

# Estímulo do conceito bovino na expressão de novos marcadores da gestação em células imunes no início do diestro

Pedro Pisani de Freitas Isabella Rio Feltrin<sup>2</sup>; Guilherme Pugliesi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia / Universidade de São Paulo – USP, SP, Brasil; <sup>2</sup> Universidade do Estado de São Paulo – UNESP, Botucatu, SP, Brasil

## Objetivo

O objetivo do estudo foi determinar se os biomarcadores recentemente identificados (RSAD2 e IFI44) por meio de RNASeq (Rocha et al., 2020) são estimulados pela presença do conceito bovino no início do diestro em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Portanto, nós objetivamos testar a hipótese que esses transcritos podem apresentar uma resposta mais pronunciada à estimulação pelo interferon-tau (IFN-t) do que os genes clássicos estimulados pelo IFN-t (ISGs).

## Métodos e Procedimentos

### Experimento 1

Foram coletadas amostras de sangue (25 mL) de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*, N = 9) entre os dias 10-12 após a ovulação por meio de punção da veia jugular em tubos heparinizados com sódio (BD Vacutainer) para o isolamento de PBMCs. Essas foram isoladas por centrifugação em gradiente de densidade usando uma solução de Ficoll-Paque (GE Healthcare), de acordo com o protocolo descrito por (Pugliesi et al. 2014). Após o isolamento, as PBMCs ( $7 \times 10^6$  células/mL) foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com soro fetal bovino inativado (LGC, 10-bio-500) e penicilina-estreptomicina (Sigma-Aldrich), com

(grupo IFN-t) ou sem (grupo Controle) a presença de IFN-t ovino recombinante (rIFNT-t; 100 ng/mL). As células foram cultivadas por 24 horas em uma atmosfera úmida a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Ao final do período de cultura, a viabilidade foi avaliada por coloração com azul de Tripán (0,4%; Sigma Aldrich). As células coletadas foram submetidas à extração de RNA com o kit PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™). O RNA isolado foi tratado com DNase I e submetido à transcrição reversa para síntese de cDNA. O SYBR Green PCR Master Mix foi usado para reações de amplificação em um termociclador Step One Plus (Life Technologies). A expressão relativa de dois genes de referência (*PPIA* e *GAPDH*) e três genes-alvo (*RSAD2*, *IFI44* e *ISG15*) foi analisada.

### Experimento 2

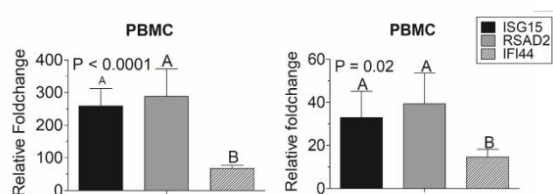
Amostras de sangue foram coletadas de vacas Nelore (N = 10) para o isolamento de PBMCs conforme métodos descritos no Experimento 1. As PBMCs isoladas ( $7 \times 10^6$  células/mL) foram cultivadas em Lavado Uterino de vacas no 18º dia da fase de diestro (UF-Controle) ou de vacas prenhes no 18º dia (UF-Concepto), ambas contendo 0,1% de soro fetal bovino (LGC, Ref. 10-bio-500), por 12 horas, em uma atmosfera úmida a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. A extração de

RNA e a subsequente análise da expressão gênica por RT-PCR foram realizadas conforme descrito no Experimento 1.

## Resultados

Em ambos os experimentos, a expressão gênica após o cultivo dos genes alvo foi significativamente maior ( $P < 0.05$ ) nas PBMCs nos grupos tratados com rIFN-t e UF- Concepto que seus respectivos controles. A mudança relativa do grupo tratado em relação ao controle foi maior ( $P < 0.05$ ) para os genes *ISG15* e *RSAD2*, do que para o gene *IFI44* nos dois experimentos.

**Gráfico 1-** Mudança relativa do experimento 1 e 2



## Conclusão

Conclui-se que tanto o ISG clássico (*ISG15*) avaliado quando o novo marcador *RSAD2* apresentaram maior resposta ao estímulo do IFN-t e UF-Concepto quando comparados ao gene *IFI44* em PBMCs. A similar eficiência em responderem ao estímulo do conceito bovino podem servir como base para uso associado de ISGs clássicos e não clássicos para melhorar o diagnóstico precoce de gestação em bovinos. Além disso, os resultados dos experimentos realizados sugerem que IFN-t é o principal constituinte secretado pelo conceito bovino na comunicação materno-embriônica para estímulo nos transcritos avaliados.

## Referências:

- 1- ROCHA, C. C. et al. Early pregnancy-induced transcripts in peripheral blood immune cells in *Bos indicus* heifers. *Scientific Reports*, [s. l.], 2020.
- 2- Rashid MB, Talukder AK, Kusama K, Haneda S, Takedomi T, Yoshino H, Moriyasu S, Matsui M, Shimada M, Imakawa K, Miyamoto A. Evidence that interferon-tau secreted from Day-7 embryo in vivo generates anti-inflammatory immune response in the bovine uterus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jun 12;500(4):879-884. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.178. Epub 2018 Apr 30. PMID: 29702095.
- 3- Talukder AK, Rashid MB, Takedomi T, Moriyasu S, Imakawa K, Miyamoto A. Day-7 embryos generate an anti-inflammatory immune response in peripheral blood immune cells in superovulated cows. *Am J Reprod Immunol*. 2019 Feb;81(2):e13069. doi: 10.1111/aji.13069. Epub 2018 Nov 9. PMID: 30376193.
- 4- Pugliesi G, Miagawa BT, Paiva YN, França MR, Silva LA, Binelli M. Conceptus-induced changes in the gene expression of blood immune cells and the ultrasound-accessed luteal function in beef cattle: how early can we detect pregnancy? *Biol Reprod*. 2014 Oct;91(4):95. doi: 10.1095/biolreprod.114.121525. Epub 2014 Sep 10. PMID: 25210129.

# Stimulation of the bovine conceptus in the expression of early pregnancy predictors in immune cells at the onset of diestrus

**Pedro Pisani de Freitas<sup>1</sup>; Isabella Rio Feltrin<sup>2</sup>; Guilherme Pugliesi<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science / University of São Paulo – USP, SP, Brazil; <sup>2</sup>São Paulo State University - UNESP, Botucatu, SP, Brazil.

## Objective

The objective of the study was to determine whether biomarkers recently identified (*RSAD2* and *IFI44*) through RNASeq (Rocha et al., 2020) are stimulated by the presence of the bovine conceptus at the beginning of diestrus in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Therefore, we aim to test the hypothesized that these transcripts may present an earlier and more pronounced response to interferon-tau (IFN-t) stimulation compared to classical genes stimulated by IFN- t (ISGs).

## Methods and Procedures

### Experiment 1

Blood samples (25 mL) were collected from Nelore cows (*Bos taurus indicus*, N=9) between days 10-12 after ovulation (D0 = day of ovulation) through jugular vein puncture in sodium heparinized tubes (BD Vacutainer) for isolation of PBMCs. PBMCs were isolated by density gradient centrifugation using a Ficoll-Paque solution (GE Healthcare), according to the protocol described by (Pugliesi et al. 2014). After isolation, PBMCs ( $7 \times 10^6$  cells/mL) were cultured in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, Ref. 22400071) supplemented with inactivated Fetal Bovine Serum (LGC, 10-bio-500), and Penicillin-Streptomycin (Sigma-Aldrich), with

(rIFNT group) or without (Control group) the presence of recombinant ovine IFN-t (rIFN-t; 100 ng/mL). The cells were cultured for 24 hours, in a humidified atmosphere at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. At the end of the culture period, the viability was assessed by Trypan blue (0.4%; Sigma Aldrich) staining. The collected cells were directed to RNA extraction and subsequent analysis of gene expression by RT-PCR. The RNA was extracted using PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™). The isolated RNA from samples were treated with DNase I to avoid genomic DNA contamination. Finally, RNA isolated was subjected to reverse transcription to the cDNA synthesis. Analyses of relative abundance of transcripts were performed using SYBR Green PCR Master Mix (Life Technologies) for amplification reactions in a Step One Plus thermocycler (Life Technologies). The relative expression of two reference genes (*PPIA* and *GAPDH*) and three target genes (*RSAD2*, *IFI44* and *ISG15*) was analyzed.

### Experiment 2

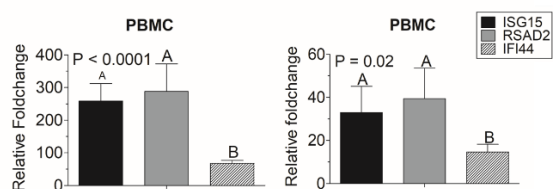
Blood samples were collected from Nelore cows (N=10) for the isolation of PBMCs using the same method described in Experiment 1. Isolated PBMC ( $7 \times 10^6$  cells/mL) were cultured in UF from cows in day-18 of diestrus phase (UF-

Control) or from day-18 pregnant cows (UF-Conceptus) both containing 0.1% FBS (LGC, Ref. 10-bio-500) for 12 hours, in a humidified atmosphere at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. RNA extraction and subsequent analysis of gene expression by RT-PCR was performed as described in Experiment 1.

## Results

In both experiments, expression of all *target genes* was greater ( $P < 0.05$ ) in PBMCs treated with rIFNT and UF-Conceptus than its controls. The fold change in rIFNT and UF-Conceptus-treated PBMC was greater ( $P < 0.05$ ) for *ISG15* and *RSAD2*, than for *IFI44* gene.

**Graph 1-** Fold change from Experiment 1 and 2.



## Conclusion

It is concluded that both the classical ISG (*ISG15*) assessed and the new marker *RSAD2* showed a higher response to IFN- $\tau$  and UF-Conceptus stimulation when compared to the *IFI44* gene in PBMCs. Their similar efficiency in responding to bovine conceptus stimulation may serve as a basis for the combined use of classical and non-classical ISGs to enhance early pregnancy diagnosis in cattle. Furthermore, the results of the conducted experiments suggest that IFN- $\tau$  is the primary constituent secreted by the bovine conceptus in maternal-embryonic communication for the stimulation of the evaluated transcripts.

## References:

- 1- ROCHA, C. C. et al. Early pregnancy-induced transcripts in peripheral blood immune cells in *Bos indicus* heifers. *Scientific Reports*, [s. l.], 2020.
- 2- Rashid MB, Talukder AK, Kusama K, Haneda S, Takedomi T, Yoshino H, Moriyasu S, Matsui M, Shimada M, Imakawa K, Miyamoto A. Evidence that interferon-tau secreted from Day-7 embryo in vivo generates anti-inflammatory immune response in the bovine uterus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Jun 12;500(4):879-884. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.178. Epub 2018 Apr 30. PMID: 29702095.
- 3- Talukder AK, Rashid MB, Takedomi T, Moriyasu S, Imakawa K, Miyamoto A. Day-7 embryos generate an anti-inflammatory immune response in peripheral blood immune cells in superovulated cows. *Am J Reprod Immunol*. 2019 Feb;81(2):e13069. doi: 10.1111/aji.13069. Epub 2018 Nov 9. PMID: 30376193.
- 4- Pugliesi G, Miagawa BT, Paiva YN, França MR, Silva LA, Binelli M. Conceptus-induced changes in the gene expression of blood immune cells and the ultrasound-accessed luteal function in beef cattle: how early can we detect pregnancy? *Biol Reprod*. 2014 Oct;91(4):95. doi: 10.1095/biolreprod.114.121525. Epub 2014 Sep 10. PMID: 25210129.