

# **EFEECTO DE LA INOCULACIÓN INTRAMAMARIA DE UN LIPOPOLISACÁRIDO SOBRE LA VARIACIÓN TEMPORAL DEL TRANSCRIPTOMA DE LAS CÉLULAS SOMÁTICAS DE LA LECHE EN EL GANADO OVINO: RESULTADOS PRELIMINARES.**

Pelayo, R., Fonseca, P.A.S.\*, Marina, H., Gutiérrez-Gil, B., Arranz, J.J. y Suárez-Vega, A.

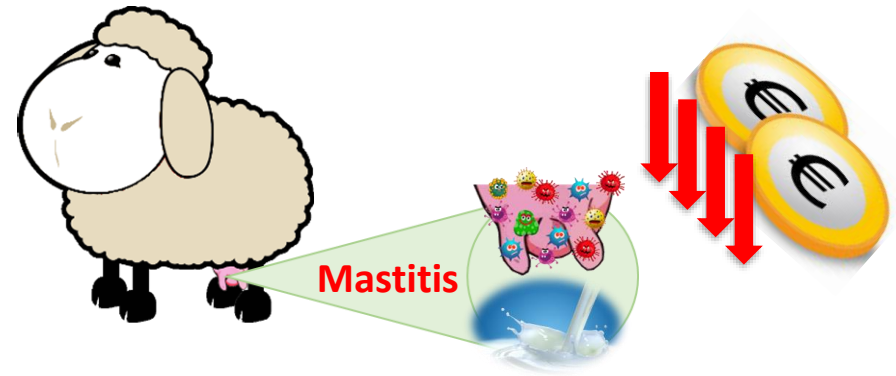
Departamento de Producción Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, Campus de Vegazana s/n, León 24071, España. \*Email: psouf@unileon.es



# Introducción

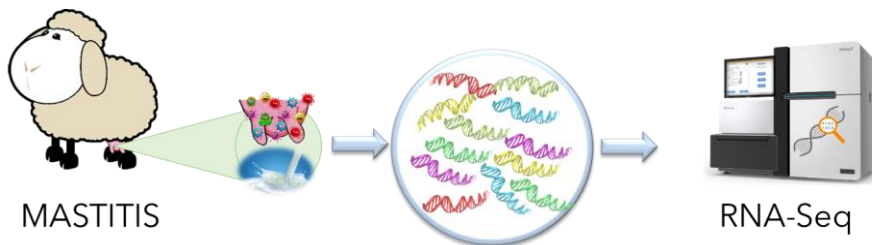
En el **ganado ovino lechero** las **infecciones mamarias** adquieren una relevancia económica evidente, debido principalmente a:

- reducción de la producción de leche
- disminución de la calidad
- rechazo de la leche tras la administración de antibióticos.



Cada vez son más frecuentes los **estudios transcriptómicos** que analizan la respuesta inmune de la glándula mamaria a diferentes agentes etiológicos con el fin de:

- comprender la fisiopatología de la mastitis
- desarrollar estrategias de control adecuadas.



> J Dairy Sci. 2019 Oct;102(10):9043-9059. doi: 10.3168/jds.2019-16504. Epub 2019 Aug 14.

## Genetic mechanisms regulating the host response during mastitis

V Asselstine<sup>1</sup>, F Miglior<sup>1</sup>, A Suárez-Vega<sup>1</sup>, P A S Fonseca<sup>1</sup>, B Mallard<sup>2</sup>, N Karrow<sup>1</sup>, A Islas-Trejo<sup>3</sup>, J F Medrano<sup>3</sup>, A Cánovas<sup>4</sup>

## Comprehensive RNA-Seq Profiling to Evaluate the Sheep Mammary Gland Transcriptome in Response to Experimental *Mycoplasma agalactiae* Infection

Rohini Chopra-Dewasthaly, Melanie Korb, René Brunthaler, Reinhard Ertl

## RNA-Seq Whole Transcriptome Analysis of Bovine Mammary Epithelial Cells in Response to Intracellular *Staphylococcus aureus*

Xiaozhou Wang<sup>1</sup>, Feng Su<sup>2</sup>, Xiaohui Yu<sup>3</sup>, Na Geng<sup>1</sup>, Liping Li<sup>1</sup>, Run Wang<sup>1</sup>, Meihua Zhang<sup>1</sup>, Jianzhu Liu<sup>3\*</sup>, Yongxia Liu<sup>4\*</sup> and Bo Han<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> College of Veterinary Medicine, Shandong Agricultural University, Tai'an, China, <sup>2</sup> Research Center for Animal Disease Control Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an, China, <sup>3</sup> China Animal Health and Epidemiology Center, Qingdao, China, <sup>4</sup> College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing, China

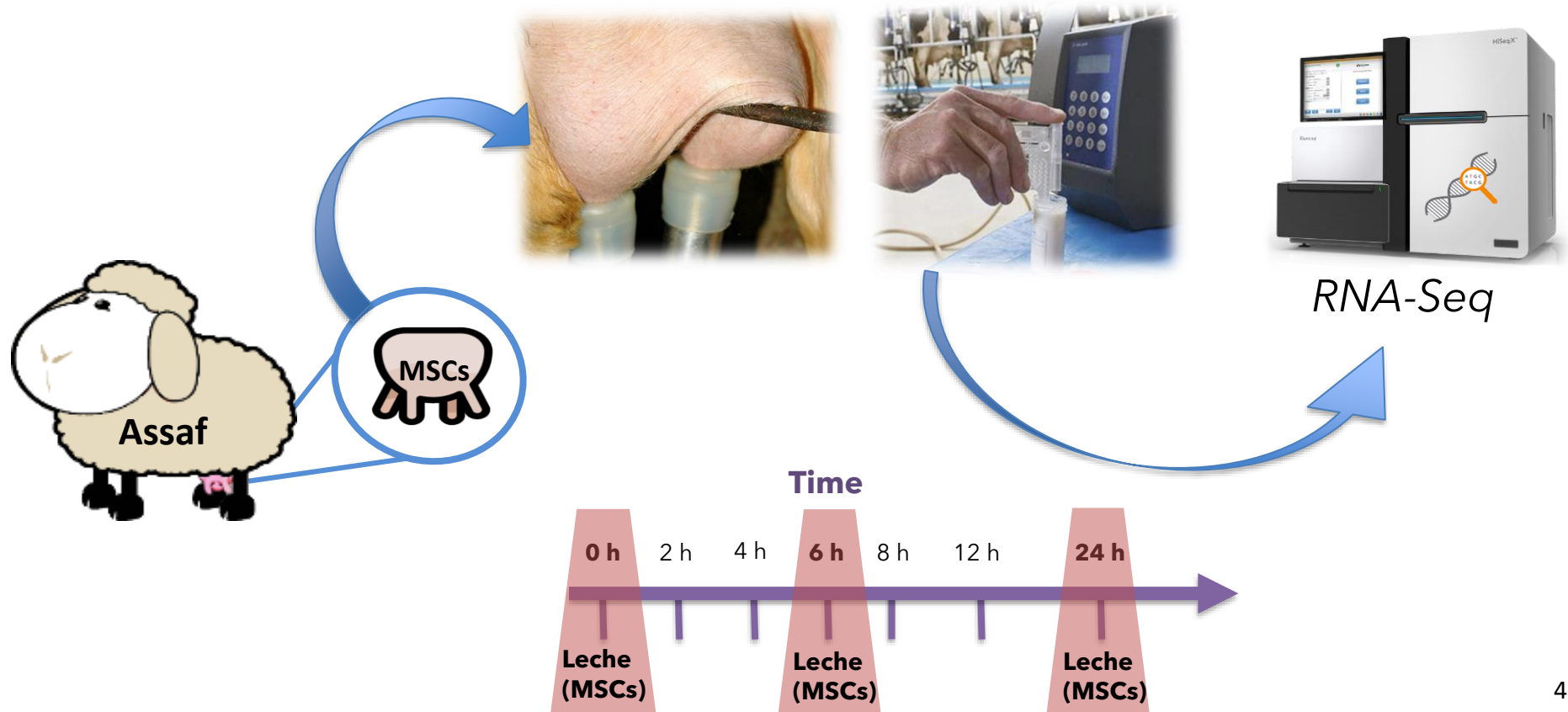
## IMPORTANCIA del “Células somáticas (CS)” de la leche para estudios longitudinales del Transcriptoma de la Glándula Mamaria (TGM).

- El recuento de células somáticas (RCS) es una técnica **no invasiva** para estudiar la fisiología de la glándula mamaria
- Representa un índice del estado de salud animal
- CS de la leche+ Tecnologías como la secuenciación masiva paralela del ARN (**RNA-seq**), nos permite caracterizar el TGM en cada muestra
- Permite realizar estudios longitudinales del TGM (Ej: ante una infección).





Analizar el transcriptoma de las células somáticas de la leche (**MSCs**) en tres puntos de muestreo diferentes (0h, 6h y 24h) en ovejas Assaf de primera lactación, para caracterizar la dinámica de la respuesta inmune innata frente a la inoculación de un lipopolisacárido (**LPS**) de *Escherichia coli*.

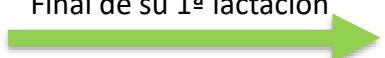




## 1º Assaf N=10



Final de su 1ª lactación  
(~ día 150 tras el parto)



## 2º Inyectar LPS



Control

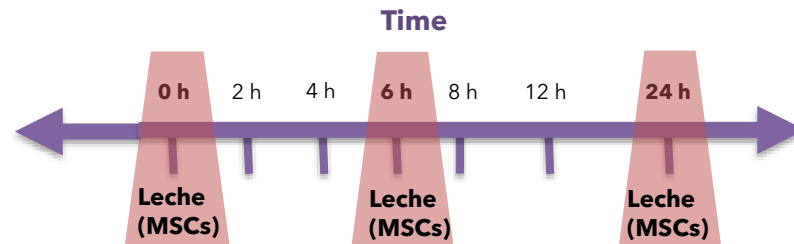
LPS



## 4º Secuenciación del RNA extraído de las MSCs (RNA-Seq)



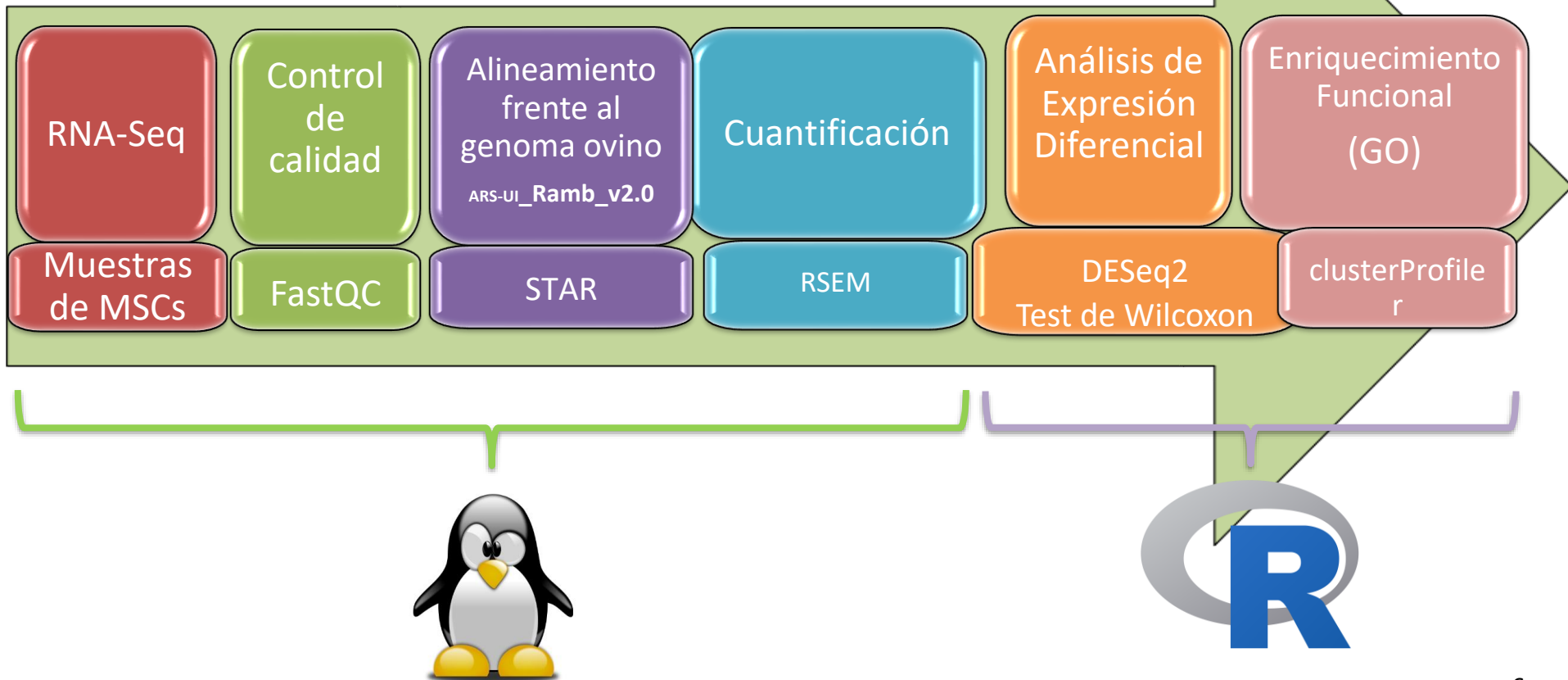
## 3º Recoger muestras individuales en 3 puntos temporales



LPS

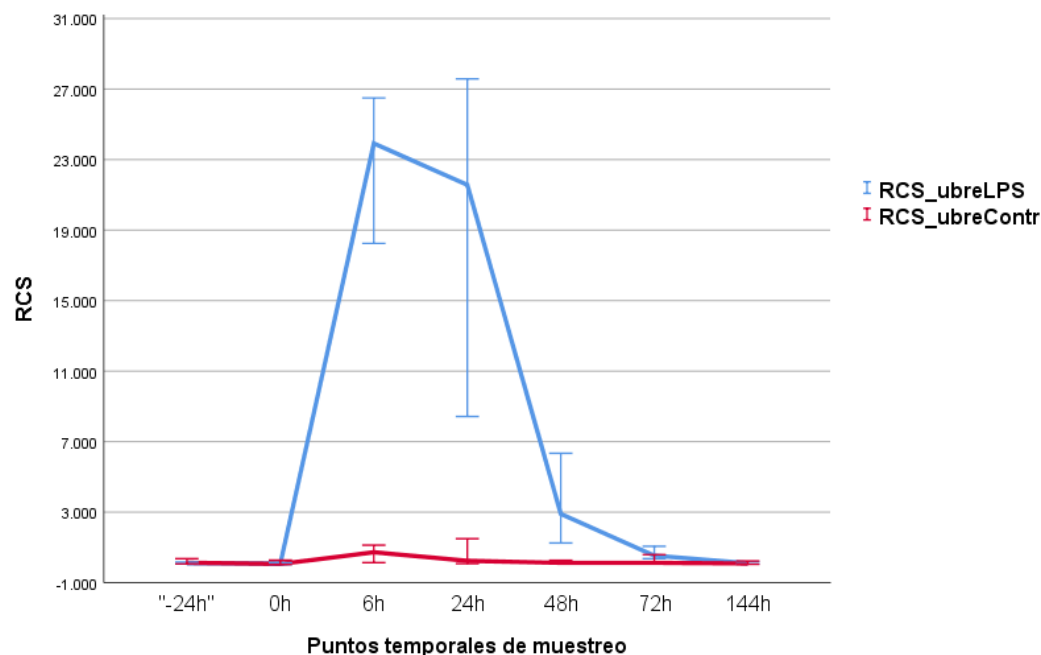
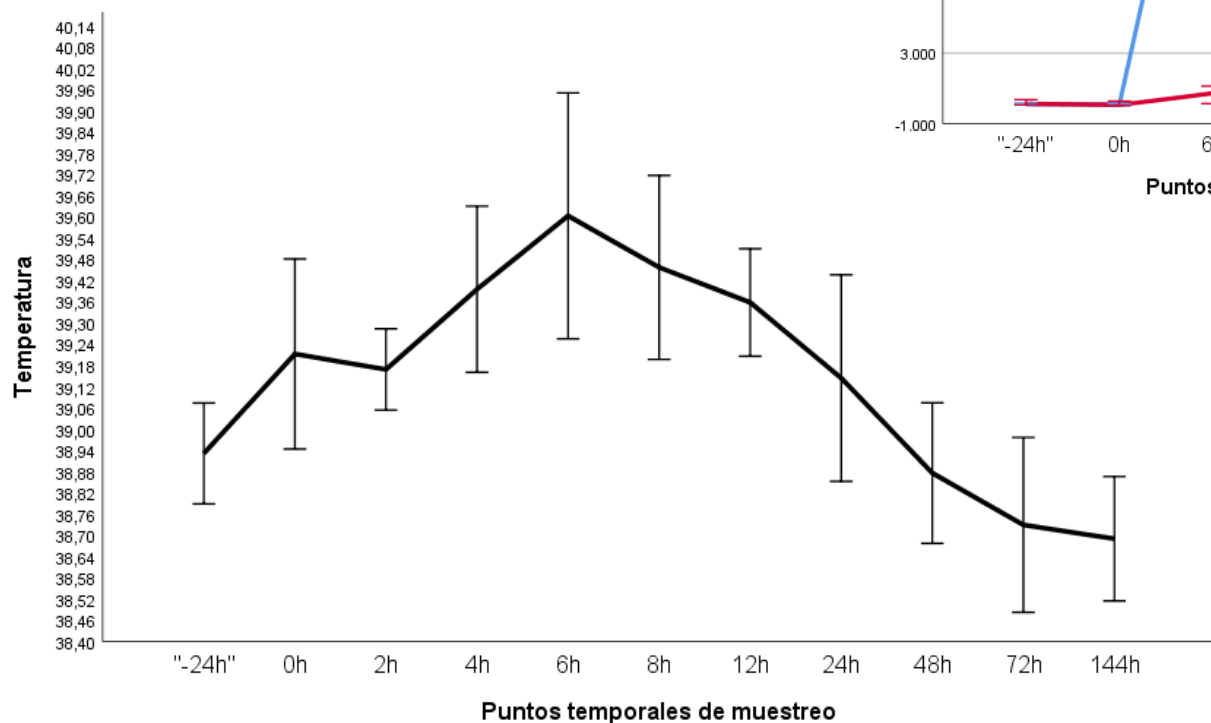


# RNA-Seq Bioinformatic PIPELINE



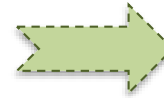
## La inoculación de LPS provocó:

1. Signos leves de inflamación local (enrojecimiento de la ubre tratada)
2. Aumento de la temperatura (máx. 6h)
3. Aumento del RCS evidente en la ubre inoculada con LPS (máx 6h)

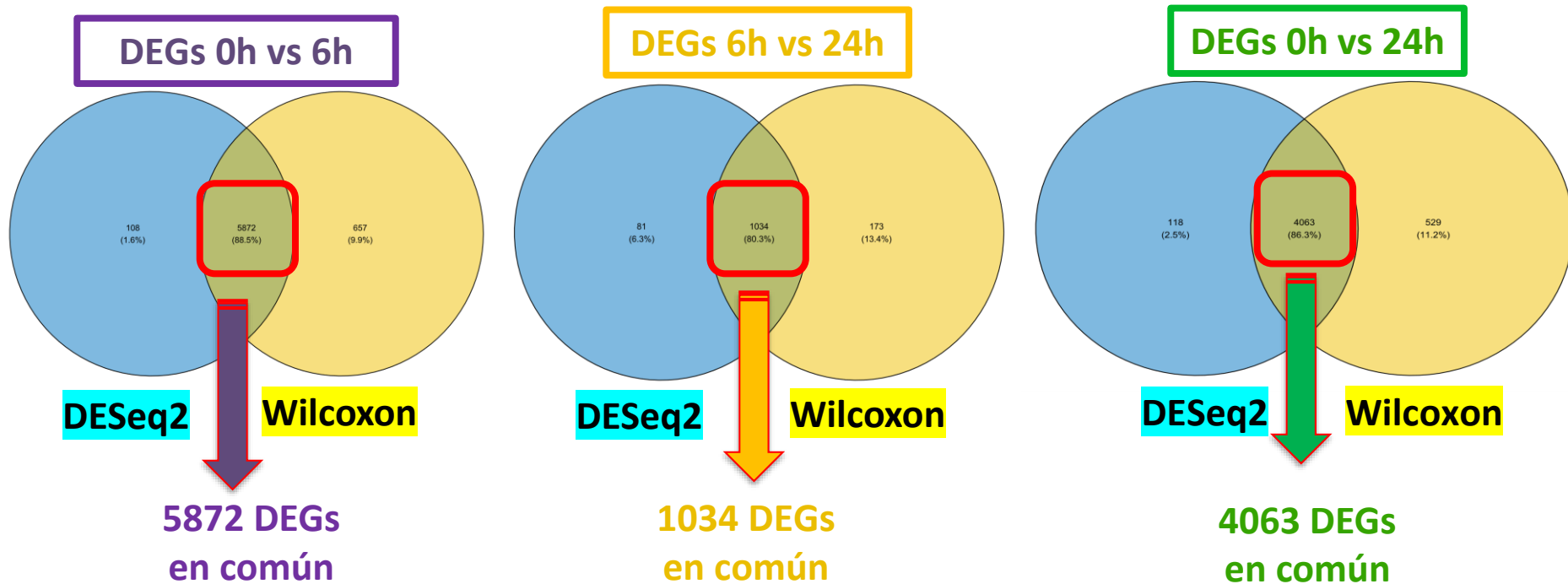


Análisis de expresión diferencial realizado para cada par de horas (0h vs 6h; 6h vs 24h; 0h vs 24h) con los dos métodos estudiados:

- ✓ Método **DESeq2** (aproximación estadística paramétrica)
- ✓ Suma de rangos de **Wilcoxon** (no paramétrica)



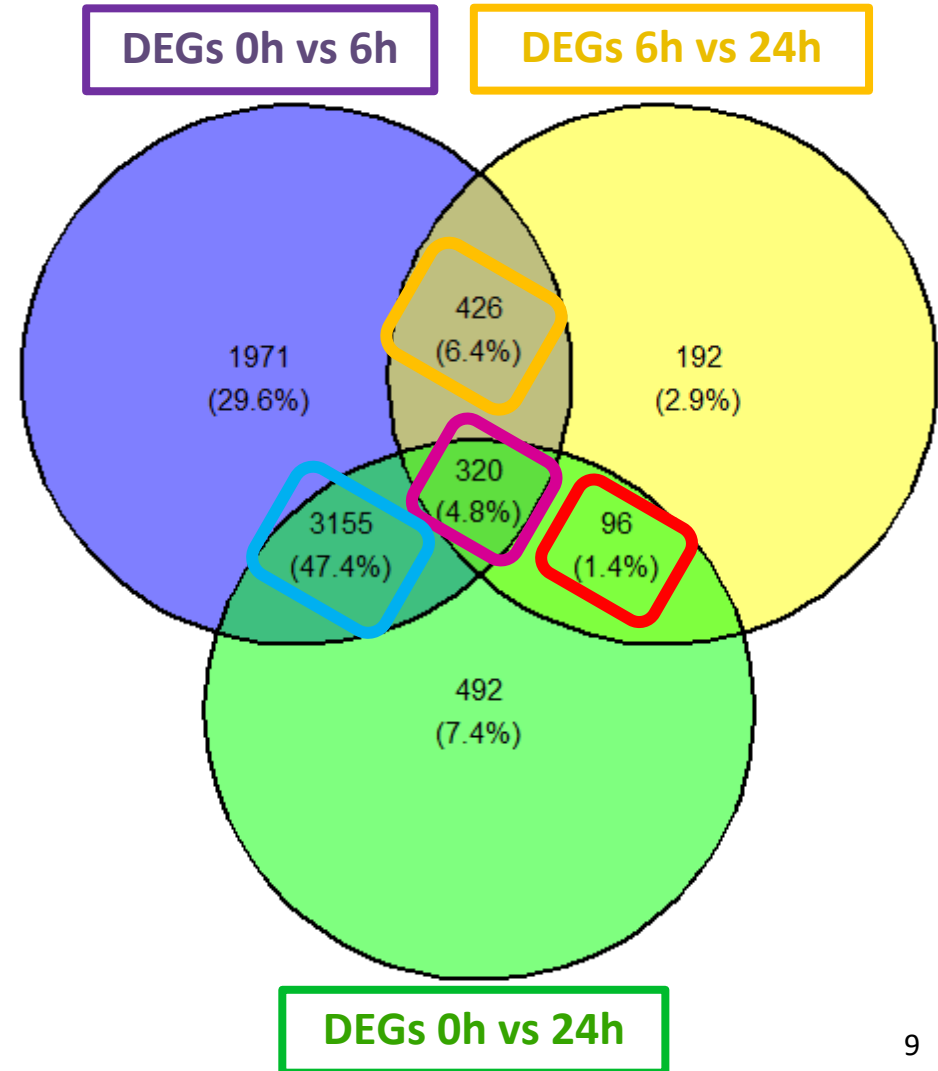
Genes diferencialmente expresados (**DEGs**)





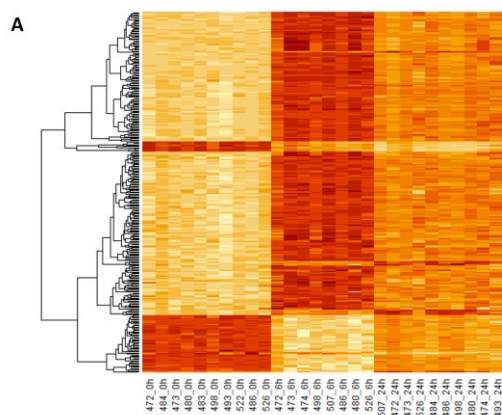
Para este análisis preliminar nos fijaremos en aquellos DEGs comunes entre al menos 2 horas:

- A. para todas las horas (320 DEGs)
- B. 0vs6h and 0vs24h (3155 DEGs)
- C. 0vs6h and 6vs24h (426 DEGs)
- D. 6vs24h and 0vs24h (96 DEGs )

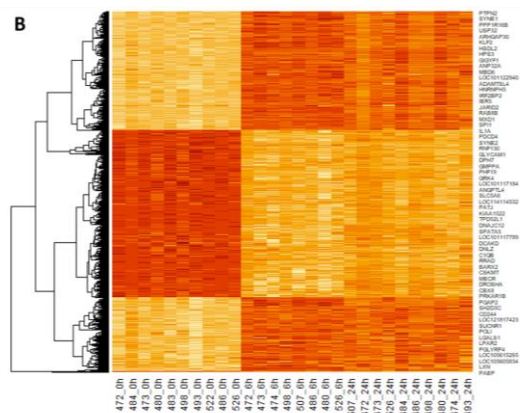


Perfil de expresión de los DEGs en el análisis longitudinal en las horas 0, y 6 y 24 post inculación

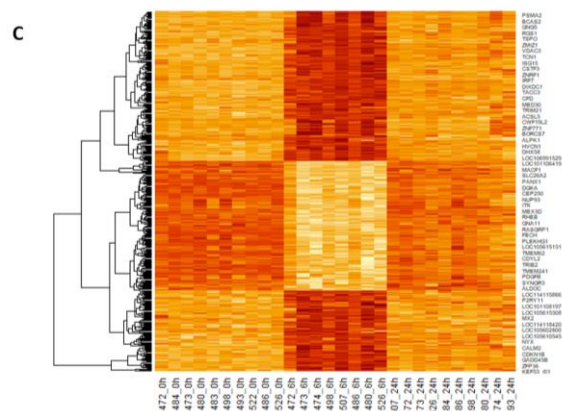
## A. 320 DEGs comunes entre todas las horas



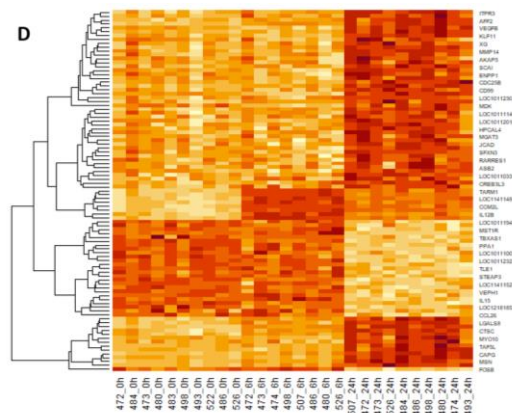
## B. 3155 DEGs comunes 0vs6h and 0vs24h



## C. 426 DEGs comunes 0vs6h and 6vs24h

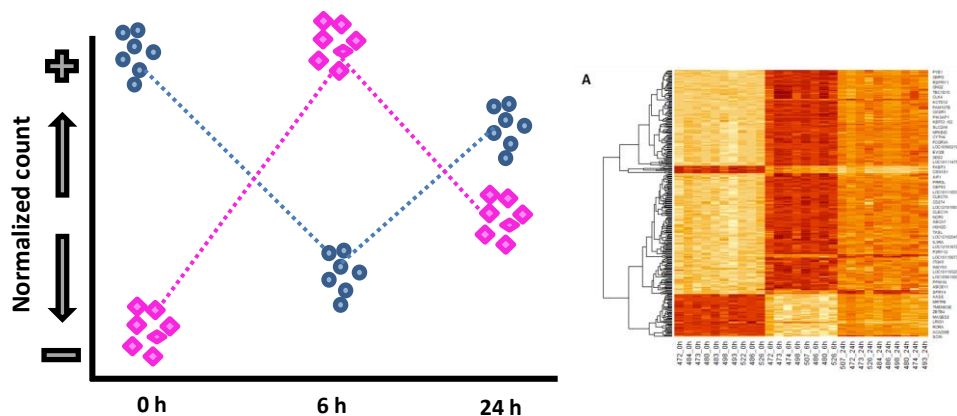


## D. 96 DEGs comunes 6vs24h and 0vs24h



Se definieron **tres grupos** de DEGs en función de sus patrones de expresión :

## A DEGs comunes entre todas las horas

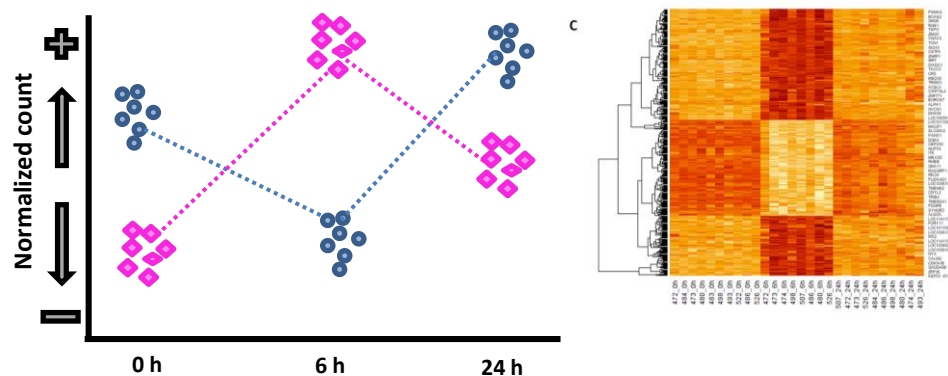


### Patrón azul: 213 DEGs

- LALBA, CSN1S1, PPARA, LPIN1, FABP3, PON2*



## C DEGs comunes 0vs6h and 6vs24h

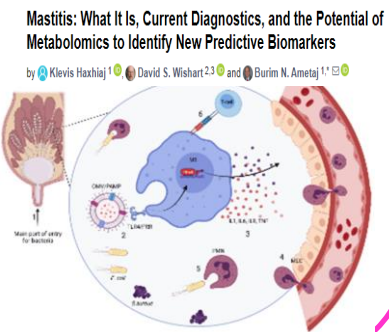


### Patrón rosa: 521 DEGs

- GO-BP: Leukocyte cell-cell adhesión
- GO: BP: Type I interferón mediated signalling pathway



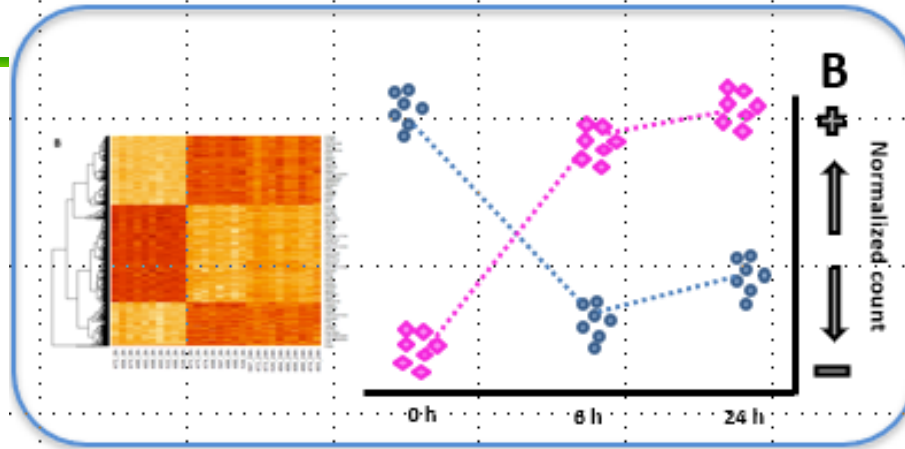
iniciar la respuesta inmunitaria en cascada contra los agentes patógenos



Mastitis: What It Is, Current Diagnostics, and the Potential of Metabolomics to Identify New Predictive Biomarkers

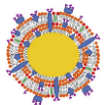
by Kleviš Haxhijaj<sup>1</sup>, David S. Wishart<sup>2,3</sup> and Burim N. Ametaj<sup>1,\*</sup>

## B. DEGs comunes 0vs6h and 0vs24h



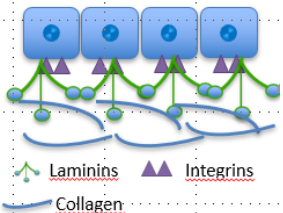
### Patrón azul: 1251 DEGs

- *AACS, FASN, ACACA, ACSS1*

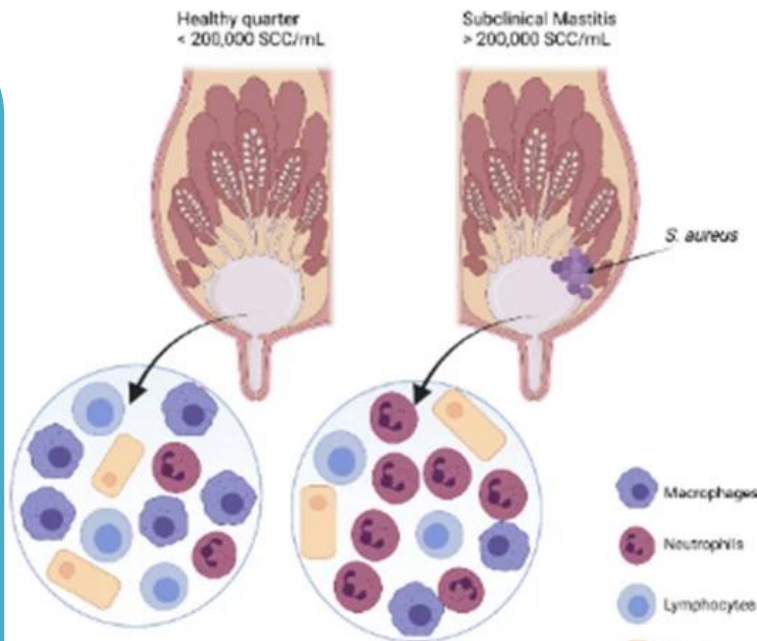


Lipid synthesis

- GO-BP: Cell-cell junction organization



Matriz extracelular



Mastitis: What It Is, Current Diagnostics, and the Potential of Metabolomics to Identify New Predictive Biomarkers

by Klevis Haxhijaj<sup>1</sup>, David S. Wishart<sup>2,3</sup> and Burim N. Ametaj<sup>1,\*</sup>

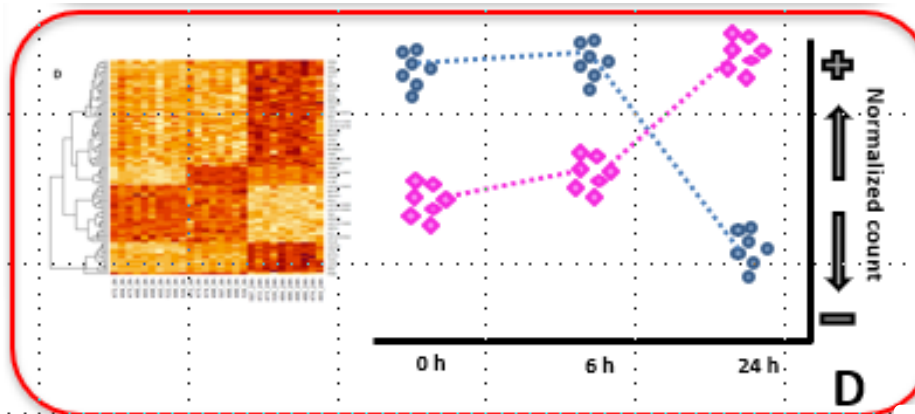
### Patrón rosa: 1436 DEGs

GO-BP: Neutrophil activation  
GO-BP: Neutrophil mediated immunity



Glándula mamaria con mastitis tiene recuentos más altos de neutrófilos

## D. DEGs comunes 6vs24h and 0vs24h



### Patrón rosa: 67 DEGs

- GO-BP: Positive regulation of neutrophil extravasation
- GO-BP: Regulation of leukocyte migration

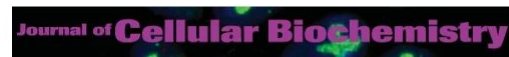
- GO-BP: Vascular endothelial growth factor signalling pathway



Reparación de tejidos y protección tisular

Mastitis Increases Growth Factor Messenger Ribonucleic Acid in Bovine Mammary Glands

LEWIS G. SHEFFIELD  
Department of Dairy Science,  
University of Wisconsin, Madison 53706

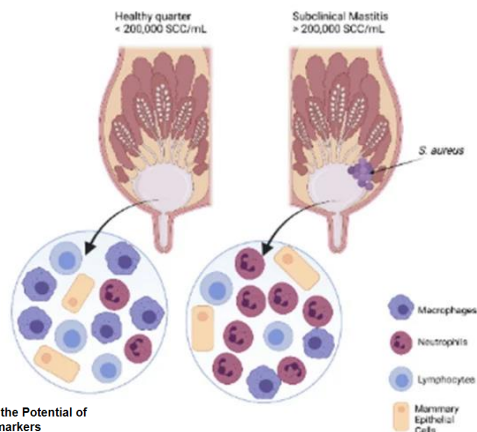


Prospect

EGF and TGF- $\alpha$  in wound healing and repair

Gregory Schultz, Warren Clark, D. Scott Rotatori

First published: April 1991 | <https://doi.org/10.1002/jcb.240450407> | Citations: 266



Mastitis: What It Is, Current Diagnostics, and the Potential of Metabolomics to Identify New Predictive Biomarkers

by Klevis Haxhija<sup>1</sup>, David S. Wishart<sup>2,3</sup> and Burim N. Ametaj<sup>1,\*</sup>



- ❖ Tras la infección experimental con LPS, el análisis del transcriptoma de la glándula mamaria mostró una respuesta diferente a lo largo de los tres puntos temporales estudiados
- ❖ Tanto a las 6 h como a las 24 h post-LPS:
  - ❖ Los datos transcriptómicos indicaron que la glándula mamaria disminuyó sustancialmente la expresión de genes relacionados con procesos metabólicos implicados en la síntesis de proteínas de la leche y lípidos
  - ❖ Se observa un aumento en la expresión de genes relacionadas con la atracción de neutrófilos.
- ❖ A la vez, se ha observado división entre genes de respuesta inflamatoria a las 6 horas y a las 24 horas:
  - ❖ A las 6 horas se observaron una mayor expresión de genes implicados con el inicio de la respuesta inmunitaria
  - ❖ A las 24 horas se observó una mayor expresión de genes posiblemente implicados en reparación de tejidos y protección tisular



## SMARTER PARTNERS



*Thank you for your attention*

[www.smarterproject.eu](http://www.smarterproject.eu)