

ESTUDIO PRELIMINAR DEL TRANSCRIPTOMA DE LA MUCOSA ABOMASAL DE OVEJAS CLASIFICADAS COMO RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES SEGÚN LA RESPUESTA A UNA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *TELADORSAGIA CIRCUMCINCTA*

Suárez-Vega¹, A., Arranz¹, J.J., Martínez Valladares², M., Chitneedi¹, P.K. y Gutiérrez-Gil¹, B.
¹ Dpto. de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 León. ² Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas s/n, Grulleros 24346, León. bgutg@unileon.es

INTRODUCCIÓN

Nuestro grupo de investigación ha participado anteriormente en varios proyectos centrados en la identificación de marcadores genéticos para la resistencia ovina a las infecciones por nematodos gastrointestinales (GIN). Este carácter es altamente complejo y el fenotipo tradicionalmente utilizado para medir el nivel de infección es el recuento de huevos en heces o FEC (del inglés, *faecal egg count*). Otros caracteres utilizados como indicadores con respecto al carácter resistencia a GIN son los niveles séricos de IgA o de pepsinógeno. En el primero de estos proyectos, un barrido genómico con marcadores microsatélites para la detección de *Quantitative Trait Loci* (QTL) con influencia sobre la resistencia a GIN en una población de Churra, se identificó, además de otras regiones menos importantes, un QTL para el carácter FEC significativo a nivel *genome-wise* en el cromosoma 6 ovino (OAR6) (Gutiérrez-Gil et al., 2009) que fue posteriormente confirmado en una población independiente y en base al análisis de los genotipos del *Illumina Ovine SNP50 BeadChip* (50K-Chip) (Atlija et al., 2016).

Como una aproximación complementaria a estos estudios basados en el estudio genético a nivel estructural surgen los análisis propuestos en un proyecto financiado por la Junta de Castilla y León (LE248U14) para la comparación del transcriptoma de la mucosa y los ganglios abomasales de ovejas clasificadas como resistentes y susceptibles a las infecciones por GIN. En este trabajo se presenta una descripción del diseño del estudio y un resumen descriptivo del análisis inicial de los datos de secuenciación del mRNA obtenidos mediante secuenciación masiva paralela o RNA-Seq de las muestras de mucosa abomasal recogidas en un total de 12 animales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de animales, infecciones experimentales y recogida de muestras: En primer lugar, mediante la obtención de muestras de heces en varios rebaños de la asociación ANCHE (Asociación Nacional de Criadores de ganado ovino de raza Churra), y los niveles de infección detectado en las muestras individuales, y por *pooles*, se seleccionó la granja que presentaba una destacada variabilidad en el carácter FEC, así como un número adecuado tanto de animales con alto y bajos o nulos recuentos. En el “Rebaño de trabajo” seleccionado se hizo un muestreo de heces de un total de 119 ovejas adultas, y tres meses después del último tratamiento de desparasitación. En base a los niveles de FEC individuales, se seleccionaron un total de 24 animales clasificados como 10 “Susceptibles” (alto FEC) y 14 “Resistentes” (bajo FEC), que fueron trasladados a las instalaciones del Instituto de Ganadería de Montaña (IGM) de León.

En los meses posteriores, y con el fin de confirmar el estatus de los animales como “Resistente” o “Susceptible”, se realizó una primera infección experimental (IE1) de confirmación, realizada sobre 18 de los animales adquiridos del “Rebaño de trabajo” (desparasitados una semana antes). La IE1 se basó en una única administración de 50.000 larvas L3 de *T. circumcincta* por vía oral. Tras la infección se realizó la recogida de heces cada 2 días, desde el día 14 post-infección hasta el día 31 post-infección para calcular la eliminación de huevos acumulada de cada animal. Según este recuento varios de los animales se clasificaron como “Susceptibles” y “Resistentes”. Al mes de la IE1 se realizó una segunda desparasitación de los animales como paso previo a la IE2. Tres semanas después de dicho tratamiento, se realizó la segunda infección experimental (IE2) en los animales objeto de estudio. En la IE2 se utilizó una dosis única de 70.000 larvas L3 de *T. circumcincta*, que se administró de forma oral. Durante la primera semana tras la IE2 se realizaron tomas de muestras de heces de los animales cada dos días. El sacrificio humanitario de los animales incluidos en el experimento se realizó a los 7 días después de

la IE2 realizándose inmediatamente la necropsia para la recogida de las muestras de mucosa abomasal y de ganglio linfático abomasal de cada animal sacrificado. Las muestras fueron conservadas en RNAlater® y tras ser mantenidas una noche a 4°C, fueron congeladas a -80°C. El experimento completo, incluyendo el sacrificio de los animales, se realizó en base a la normativa vigente respecto a la protección de los animales utilizados en experimentación (Real Decreto 53/2013) y tras la obtención del informe positivo del Subcomité para la experimentación y bienestar animal (OEBA) de la Universidad de León, y la aprobación del organismo competente de la Junta de Castilla y León.

Extracción de RNA y secuenciación del transcriptoma: La extracción del mRNA se obtuvo a partir de las muestras de mucosa abomasal con el absolutely RNA miRNA Kit de Agilent. 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 7.0 y 7.8. La preparación de las genotecas y posterior secuenciación se realizó con un secuenciador *Illumina Hi-Seq 2000*, generando lecturas "paired-end" de 75 pb, con profundidad de 30M de lecturas.

Análisis bioinformático: 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 frente al 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 realizar una cuantificación de la expresión génica (Cuffquant) utilizando como archivo de anotación de referencia la versión OAR v.3.1-r87 de la anotación del genoma ovino. Para la normalización de los recuentos en *Fragments Per Kilobase Of Exon Per Million Fragments Mapped* (FPKM se utilizó Cuffnorm, herramienta que pertenece también al paquete bioinformático *Cufflinks* (Trapnell et al., 2010). Las estadísticas descriptivas de los datos se obtuvieron con scripts propios en R (R version 3.3.2).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Confirmación del estatus "Resistente" o "Susceptible" en base a los resultados de la IE1: Según los recuentos en heces acumulados llevados a cabo en los 18 animales sometidos a la IE1, ocho animales se clasificaron como "Susceptibles" y siete como "Resistentes". Los tres animales restantes presentaron un perfil más dudoso entre las dos categorías definidas. Dos de los individuos clasificados como "Resistentes" tenían recuento nulo a lo largo de toda la fase de controles (Chu7, Chu15). Se consideró un mínimo de seis muestras de cada grupo para la posterior fase de secuenciación masiva paralela. Así, tras la IE2 y la obtención de las muestras de los tejidos a estudiar, se seleccionaron los seis animales más claramente clasificados dentro de los dos grupos a contrastar: "Resistentes" (Chu1, Chu2, Chu7, Chu8, Chu15 y Chu21) *versus* "Susceptibles" (Chu6, Chu9, Chu11, Chu14, Chu17 y Chu19).

Resumen descriptivo del análisis del transcriptoma de la mucosa abomasal. En la secuenciación del transcriptoma de la mucosa abomasal de 11 de los animales seleccionados se generaron un total de 366.000.571 (33.272.779,18 ± 4.713.851,29 lecturas pareadas por muestra). De ellas, aproximadamente el 72,42 % mapearon frente al genoma ovino utilizado como referencia (OAR v.3.1). Una de las muestras del grupo de "Susceptibles" fue eliminada de este análisis preliminar al mostrar un nivel muy bajo de alineamiento con el genoma de referencia.

De los 27.054 genes anotados en el genoma ovino (Oar_v3.1), se identificaron 19.008 genes expresados (> 0,01 FPKM) en la mucosa abomasal. La distribución de los genes en función de su expresión se muestra en la Tabla 1, donde podemos ver que la mayoría de los genes expresados en la mucosa abomasal tiene un nivel medio de expresión. Esto contrasta con lo observado, por ejemplo, en un tejido con alto grado de especialización como la glándula mamaria (Suárez-Vega et al., 2015), en el que la mayoría de los genes tienen baja expresión y sólo unos pocos están muy altamente expresados.

El perfil de los diez genes más expresados (top10) en la mucosa abomasal fue prácticamente idéntico para las dos condiciones analizadas. En este grupo se encontraron genes ligados a procesos digestivos (GO:0007586), como la *gastroquina 1* (*GKN1*), *pepsinógeno A* (*ENSOARG00000012043*) y el *factor trefoil 1* (*TFF1*), y también genes relacionados con la respuesta frente a bacterias, como la beta-2-microglobulina (*B2M*), la *lisozima* (*LYZ*) y la *cadena J de inmunoglobulina* (*JCHAIN*), así como codificantes de

distintos componentes de las inmunoglobulinas (*IGHA2* y *IGLC1*). El grupo top10 descrito para el mismo tejido en vaca, en un experimento de infección experimental con *O. ostertagi* and *C. oncophora* (Li et al., 2011), también incluyó un número relevante de genes relacionados con la respuesta inmune (*PIGR*, *C3*, *FCGBP*, *Vpreb3* y *JCHAIN*). La distribución de las muestras en función de la expresión génica global mostró una muy alta correlación entre ellas ($r > 0.93$), sin un agrupamiento que responda a la clasificación sensibles/resistentes. Futuros análisis entre los dos grupos considerados servirán para poner de manifiesto si la infección experimental por *T. circumcincta* determina una expresión diferencial para alguno de los genes expresados en la mucosa abomasal ovina.

Tabla 1. Distribución de los genes identificados en la mucosa abomasal del ganado ovino en función de su grado de expresión

Nivel de expresión	Resistentes	Susceptibles
Genes altamente expresados (≥ 180 FPKM)	6.909	7.072
Genes con nivel de expresión medio (≥ 3 a 180 FPKM)	10.577	10.656
Genes con nivel de expresión bajo (< 3 FPKM)	384	381

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Atlija, M. et al. 2016. Genet. Sel. Evol. 48: 4.
- Dobin A. et al. 2013. Bioinformatics 29: 15-21.
- Gutierrez-Gil B. et al. 2009. Genet. Sel. Evol. 41: 46.
- Li, R.W. et al. 2011. Vet. Res. 42: 114.
- Suarez-Vega, A. et al. 2015. Sci. Rep. 5: 18399.
- Trapnell, C. et al. 2010. Nat. Biotechnol. 28: 511-515.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto LE248U14 de las ayudas a proyectos de investigación de la Junta de Castilla y León. P. K. Chitneedi disfruta de una beca predoctoral financiada por la Junta de Castilla y León y el Fondo Social Europeo. B. Gutierrez-Gil es investigadora contratada con el programa “Ramón y Cajal” del MINECO Ministerio de Economía y Competitividad (RYC-2012-10230).

PRELIMINARY STUDY ON THE TRANSCRIPTOME OF THE ABOMASAL MUCOSA OF SHEEP CLASSIFIED AS RESISTANT AND SUSCEPTIBLE ACCORDING TO THEIR RESPONSE TO AN EXPERIMENTAL INFECTION WITH *TELADORSAGIA CIRCUMCINCTA*

ABSTRACT: The preliminary results of the abomasal mucosa transcriptome for Churra dairy ewes classified as resistant and susceptible according to their faecal egg count after an experimental infection are presented. After selecting several dairy ewes with extreme counts of egg per gram (epg) in faeces due to natural infection from a Churra sheep flock and performing a first experimental infection (EI1) in 18 animals with *T. circumcincta*, eight ewes were classified as “Susceptible” and seven ewes as “Resistant”. After a second EI (EI2), the animals were sacrificed 7 days post-infection and tissue samples were collected. Using RNA-Seq the transcriptome of the abomasal mucosa samples of six susceptible and six resistant animals were analysed. Our quantification analysis identified a total of 19,008 expressed genes in the analyzed tissue (> 0.01 FPKM), most of which showed a medium level of expression (FPKM range: 3-180 for $\sim 10,500$ genes). Among the top10 expressed genes, we found genes related to digestion processes (*pepnisogen A gene*, *GKN1* and *TFF1*) and genes related to defense response to bacterium (*B2M*, *LYZ* and *JCHAIN*) and encoding for specific immunoglobulin components (*IGHA2* y *IGLC1*). Further differential expression analyses will assess if the experimental infection with *T. circumcincta* has modified the expression pattern of the abomasal mucosa between the two groups of samples considered.

Keywords: sheep, resistance to nematodes, transcriptome, abomasal mucosa.

ESTUDIO PRELIMINAR DEL TRANSCRIPTOMA DE LA MUCOSA ABOMASAL DE OVEJAS CLASIFICADAS COMO RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES SEGÚN LA RESPUESTA A UNA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *T. CIRCUMCINCTA*

Suárez-Vega¹, A., Arranz¹, J.J., Martínez Valladares², M., Chitneedi¹, P.K. y Gutiérrez-Gil. B.¹

¹ Dpto. de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, 24071 León. ² Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE), Finca Marzanas s/n, Grulleros 24346, León. bgutg@unileon.es

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO

LA RESISTENCIA OVINA A LAS INFECCIONES POR NEMATODOS GASTROINTESTINALES (GIN)
Carácter altamente complejo

INDICADORES CLÁSICOS

- Recuento de huevos en heces, FEC (faecal egg count)
- Niveles séricos de IgA o de Pepsinógeno

OBJETIVO

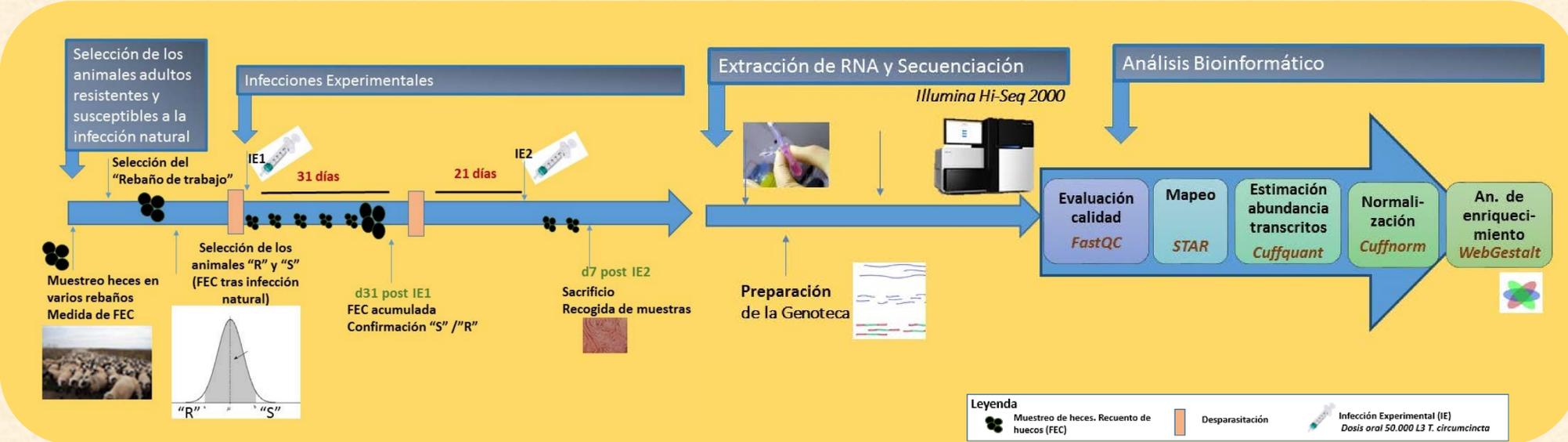
Comparación del transcriptoma de la mucosa abomasal de ovejas clasificadas como resistentes y susceptibles a las infecciones por GIN.

MEJORA GENÉTICA CLÁSICA DIFICULTADA
Caracteres de baja heredabilidad, difíciles de medir rutinariamente

NUEVAS APROXIMACIONES IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES GENÉTICOS

- ✓ Mapeo genético
- ✓ Estudios de expresión "Susceptibles vs Resistentes"

MATERIAL Y MÉTODOS



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Confirmación del estatus "R"/"S" en base a los resultados de la IE1

- Según FEC acumulado en 18 animales tras la IE1 → 8 "S", 7 "R" (2 con FEC =0)
- RNA-Seq: 6 "S" vs 6 "R"

Mapeo de las lecturas de RNA-Seq

- 11 muestras (media de 33.272.779,18 ± 4.713.851,29 lecturas pareadas por muestra).
- ~ 72,42 % de lecturas mapearon frente al genoma de referencia (OAR v.3.1).
- Una muestra "S" fue eliminada por bajo nivel de alineamiento.

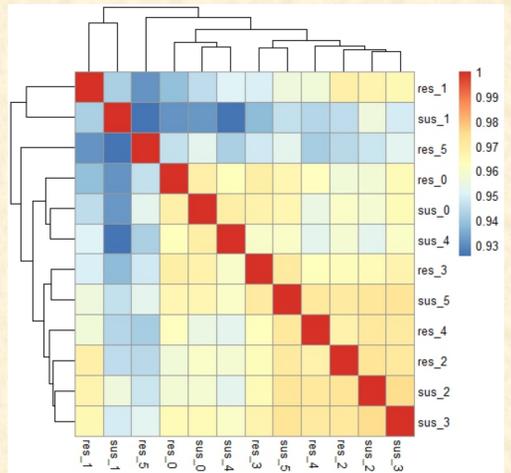
Resumen descriptivo del análisis del transcriptoma de la mucosa abomasal

- Un total 19.008 genes expresados (> 0,01 FPKM) (genes anotados en Oar_v3.1 = 27.054).
- La mayoría de los genes tienen un nivel medio de expresión (Tabla 1).
- Perfil de genes top10 muy similar en las dos condiciones (similar al estudio en vacas de infección experimental con *O. ostertagi* y *C. oncophora* (Li et al., 2011; Vet. Res.42: 114).
- genes ligados a procesos digestivos: gastroquina 1 (*GKN1*), pepsinógeno A, factor trefoil 1 (*TFF1*)
- genes relacionados con la respuesta frente a bacterias: beta-2-microglobulin (*B2M*), lisozima (*LYZ*), cadena J de inmunoglobulina (*JCHAIN*)
- genes de distintos componentes de las inmunoglobulinas (*IGHA2* y *IGLC1*)
- Distribución de las muestras según la expresión génica global → elevada correlación ($r > 0,93$), sin un agrupamiento por clases "S/R" (Figura 1).

Tabla 1

Nivel de expresión	Resistentes	Susceptibles
Genes altamente expresados (180 FPKM)	6.909	7.072
Genes con nivel de expresión medio (3 a 180 FPKM)	10.577	10.656
Genes con nivel de expresión bajo (<3 FPKM)	384	381

Figura 1



FUTUROS ESTUDIOS

- Se realizarán estudios de expresión diferencial (ED) entre las muestras "S" y "R" de mucosa abomasal.
 - RNA de **ganglio abomasal** de animales "S" y "R". → RNASeq → Cuantificación y análisis de ED.
- Identificación de genes y rutas génicas cuya expresión difiere entre animales "R" y "S" a GIN.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto LE248U14 de las ayudas a proyectos de investigación de la Junta de Castilla y León. P. K. Chitneedi disfruta de una beca predoctoral financiada por la Junta de Castilla y León y el Fondo Social Europeo. B. Gutiérrez-Gil es investigadora contratada con el programa "Ramón y Cajal" del MINECO Ministerio de Economía y Competitividad (RYC-2012-10230). M Martínez-Valladares es investigadora contratada con el programa "Ramón y Cajal" del MINECO (RYC-2015-18368).