienen un perfil de expresión paralelo. La expresión del *SCD1* aumenta progresivamente a lo largo de la lactación. La butirofilina (*BTN1A1*) y la Xantina deshidrogenasa (*XDH*) son proteínas implicadas en la formación del glóbulo graso (Bionaz y Loo, 2008). En el caso del ganado bovino la expresión de estos genes es muy elevada al inicio de la lactación y luego decrece (Wickramasinghe et al., 2012). En la oveja, en el caso de la *BTN1A1* se produce un incremento progresivo a lo largo de la lactación, la *XDH* se mantiene más o menos constante incrementándose ligeramente al final.

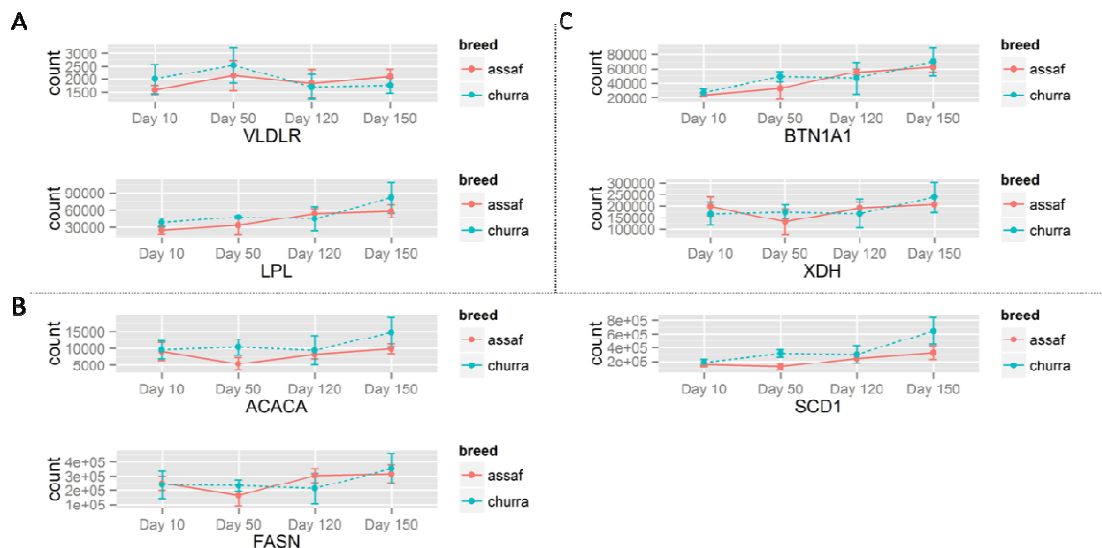


Figura 1. Perfiles de expresión de los genes implicados en el metabolismo lipídico de la glándula mamaria durante la lactación.

En general, la mayoría de los genes analizados incrementan su expresión a lo largo de la lactación, al contrario de lo descrito en el ganado bovino en la que la mayoría de los genes muestran su mayor expresión al inicio de la misma (Wickramasinghe et al., 2012). Como se puede observar en la figura 2, los tres genes con mayor expresión son *FASN*, *SCD1* y *XDH*. *FASN*, que codifica para la ácido graso sintasa, está implicado en la producción de ácidos grasos *de novo* y es el gen más expresado al comienzo de la lactación en las dos razas. La esteroil-CoA desaturasa 1 (*SCD1*), es la principal encima implicada en la biosíntesis de ácidos grasos mono-insaturados en rumiantes (Ntambi y Miyazaki, 2004). El *SCD1*, es el gen más expresado al final de la lactación en ambas razas, siendo también el gen más expresado en Churra los días 50 y 120 de lactación. En la glándula mamaria de rumiantes,

este gen se encarga de la producción de cerca del 80% de la forma más común de ácido linoleico conjugado (CLA, isómero cis-9, trans-11, C18:2) (Corl et al., 2001). Está demostrado que el consumo de ácidos linoleicos conjugados es beneficioso para la salud humana por sus propiedades anti-carcinogénicas, anti-lipogénicas e inmunomoduladoras (Pariza et al., 1999). La elevada expresión de la esteroil-CoA desaturasa en la glándula mamaria de las ovejas de raza Churra podría estar relacionada con una mayor concentración de CLA y, por lo tanto, con una leche potencialmente más saludable.

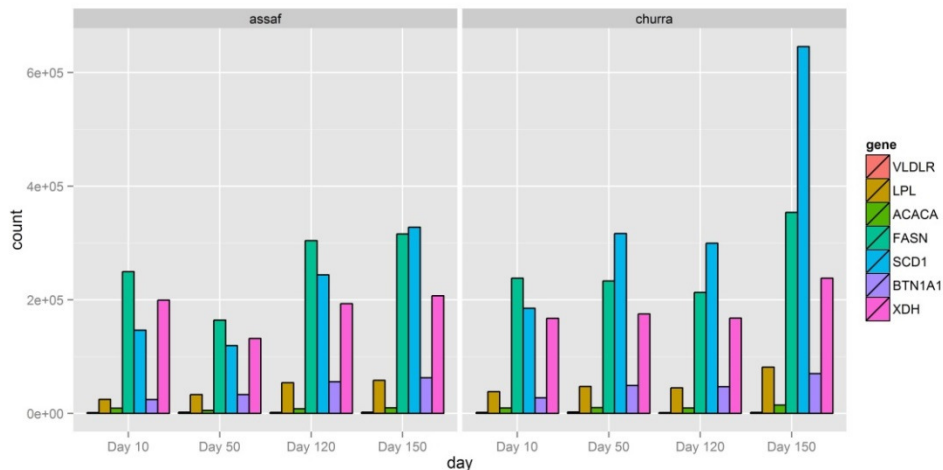


Figura 2. Recuentos normalizados de los genes implicados en el metabolismo lipídico de la glándula mamaria durante la lactación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bionaz, M. & Looor J.J, 2008. BMC Genomics. 9:366-2164-9-366.
- Corl, B.A. et al., 2001. J Nutr Biochem. 12(11):622-630.
- Dobin, A. et al., 2013. Bioinformatics. 29(1):15-21.
- Gonzalo, C. et al., 1994. J Dairy Sci. 77(7):1856-1859.
- Love, M.I. et al., 2014. Genome Biol. 15(12):550.
- Mortazavi, A. et al., 2008. Nat. Methods. 5(7):621-628.
- Ntambi, J.M. & Miyazaki, M., 2004. Prog. Lipid. Res. 43(2):91-104.
- Pariza, M.W. et al., 1999. Toxicol. Sci. 52(2 Suppl):107-110.
- Trapnell, C. et al., 2010. Nat. Biotechnol. 28(5):511-515.
- Wang, Z. et al., 2009. Nat. Rev. Genet. 10(1):57-63.
- Wickramasinghe, S. et al., 2012. BMC Genomics. 13:45-2164-13-45.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2012-34437 del Ministerio de Economía y Competitividad. B. Gutierrez-Gil es investigadora contratada a través del programa "Ramón y Cajal" del Ministerio de Economía y Competitividad.

STUDY OF THE TRANSCRIPTIONAL PROFILE OF GENES REALTED TO THE MAMMARY GLAND FAT METABOLISM IN TWO OVINE BREEDS.

ABSTRACT: Sheep milk ranks the fourth position in terms of global milk production from different species. Most of the world's sheep milk is processed into dairy products, mostly cheese. Milk lipid synthesis as well as fatty acid esterification and milk fat secretion have a special interest due to their influence in manufacturing and organoleptic properties in dairy products. In this study we performed a RNA-seq analysis in two different dairy sheep breeds in order to evaluate the transcriptional profile of some genes implicated in the mammary gland fat metabolism along lactation. The selected genes are: *LPL* and *VLDL*, implicated in the fatty acid uptake from blood; *ACACA*, *FASN* and *SCD*, implicated in de novo synthesis and fatty acid desaturation; *BTN1A1* and *XDN* implicated in lipid droplet formation. None of the genes evaluated is significantly differentially expressed between the two breeds nor along lactation, but we can see changes in the expression profile. Mostly all of the genes analyzed increased their expression along lactation. *SCD1*, *ACACA* y *XDH* were the most abundant key genes measured, appearing to be key genes in milk fat metabolism.

Keywords: sheep, RNAseq, milk, fat metabolism.