

## **Title: Studies of early pregnancy-induced transcripts in peripheral blood immune cells in cattle**

### **Abstract**

In cattle, the largest part of embryonic loss occur during the first three weeks of pregnancy. Thus, to study and detect those loses as early as possible some points are key to improve reproductive efficiency. Half of the genetic material of the conceptus is allogenic to the maternal immune system. In this regard, the elucidation of the immune events is important during early pregnancy. Moreover, that moment is coincident with the release by the conceptus of the main glycoprotein signal, interferon- $\tau$  (IFN- $\tau$ ). Interferon- $\tau$  is released in the circulation and stimulates some genes (ISGs). The study of the expression of the most common ISGs (*ISG15*, *OAS1*, *MX1* e *MX2*) in immune cells has already been used before as an early pregnancy diagnosis, however, the accuracy was low. Therefore, considering the deficiency of studies on the immunology of pregnancy we tested the follow hypotheses: (1) at day 18 of pregnancy, novel genes beyond the traditional ISGs would be differentially expressed (DE) in immune cells of pregnant and non-pregnant heifers, which would allow the selection of potential pregnancy markers before day 20. Also, (2) the DE genes discovered would be linked with pathways of the immune response, which would be differentially expressed between animal parity categories and regulated in subspecies (*taurus* and *indicus*). This dissertation consists of two studies. The first study was designed to detect novel genes by RNA sequence (RNAseq). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) RNA from day 18 post-fixed timed artificially inseminated (AI) Nelore heifers was subject to RNAseq. The transcripts profile was evaluated in PBMC and peripheral blood polymorphonuclear cells (PMN) among days 10 to 20 by qPCR. In summary, 9 and 5 out of the 20 genes evaluated were considered potential pregnancy markers in PBMC and PMN respectively. In the second study, the RNAseq results were submitted to enrichment analysis (GO, KEGG, and pathway score regulation) to elucidate the main pathway regulated in early pregnancy. The genes found were evaluated in whole blood from Holstein cows and heifers on D16, 19 and 23 post AI. Another *in vitro* experiment was performed to test if the genes linked to the pathway were stimulated by IFN- $\tau$ . For this purpose, uterine explants were cultured with mammalian medium with no supplementation, with PBS, and with recombinant IFN- $\tau$ , for 2 and 24 hours. As a result, the most significant pathway was linked with the pattern recognition receptors (PRRs). Eighteen genes were evaluated and seven of them showed

an interaction between pregnancy status, animal category and time. Where for that seven genes on D23 the P-HF had a greater expression than NP-HF. All seven genes belong to the Toll like or Nod like receptors pathway. However, the *in vitro* results showed and effect of culture for all groups and we could not concluded if the regulation was mediated only by IFN- $\tau$ . In conclusion, early pregnancy induces differential changes on the immune system of beef and dairy heifers, compared with cows. The difference became obvious specially during the post implantation period (D23). In summary, we accepted the hypothesis that novel transcripts beyond the traditional ISGs could potentially be used as pregnancy markers and that the main pathway during early pregnancy in immune cells is linked with the immune response, which is regulated between subspecies and differentially expressed between parity category.

**Keywords:** conceptus, interferon tau, immune system, toll like receptors, pregnancy diagnosis.

#### Resumo:

Em bovinos grande parte das perdas embrionárias ocorrem até as três primeiras semanas de gestação. Estuda-las e detecta-las o mais precocemente, são importantes pontos para melhorar a eficiência reprodutiva. O fato do conceito possuir 50% do material genético “estranho” ao sistema imune materno, evidencia a importância de elucidar os acontecimentos imunes nesse período inicial. Além disso, nesse momento, a principal glicoproteína sinalizadora do conceito (IFN- $\tau$ ) é liberada na circulação e estimula a expressão de genes (ISGs). O estudo da expressão gênica dos mais comuns ISGs (*ISG15*, *OAS1*, *MX1* e *MX2*) em células imunes do sangue periférico já foi utilizado como forma de diagnóstico precoce de gestação, entretanto a acurácia foi baixa. Considerando-se a deficiência de pesquisas sobre a imunologia de gestação. Testou-se as hipóteses de que (1) no dia 18 de gestação novos genes além dos tradicionais ISGs seriam diferencialmente expressos (DE) em células imunes de animais gestantes e não gestantes, que permitiriam a seleção de potenciais marcadores da gestação antes do dia 20. E (2) que os genes DE descobertos, estariam relacionados com vias da resposta imunológica as quais seriam diferencialmente expressas entre categoria animal de paridade, mas regulada em ambas subespécies (*taurus* e *indicus*). Esta dissertação consiste de 2 estudos. O primeiro estudo foi realizado para detecção de novos genes através da técnica de

sequenciamento de RNA (RNAseq). Para isso foi utilizado células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de novilhas Nelore, no dia 18 após a inseminação artificial (AI) em tempo fixo. O perfil de transcritos selecionados, foram estudados em PBMC e células polimorfonucleares do sangue periférico (PMN) entre os dias 10 e 20 após a IA por qPCR. Conclui-se que dos 20 genes avaliados, 9 demonstraram-se potenciais marcadores da gestação em PBMC e 5 em PMN. No segundo estudo os resultados de RNAseq foram submetidos a análises de enriquecimento (GO, KEGG e score de regulação de vias) para a elucidação das principais vias no início da gestação. Os genes pertencentes a via selecionada foram validados no sangue total de vacas e novilhas Holandesas nos dias 16, 19 e 23 após inseminação. Outro experimento *in vitro* foi realizado, para testar se a via era estimulada por IFN- $\tau$ . Para isso cortes endometriais foram cultivados com meio de cultura, PBS e IFN- $\tau$  por 2 e 24 horas. Como resultados a via de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) foi a mais significativa e consequentemente avaliada. De 18 genes avaliados sete apresentaram interação entre status gestacional, categoria animal e tempo, os quais estão envolvidos com receptores Toll like e Nod like. A interação aconteceu por aumento de expressão no dia 23 em novilhas gestantes. Entretanto os resultados do experimento *in vitro* apresentaram efeitos de cultivo para todos os grupos, impossibilitando definir se os genes estudados são estimulados por IFN- $\tau$ . Conclui-se que a gestação inicial exerce influência sobre o sistema imune de novilhas de corte e de leite, diferentemente de vacas. E que a diferença entre categorias acontece no período após a implantação (D23). Sendo assim, aceitamos a hipótese de que novos transcritos além dos tradicionais ISGs podem ser utilizados como marcadores de gestação e que a principal via em células imunes durante a gestação está relacionada a resposta imune, a qual é regulada em ambas subespécies e diferencialmente expressa entre categorias de paridade.

Palavras chave: concepto, interferon-tau, sistema imune, receptores toll like, diagnóstico de gestação.