

## Expressão de genes estimulados por *interferon-tau* para diagnóstico precoce da gestação em novilhas e vacas leiteiras.

Arthur Cobayashi Guerra<sup>1\*</sup>

Priscila Assis Ferraz<sup>1</sup>

Guilherme Pugliesi<sup>1</sup>

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Departamento de Reprodução Animal (VRA), Universidade de São Paulo (USP)<sup>1</sup>

\*arthurcobayashi@usp.br

### Objetivos

A detecção do status gestacional é um fator importante para a reprodução e desempenho em rebanhos leiteiros, pois pode ter grandes efeitos na eficiência reprodutiva e ganhos econômicos nos sistemas de produção de leite. O conceito bovino secreta *IFN-τ*, que estimula a transcrição de vários genes e participa do processo de reconhecimento materno da gestação. Objetiva-se com este estudo avaliar o efeito da presença do conceito na abundância de genes estimulados por *IFN-τ*, *ISG15* e *RSAD2*, em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em vacas e novilhas leiteiras.

### Métodos e Procedimentos

Para tanto, foram utilizadas 176 fêmeas da raça Holandesa, sendo 144 vacas e 32 novilhas sincronizadas e submetidas a um protocolo à base de E2/P4 para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) no D0. No dia 21 após a IATF, foram colhidas amostras de sangue da veia caudal das fêmeas leiteiras para isolamento de PBMC por meio do gradiente com Ficoll® Paque Plus. Além disso, também foi avaliada a funcionalidade do corpo lúteo pela identificação de luteólise por ultrassonografia transretal com Doppler colorido. O RNA das amostras de PBMC foi

extraído com uso do Trizol® Reagente de acordo com instruções do fabricante e a abundância de mRNA dos genes alvo (*ISG15* e *RSAD2*) foi quantificada por PCR quantitativo de transcrição reversa e normalizada em relação aos genes de referência (*GAPDH* e *PPIA*). No D32 após a IATF, foi realizado o diagnóstico confirmatório de gestação pela visualização de um embrião viável usando ultrassonografia transretal modo B, com classificação das fêmeas como gestantes ou não gestantes. Os dados de amplificação foram extraídos do aparelho Step One Plus, e cada amostra foi analisada através de LinReg PCR Software® para determinação da eficiência do qPCR e quantificação dos valores de cada ciclo por amostra. A expressão de cada gene alvo foi normalizada em relação à expressão dos genes de referência pelo método Ct comparativo (Pfaffl, 2001). A abundância dos transcritos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) considerando os efeitos fixos de grupo (gestante ou não gestante), categoria (vaca ou novilha) e interação de grupo e categoria usando o PROC MIXED do SAS.

## Resultados

A abundância de *ISG15* no grupo de fêmeas gestantes teve um fold-change de 1,5 maior quando comparado ao grupo não gestante ( $P=0,0003$ ). Também houve diferença significativa ( $P=0,0008$ ) na abundância do *RSAD2* apresentando um fold-change de 1,46 vezes maior no grupo de fêmeas gestantes em comparação ao de não gestantes. Além disso, foi observado diferença para a abundância dos genes em relação a categoria animal. Na abundância do *ISG15*, verificou-se um fold-change 2,26 maior na categoria animal das vacas em relação às novilhas ( $P=0,001$ ). Por outro lado, a abundância do *RSAD2* teve um fold-change de 1,25 vezes maior nas novilhas em comparação às vacas ( $P=0,04$ ). No entanto, não foi verificado interação entre o grupo (gestante e não gestante) e categoria animal (vacas e novilhas) para a abundância dos *ISG15* ( $P=0,82$ ) e *RSAD2* ( $P=0,80$ ). Além disso, foi verificada uma correlação positiva e significativa entre a expressão dos genes *ISG15* e *RSAD2* ( $r=0,53$ ;  $P<0,0001$ ).

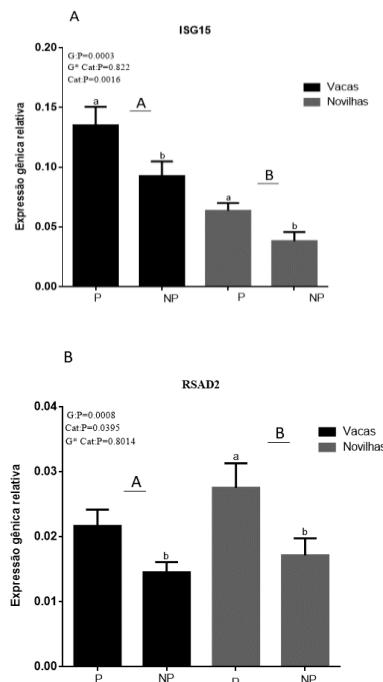


Figura 1: Expressão relativa de *ISG15* (A) e *RSAD2* (B) em PBMC de vacas e novilhas gestantes (Preg), não gestantes (Non-preg) 21 dias após IATF. Os efeitos significativos do grupo (G) e da categoria são mostrados com uma letra diferente ABC ( $P < 0,05$ ).

## Conclusões

Conclui-se que houve uma maior expressão dos genes *ISG15* e *RSAD2* nas fêmeas gestantes em comparação às fêmeas não gestantes nas PBMCs, indicando que a abundância das ISGs pode ser utilizada como potencial marcador precoce da gestação em vacas e novilhas leiteiras. Para a abundância do *ISG15*, houve uma maior expressão nas vacas em relação às novilhas. Por outro lado, na abundância do *RSAD2* foi verificado o oposto, com uma maior expressão nas novilhas em comparação às vacas. Além disso, pode-se observar que a expressão gênica do clássico marcador da gestação, *ISG15*, foi mais estimulada pela presença do conceito em relação ao *RSAD2*.

## Referências Bibliográficas

MELO, G. D. Melo et al. Applied use of interferon-tau stimulated genes expression in polymorphonuclear cells to detect pregnancy compared to other early predictors in beef cattle. *Theriogenology*, v. 152, p. 94-105, ago. - 2020.

Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45.

ROCHA, C. C. et al. Early pregnancy-induced transcripts in peripheral blood immune cells in *Bos indicus* heifers. *Science Reports* 10, 13733, 13 ago. 2020.

SHEIKH, A. A. et al; Interferon-tau stimulated genes: A proxy to predict embryonic mortality in dairy cows. *Theriogenology*, v. 120, p. 61-67, 15 out. 2018.

## ***Interferon-tau stimulated genes expression for early pregnancy diagnosis in heifers and dairy cows.***

**Arthur Cobayashi Guerra<sup>1\*</sup>**

**Priscila Assis Ferraz<sup>1</sup>**

**Guilherme Pugliesi<sup>1</sup>**

Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science (FMVZ), Department of Animal Reproduction (VRA), University of São Paulo (USP)<sup>1</sup>

\*arthurcobayashi@usp.br

### **Objectives**

The detection of gestational status is an important factor for reproduction and performance in dairy herds, as it can have major effects on reproductive efficiency and economics in milk production systems. The bovine conceptus secretes *IFN-τ*, which stimulates the transcription of several genes and participates in the process of maternal recognition during pregnancy. The aim of this study was to evaluate the effect of the presence of a conceptus on the abundance of genes stimulated by *IFN-τ*, *ISG15* and *RSAD2*, in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in dairy cows and heifers.

### **Material and Methods**

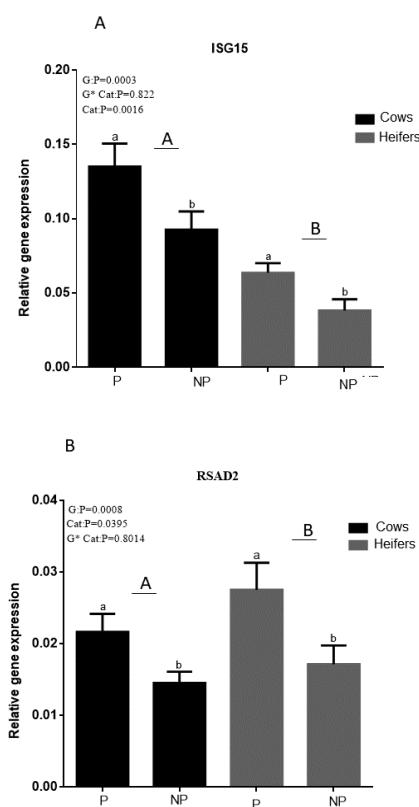
For this purpose, 176 Holstein females were used, among which 144 were cows and 32 were heifers. These animals were synchronized and submitted to a protocol based on E2/P4 for fixed-time artificial insemination (FTAI) on D0. On day 21 after FTAI, blood samples were collected from the tail vein of the dairy females for PBMC isolation using the gradient with Ficoll® Paque Plus. In addition, the functionality of the corpus luteum was assessed by transrectal color Doppler ultrasonography to identify luteolysis. RNA from PBMC samples was extracted using Trizol® Reagent according

to manufacturer's instructions and mRNA abundance of target genes (*ISG15* and *RSAD2*) was quantified by quantitative reverse transcription PCR and normalized to reference genes (*GAPDH* and *PPA*). On D32 after FTAI, a confirmatory pregnancy diagnosis was performed by visualizing a viable embryo using B-mode transrectal ultrasound, with classification of females as pregnant or non-pregnant. The amplification data were extracted from the Step One Plus device, and each sample was analyzed using LinReg PCR Software® to determine the efficiency of the qPCR and quantify the values of each cycle per sample. The expression of each target gene was normalized in relation to the expression of the reference genes by the comparative Ct method (Pfaffl, 2001). The abundance of transcripts was evaluated by analysis of variance (ANOVA) considering the fixed effects of group (pregnant or non-pregnant), category (cow or heifer) and group and category interaction using the SAS PROC MIXED.

### **Results**

The abundance of *ISG15* in the pregnant female group was 1.5-fold greater when compared to the non-pregnant group ( $P=0.0003$ ). There was also a significant difference ( $P=0.0008$ ) in the abundance of *RSAD2* showing a fold-change of 1.46 times greater in the group of pregnant females

compared to non-pregnant females. Furthermore, a difference was observed for the abundance of genes in relation to the animal category. The abundance of *ISG15* was 2.26-fold greater in the animal category of cows compared to heifers ( $P=0.001$ ). On the other hand, the abundance of *RSAD2* was 1.25-fold greater in heifers compared to cows ( $P=0.04$ ). However, there was no interaction between the group (pregnant and non-pregnant) and animal category (cows and heifers) for the abundance of *ISG15* ( $P=0.82$ ) and *RSAD2* ( $P=0.80$ ). In addition, a positive and significant correlation was found between the expression of the genes *ISG15* and *RSAD2* ( $r=0.53$ ;  $P<0.0001$ ).



Picture 1: Relative expression of *ISG15* (A) and *RSAD2* (B) in PBMC from pregnant cows and heifers (Preg), non-pregnant (Non-preg) 21 days after FTAI. The significant effects of group (G) and category are shown with a different letter ABC ( $P < 0.05$ ).

## Conclusions

Therefore, there was a higher expression of *ISG15* and *RSAD2* in pregnant females compared to non-pregnant females in PBMCs,

indicating that the abundance of ISGs can be used as a potential early marker of pregnancy in dairy cows and heifers. For the abundance of *ISG15*, there was a greater expression in cows compared to heifers. However, for the abundance of *RSAD2*, a higher expression was found in heifers compared to cows. Furthermore, it was observed that the gene expression of the classic pregnancy marker, *ISG15*, was more stimulated by the presence of the conceptus than the *RSAD2*.

## References

- MELO, G. D. Melo et al. Applied use of interferon-tau stimulated genes expression in polymorphonuclear cells to detect pregnancy compared to other early predictors in beef cattle. *Theriogenology*, v. 152, p. 94-105, ago. - 2020.
- PFAFFL, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29:e45.
- ROCHA, C. C. et al. Early pregnancy-induced transcripts in peripheral blood immune cells in *Bos indicus* heifers. *Science Reports* 10, 13733, 13 ago. 2020.
- SHEIKH, A. A. et al; Interferon-tau stimulated genes: A proxy to predict embryonic mortality in dairy cows. *Theriogenology*, v. 120, p. 61-67, 15 out. 2018.