

## **CERTIFICACIÓN DE LA LECHE CRUDA DE VACA PRODUCIDA EN BASE A PASTOS Y FORRAJES UTILIZANDO MIRNA: RESULTADOS PRELIMINARES.**

Abou El Qassim<sup>1</sup>, L., Zhao<sup>2</sup>, K., Vicente<sup>1</sup>, F., Guan<sup>2</sup>, L.L. y Royo<sup>1</sup>, L.J.

<sup>1</sup>Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA). 33300 Villaviciosa (Asturias).

<sup>2</sup>Agriculture and Forestry Center Universidad de Alberta, Edmonton (Canadá).  
ljroyo@serida.org

### **INTRODUCCIÓN**

La cornisa Cantábrica y Galicia cuentan con unas condiciones edafoclimáticas que la dotan de una gran capacidad potencial para la producción de pastos y forrajes utilizables para la alimentación del ganado lechero, lo que la diferencia del resto de territorios en España. La producción de leche basada en pastos y forrajes (i) confiere importantes externalidades ambientales positivas (p. ej. fijación de carbono) puestas de relieve en la normativa de la PAC, (ii) se relacionan con un mayor contenido en nutrientes funcionales en la leche producida, (iii) permiten mejorar el margen económico por litro de leche producido, y (iv) son más respetuosos con el bienestar animal, cuestión que los consumidores cada vez dan más importancia. Estos factores dotan a este tipo de producción un carácter estratégico para el futuro del sector lechero que es necesario poner en valor ante la industria y los consumidores.

Los micro-ARN (miRNA) son una familia de moléculas pequeñas de ARN no codificante, que regulan la expresión génica, uniéndose a dianas específicas en el ARN mensajero (Lin et al., 2004). Está demostrado que cambios en la dieta afectan a la expresión génica en la glándula mamaria (Ollier et al., 2009; Bauman et al., 2011), y teniendo en cuenta que los miRNA son reguladores importantes de la expresión génica, parece razonable pensar que perfiles distintos de miRNA en la glándula mamaria pueden estar asociados a cambios en la dieta. Otra de sus características es que son excretados fuera de la célula, estando presente en todos los fluidos biológicos, incluida la leche y que la dieta, el estrés ambiental provocan cambios en sus perfiles, siendo unos buenos candidatos para caracterizar el pastoreo, el bienestar animal y posiblemente también la calidad de la leche (Muroya et al., 2015).

En bovino, se han identificado miRNA tanto en la glándula mamaria como en la leche cruda, demostrándose además que se expresan de modo diferente en cada fracción de la leche: células, grasa y suero (Cánovas et al., 2012; Li et al., 2016). El objetivo de este trabajo es estudiar los perfiles de miRNA en leche cruda de vaca para evaluar su utilización como marcador de certificación de leche producida por vacas alimentadas con pastos y forrajes.

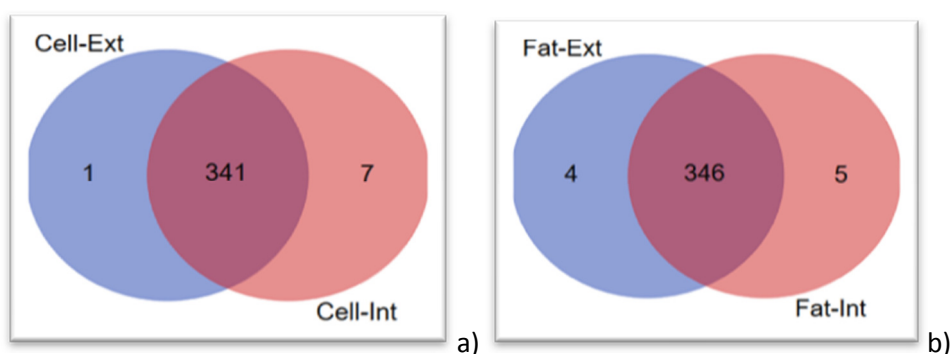
### **MATERIAL Y MÉTODOS**

Se seleccionaron seis explotaciones lecheras en Asturias de entre las caracterizadas por el tipo de alimentación y manejo (Santiago et al., 2016), tres de manejo en extensivo, con alimentación en base a pastos y forrajes y más de 10 horas diarias en pastoreo, y tres de manejo en intensivo, con estabulación permanente y alimentación en base a concentrados. Al final de la primavera de 2016 se muestrearon 500 ml de leche de tanque de cada una de las ganaderías y se transportaron en frío al laboratorio para su tratamiento. El muestreo se hizo en la primavera y en tanque con dos propósitos: a) intentar maximizar las diferencias debidas a alimentación y pastoreo, entendido como factor de estrés y ejercicio, y b) diluir los efectos individuales en la composición de los miRNA, debidos entre otros a la edad y estado de lactación de las vacas. Se centrifugaron las muestras a 4°C durante 20 minutos a 4200xg y se extrajo el ARN total de la fracción de células (fondo del tubo) y de grasa (sobrenadante) utilizando el kit mirvana miRNA Isolation (Ambion). La cantidad e integridad del ARN total de las muestras fue estimada en un Agilent 2100 Bioanalyzer. Se construyeron las librerías de miRNA de cada muestra y se secuenciaron con el sistema Illumina HiSeq2000 system (Illumina).

Basándonos en la frecuencia de las lecturas en la secuenciación se estimaron los niveles de expresión de cada miRNA individual, previamente normalizadas por el número de lecturas por millón, CPM (count per million) = (specificmiRNAreads x 10<sup>6</sup> / total miRNA mapped reads). Solo aquellos miRNA con al menos 1 CPM en al menos dos de las tres muestras de cada sistema se consideraron como expresados. Los miRNA con menos de 1 CPM en todas las muestras (3) de un sistema se considera que no se expresan. Para cada fracción de leche, se identificaron los miRNA específicos de cada sistema de producción y por otro lado los comunes entre sistemas pero de expresión diferencial comparando las medias con un T-test.

## RESULTADOS

En la secuenciación se obtuvieron entre 5 y 8 millones de lecturas en las muestras de células, y unos 2 millones en las muestras de grasa, estando más de la mitad de ellas mapeadas en el genoma bovino. De los miRNA mapeados, 518 y 477 corresponden a células y grasa respectivamente, de ellos 454 los encontramos en las dos fracciones y 64 y 23 son específicos de células y grasa, respectivamente. De entre los miRNA mapeados, se identificaron 349 miRNA en la fracción de células, de los cuales 8 son específicos del sistema de producción: uno en extensivo y siete en intensivo (Figura 1a). De entre los expresados en la grasa, se identificaron 355 miRNA, de los cuales 9 miRNA eran específicos del tipo de producción: cuatro en extensivo y cinco en intensivo (Figura 1b). Al analizar las diferencias entre las medias (T-test) de los miRNA comunes en los dos tipos de producción, se observó que 4 miRNA en células y 2 en la fracción grasa presentaban diferencias de expresión significativas (P<0,05) entre tipos de producción. Finalmente, del total de 23 miRNA identificados que diferencian los dos sistemas de producción, bien por ser específicos de cada fracción, bien porque tienen diferencias de expresión entre sistemas, tan sólo hay uno, el  $\beta$ -miR-369-3p que se encuentra en ambas fracciones.



**Figura 1.** miRNA específicos y comunes de cada sistema (intensivo -Int- vs extensivo -Ext-) en las fracciones de leche (células -Cell- y grasa Fat-).

La fracción extraída de células está compuesta por el ARN de los leucocitos y de las células epiteliales de descamación. En cambio, el ARN de la fracción grasa se corresponde con el contenido en los glóbulos grasos, que contienen parte del citoplasma de las células de descamación y de los exosomas. Nuestros resultados demuestran que los perfiles de miRNA de ambas fracciones son diferentes, más aún cuando nos fijamos en los que diferencian los dos sistemas de producción. Por lo tanto concluimos que las dos fracciones de leche se deben estudiar por separado.

Varios trabajos indican que los miRNA presentes en leche son componentes bioactivos, y que a través de la ingestión pueden llegar a los consumidores y tener un efecto en ellos (Baier et al., 2014; Howard et al., 2015). Es importante destacar que la mayoría de los miRNA presentes en los glóbulos de grasa están encapsulados en exosomas, lo que les confiere tanto mayor protección a la degradación, como facilidad de absorción por endocitosis (Baier et al., 2012).

Aunque los resultados son preliminares ya que aún deben ser validados por qPCR, se han identificado miRNA concretos específicos del sistema de producción, lo que en principio confirma que los miRNA pueden constituir una herramienta útil para caracterizar la leche cruda y poder certificar la producida bajo sistemas de producción diferentes. El estudio de los miRNA expresados de forma diferencial en las distintas fracciones de la leche contribuirá además a analizar la funcionalidad de la leche producida bajo sistemas de producción diferentes.

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Baier et al. 2014. *The Journal of Nutrition* 144: 1495-1500. • Bauman et al. 2011. *Annual Review of Nutrition* 31: 299-319. • Canovas et al. 2014. *Scientific reports* 4: 5297. • Howard et al. 2015. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63: 588-592. • Li et al. 2016. *PlosOne* 11: e0154129. • Lin et al. 2004. *Nature Reviews Genetics* 5: 522-532. • Muroya et al. 2015. *Plos One* 10: e0136475. • Ollier et al. 2009. *Journal of Dairy Science* 92:5544-60. • Santiago et al. 2016. *Grassland Science in Europe* 21: 47-49.

**Agradecimientos:** Trabajo financiado por el proyecto INIA RTA2014-00086-C03-02, cofinanciado con fondos FEDER. Loubna Abou El Qassim es beneficiaria de una beca CIHEAM/IAMZ.

### CERTIFICATION OF RAW MILK PRODUCED BASED ON PASTURE AND FODDER USING MIRNA: PRELIMINARY RESULTS.

**ABSTRACT:** The Cantabrian coast and Galicia is characterized by a great potential capacity for the production of grasses and forages that can be used to feed dairy cattle. Strategies are adopted for the sustainable production of bovine milk of differentiated quality (eg products of intensive versus extensive system). The miRNAs are small molecules of non-coding RNA, which regulate gene expression. Moreover it has been shown that dietary changes affect gene expression in the mammary gland, so it seems reasonable that they can be used as markers of the diet intake by cows. Plasma miRNA have also been shown to change due to exercise and stress, then making them candidate markers for grazing and animal welfare. Our aim is to use milk miRNA profiles as markers for dairy production system.

Six dairy farms were sampled: three extensive and three intensive. Total RNA from bulk milk fractions, cells and fat from each sample, was isolated, and miRNA sequenced. Sequencing showed that miRNA expressed in cells (349) and fat (355) are different, being eight and nine specific of one production system. In cells, four miRNA and two in the case of fat, were differentially expressed ( $p < 0.05$ ), depending on the productions system,. Even though these results need to be validated by qPCR, miRNA has been shown to be a useful tool for milk characterization and certification. The study of miRNA differentially expressed in milk fractions could help us to understand the functionality of milk produced under different systems.

**Keywords:** milk, miRNA, dairy system, traceability