

# **EFFECTO DEL ESTRÉS TÉRMICO POR CALOR EN EL PERFIL TRANSCRIPTÓMICO DE CÉLULAS SANGUÍNEAS EN CABRAS LECHERAS A MITAD DE LACTACIÓN**

Contreras-Jodar, A.<sup>1</sup>, Salama, A.A.K.<sup>1,2</sup>, Hamzaoui, S.<sup>1</sup>, Caja, G.<sup>1</sup>, Vailati-Riboni, M.<sup>3</sup> y Llor, J.J.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Grup de Recerca en Remugants (G2R), Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, España. <sup>2</sup>Animal Production Research Institute, Dokki, Egipto. <sup>3</sup>Mammalian NutriPhysioGenomics, University of Illinois, Urbana, EEUU.  
ahmed.salama@uab.cat

## **INTRODUCCIÓN**

El cambio climático es evidente y los modelos de IPCC (2013) predicen que a finales del siglo XXI se incrementará la temperatura media anual entre 3 y 10°C. Bajo alta temperatura y humedad ambiental, la capacidad de los animales de disipar el calor se reduce, causando un incremento en su temperatura corporal y estrés por calor (EC). Los animales de granja tendrán que enfrentarse a una mayor frecuencia, intensidad y duración de olas de calor que afectarán negativamente su salud, bienestar y desarrollo (Salama et al., 2016). El calor ambiental junto con la humedad favorece la supervivencia de vectores de enfermedades, por lo que los animales estarán más expuestos a sufrir enfermedades. Además, parece que existe una correlación entre el EC y una menor respuesta inmune en animales lecheros (Thompson et al., 2014). El objetivo del presente estudio es evaluar la respuesta en la expresión génica de las células sanguíneas y conocer las rutas biológicas afectadas por EC en cabras lecheras que permitiría ayudar a entender los mecanismos de la respuesta inmune y establecer nuevas estrategias para mejorar la salud animal bajo EC.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

Un total de 8 cabras lecheras multíparas de raza Murciano-Granadina a mitad de lactación (43,3 ± 1,6 kg PV; 2,00 ± 0,04 l/d; 81 ± 3 d en lactación) se dividieron en dos grupos balanceados de 4 y se alojaron en cámaras metabólicas bajo dos condiciones climáticas diferentes (temperatura, °C; humedad, %) durante 35 días: 1) termo-neutral (TN: 15-20°C, 40-45%, índice temperatura-humedad (THI) = 59 a 65), y 2) estrés por calor (EC: 12 h a 37°C-40%, 12 h a 30°C-40%, THI = 86 y 77, respectivamente).

Para el análisis de expresión génica, se tomaron muestras de sangre el día 35 utilizando vacutainers de 10 ml con EDTA (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ) y conservados en hielo. El RNA se extrajo inmediatamente utilizando RiboPure-Blood Kit (Thermo Fisher Scientific, Madrid, Spain). El RNA extraído se congeló a -80°C hasta su posterior análisis. Se utilizaron chips de microarrays de Affymetrix GeneChip Bovine Genome Array y 3' IVT Express Kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) según las instrucciones del fabricante. Los arrays fueron escaneados mediante Affymetrix GeneChip Scanner 3000 y las imágenes cuantificadas por Affymetrix GeneChip Operating Software.

El análisis bioinformático y estadístico de los datos se realizó con R (versión 3.0.3). Los perfiles de expresión génica (format CEL) se convirtieron en valores de expresión mediante la función Microarray Suite 5.0 (MAS5) del paquete estadístico Affy (Gautier et al., 2004). Se corrigió el fondo de los datos crudos y se normalizó mediante transformación por log<sub>2</sub>. Se corrió el algoritmo Absent/Present del paquete Affy y los genes con niveles de expresión dudosa se excluyeron. La selección de los genes diferencialmente expresados se obtuvo realizando una comparación de medias por T Student para cada gen entre los grupos TN y EC. El índice de falsos descubrimientos se controló con el procedimiento Benjamini-Hochberg ( $P < 0,05$ ). La identificación de las sondas de Affymetrix y sus respectivos FC y FDR p-valores se sometieron a un análisis funcional mediante el software Dynamic Impact Approach (DIA; Bionaz et al., 2012) junto con la Enciclopedia de Kyoto de Genes y Genomas (KEGG). Los resultados obtenidos por DIA se basan en el impacto calculado y la dirección del

impacto (ej. subexpresado o sobreexpresado) de los genes diferencialmente expresados en las rutas biológicas. De este modo, el cambio en el flujo de una ruta se determina mediante el cambio significativo y la magnitud de las proteínas relacionadas en una ruta determinada. Para el presente análisis, se usaron los ajustes estándar del DIA (mínimo 4 genes en una ruta y cobertura mínima del 20%).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De un total de 24.128 sondas, después del proceso de filtración, 14.316 fueron consideradas para su posterior análisis. El tratamiento estadístico reveló que sólo 143 genes estaban diferencialmente expresados (DEG, 55 sobreexpresados y 88 subexpresados) por EC. Además, el FC de los DEG no fue elevado (sólo 43 genes tuvieron  $FC \geq 1$ ). Esto podría ser debido a que el muestreo de sangre se realizó tras 35 días de experimental. Es posible que se detectaran más cambios en la expresión génica si se hubieran tomado las muestras con anterioridad. De hecho, Hamzaoui et al. (2013) observó que las cabras EC sufrieron fuertes cambios fisiológicos durante la semana 1 de tratamiento y posteriormente, se fueron recuperando parcialmente, aunque las diferencias seguían siendo significativas en la semana 5.

Se han detectado 31 rutas biológicas impactadas por EC: 28 de ellas subexpresadas y sólo 3 sobreexpresadas (Tabla 1). Las cabras lecheras bajo EC parecen sufrir inmunodisfunción y daño en los tejidos. Se encontró una inhibición del linaje de células hematopoyéticas (ruta #9, Tabla 1) además de una fuerte inhibición de la migración de leucocitos de la sangre a los tejidos, una reducción en la función en las moléculas de adhesión celular y una menor señalización de calcio (rutas #1, #4 y #14, Tabla 1). Todo junto, afecta a la diapédesis a través del endotelio vascular, lo que reduciría la respuesta inmune innata y adaptativa contra los patógenos (Muller, 2011).

Se detectó también una inhibición de las rutas de adipocitocinas y señalización PPAR (#10 y #11, Tabla 1), indicando una alteración en el metabolismo lipídico de las células inmunitarias y, en consecuencia, en sus funciones, ya que hay una relación clara entre la composición lipídica de las células inmunitarias y sus funciones (Calder, 2008).

Además, se observó una fuerte activación de la ruta del catabolismo de las purinas y las pirimidinas y de la degradación de xenobióticos vía citocromo p450 (CYP450), junto con una inhibición del transporte de RNA del núcleo al citoplasma en cabras EC (#2, #3, #5, #8, Tabla 1). Estos cambios podrían ser el resultado de una crisis de estrés oxidativo inducidos por calor, produciendo radicales libres y peróxidos, causando desacoplamiento de proteínas y muerte celular (Trachootham et al., 2008). Esta muerte celular, a su vez, activa una cascada de enzimas detoxificantes como los CYP450, encargados del catabolismo de los nucleótidos y de las toxinas liberadas (Hannemann et al., 2007). Además, las proteínas dañadas se acumulan masivamente en el retículo endoplasmático, activando una señal de respuesta compensatoria para disminuir la síntesis de proteínas, bloqueando su transporte de RNA y su posterior traducción (Kumar, 2007). La alteración de estas 4 rutas metabólicas puede estar indicando toxicidad química, inmunodeficiencia, e inflamación (Hibbs et al., 2016) en cabras EC.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bionaz, M., Periasamy, K., Rodriguez-Zas, S.L., Hurley, W.L. & Looor, J.J. 2012. *PLoS One* 7: e32455.
- Calder, P.C. 2008. *Prostagl., Leukotrienes Ess. Fatty Ac.* 79: 101–108.
- Gautier, L., Cope, L., Bolstad B.M. & Irizarry R.A. 2004. *Bioinform.* 20: 307–315.
- Gómez, L., Allona, I., Ramos, A., Núñez, P., Ibáñez, C., Casado, R. & Aragoncillo, C. 2005. *Invest. Agrar.: Sist. Recur. For.* 4: 307-317.
- Hamzaoui, S., Salama, A.A.K., Albanell, E., Such, X. & Caja, G. 2013. *J. Dairy Sci.* 96: 6355-6365.
- Hannemann, F., Bichet, A., Ewen, K.M. & Bernhardt, R. 2007. *Biochim. Biophys. Acta.* 1770: 330-44.
- Hibbs, J.B., Vavrin, Z. & Cox, J.E. 2016. *Redox Biol* 8: 271-284
- IPCC. 2013. Cambridge University Press.
- Kumar, V., Abbas A.K., Fausto, N., Mitchell

& Robbins, R. Basic Pathology. 2007. Ed. Elsevier Health Sciences. • Muller, W.A. 2011. Ann. Rev. Pathol. 6: 323–344. • Salama, A.A.K., Caja, G., Hamzaoui, S., Such, X., Albanell, E., Badaoui, B. & Loor, J.J. 2016. Chapter 2 in Animal Welfare in Extensive Production Systems. • Stallings, J.D., Ippolito, D.L., Rakesh, V., Baer, C.E., Dennis, W.E., Helwig, B.G., Jackson, D.A., Leon, L.R., Lewis, J.A. & Reifman, J. 2014. BMC Genomics 15(1): 1058. • Thompson, I.M.T., Tao, S., Monteiro, A.P.A., Jeong, K.C., & Dahl, G.E. 2014. J. Dairy Sci. 97:7426–7436. • Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M.A., Nilsa, R.D. & Huang, P. 2008. Antioxid. Redox. Signal. 10: 1343–1374.

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

**Tabla 1.** Listado de las 15 rutas metabólicas más afectadas en células sanguíneas de cabras lecheras en lactación tras 35 días de exposición a estrés por calor

#	Pathway	Impact	-Flux   +Flux
1	Leukocyte transendothelial migration	Blue bar	Green bar (left), Red bar (right)
2	Pyrimidine metabolism	Blue bar	Red bar (right)
3	Purine metabolism	Blue bar	Red bar (right)
4	Cell adhesion molecules (CAMs)	Blue bar	Green bar (left), Red bar (right)
5	Drug metabolism - cytochrome P450	Blue bar	Red bar (right)
6	Tight junction	Blue bar	Green bar (left)
7	Fat digestion and absorption	Blue bar	Green bar (left)
8	RNA transport	Blue bar	Green bar (left)
9	Hematopoietic cell lineage	Blue bar	Green bar (left)
10	Adipocytokine signaling pathway	Blue bar	Green bar (left)
11	PPAR signaling pathway	Blue bar	Green bar (left)
12	Adherens junction	Blue bar	Green bar (left)
13	ECM-receptor interaction	Blue bar	Green bar (left)
14	Calcium signaling pathway	Blue bar	Green bar (left)
15	Arginine and proline metabolism	Blue bar	Green bar (left)

### EFFECTS OF HEAT STRESS ON THE TRANSCRIPTOMIC PROFILE OF BLOOD CELLS IN LACTATING DAIRY GOATS

**ABSTRACT:** High temperature is a major stress that hinders the immune system leading animals to be more prone to diseases. Although productive and physiological responses of dairy animals to heat stress are well known, there is still a lack of knowledge about transcriptomic adaptation of the immune system. This work aimed to evaluate the changes in blood transcriptomics of goats under heat stress. Eight adult Murciano-Granadina dairy goats in mid-lactation were submitted to 2 climatic treatments for 35 d. Treatments and temperature-humidity index (THI) were: 1) thermal neutral (TN: 15-20°C, 40-45%, THI = 59-65), and 2) heat stress (HS: 12 h at 37°C-40%, THI = 86; 12 h at 30°C-40%, THI = 77). Blood samples were collected at d 35 and RNA was extracted for microarray analyses (Affymetrix GeneChip Bovine Genome Array). The analysis revealed 143 differentially expressed genes. The Dynamic Impact Approach revealed that 31 biological pathways were impacted by HS. Pathways of leukocyte transendothelial migration, hematopoietic cell lineage, and PPAR signaling were negatively impacted by HS, whereas nucleotide metabolism increased. Overall, these changes indicate alteration in the functionality and efficiency of immune cells, which might be linked to a greater immune susceptibility to diseases under HS conditions.

**Keywords:** goats, heat stress, transcriptomics, immune system