

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**Amanda Luiza Prante**

**INFLUÊNCIA DO ESTRESSE TÉRMICO NA SECREÇÃO DE  
INTERFERON TAU POR EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN  
VITRO: ALTERAÇÃO NA EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS  
LUTEAIS**

**Santa Maria, RS**

**2023**

Prante, Amanda Luiza  
INFLUÊNCIA DO ESTRESSE TÉRMICO NA SECREÇÃO DE  
INTERFERON TAU POR EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO:  
ALTERAÇÃO NA EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS LUTEAIS / Amanda  
Luiza Prante.- 2023.  
57 p.; 30 cm

Orientador: Alfredo Quites Antoniazzi  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2023

1. Corpo Lúteo Bovino 2. Interferon Tau 3. Estresse  
Térmico I. Antoniazzi, Alfredo Quites II. Título.

**Amanda Luiza Prante**

**INFLUÊNCIA DO ESTRESSE TÉRMICO NA SECREÇÃO DE  
INTERFERON TAU POR EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN  
VITRO: ALTERAÇÃO NA EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS  
LUTEAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Alfredo Quites Antoniazzi

Santa Maria, RS

2023

**Amanda Luiza Prante**

**INFLUÊNCIA DO ESTRESSE TÉRMICO NA SECREÇÃO DE INTERFERON TAU  
POR EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO: ALTERAÇÃO NA  
EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS LUTEAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

**Aprovado em 09 de março de 2023:**

---

**Alfredo Quites Antoniazzi, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/ Orientador)

---

**Alessandra Bridi, Dra. (USP)**

---

**Carlos Eduardo Porciuncula Leonardi, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, RS.  
2023

## RESUMO

### INFLUÊNCIA DO ESTRESSE TÉRMICO NA SECREÇÃO DE INTERFERON TAU POR EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN VITRO: ALTERAÇÃO NA EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULAS LUTEAIS

AUTORA: Amanda Luiza Prante

ORIENTADOR: Alfredo Quitês Antoniazzi

Entre os principais fatores que afetam diretamente a eficiência e a rentabilidade da cadeia produtiva de ruminantes, está a influência do ambiente, genética e sanidade dos animais. A redução das taxas de concepção durante os meses de calor pode ser de 20 a 30% comparado aos meses de conforto térmico. A influência do estresse térmico na redução da fertilidade é um problema de ordem multifatorial, comprometendo o funcionamento de diferentes tecidos e tipos celulares. O estresse térmico impacta diretamente no período de desenvolvimento embrionário inicial, na formação e desenvolvimento do corpo lúteo competente e no reconhecimento materno da gestação. Este é o período que ocorre nos primeiros dias após a fecundação, onde o conceito sinaliza sua presença para a mãe buscando aumentar a vida útil do corpo lúteo, evitando a luteólise ao bloquear a síntese de prostaglandina F2 alfa. Sabe-se que embriões bovinos sintetizam e secretam IFNT tão cedo quanto o dia 07 de desenvolvimento, e que embriões submetidos ao estresse térmico, *In Vitro* reduzem a produção de IFNT no dia 7 de desenvolvimento embrionário. Nossa hipótese é que a via de sinalização do IFNT em células luteais é alterada em decorrência da menor produção de IFNT pelos embriões bovinos submetidos ao estresse térmico. Nosso objetivo foi avaliar a resposta de um cultivo primário de células luteais bovinas cultivadas com meio condicionado de embriões produzidos *in vitro* sob estresse térmico. Após o estresse térmico dos embriões produzidos *in vitro*, conforme descrito por Amaral et al, (2020). O primeiro experimento foi realizado com o objetivo de avaliar a resposta das células luteais bovinas tratadas com diferentes doses de roIFNT, sendo elas 0ng, 0,1ng e 1ng de roIFNT, onde o meio era composto de 60% DMEM e 40% SOF + roIFNT. Já o segundo experimento buscou avaliar o efeito do meio condicionado dos embriões estressados sob o cultivo primário de células luteais bovinas, sendo os grupos: sem influência dos embriões (NE), grupo mantido sob temperatura normal de cultivo *In Vitro* de embriões (EC), grupo estressado durante a fase de maturação *In Vitro* (IVM), grupo estressado durante a fertilização *In Vitro* (IVF), grupo estressado durante o cultivo *In Vitro* (IVC) e o grupo que foi submetido ao aumento de temperatura em todas as fases da produção *In Vitro* de embriões (MFC). Concluímos que o meio condicionado de embriões submetidos ao estresse térmico durante o desenvolvimento embrionário, foi capaz de alterar a expressão de genes estimulados por IFNT em cultivo primário de células do corpo lúteo bovino, nas 6 horas. Além de alterar a expressão de genes relacionados a angiogênese, nas 18 horas.

Palavras-chave: estresse térmico, corpo lúteo, bovinos.

## **ABSTRACT**

### **INFLUENCE OF THERMAL STRESS ON INTERFERON TAU SECRETION BY BOVINE EMBRYOS PRODUCED IN VITRO: ALTERATION IN GENE EXPRESSION IN LUTEAL CELLS**

**AUTHOR:** Amanda Luiza Prante

**ADVISOR:** Alfredo Quites Antoniazzi

Among the main factors that directly affect the efficiency and profitability of the ruminant production chain is the influence of the environment, genetics and animal health. The reduction in conception rates during hot months can be 20 to 30% compared to months of thermal comfort. The influence of heat stress on fertility reduction is a multifactorial problem, compromising the functioning of different tissues and cell types. Thermal stress has a direct impact on the period of early embryonic development, on the formation and development of the competent corpus luteum and on maternal recognition of pregnancy. This is the period that occurs in the first days after fertilization, when the conceptus signals its presence to the mother, seeking to increase the useful life of the corpus luteum, avoiding luteolysis by blocking the synthesis of prostaglandin F2 alpha. It is known that bovine embryos synthesize and secrete IFNT as early as day 07 of development, and that embryos subjected to heat stress, In Vitro, reduce IFNT production on day 7 of embryonic development. Our hypothesis is that the IFNT signaling pathway in luteal cells is altered as a result of lower IFNT production by bovine embryos subjected to heat stress. Our aim was to evaluate the response of a primary culture of bovine luteal cells cultured with conditioned medium from embryos produced in vitro under heat stress. After thermal stress of embryos produced in vitro, as described by Amaral et al, (2020). The first experiment was carried out with the objective of evaluating the response of bovine luteal cells treated with different doses of roIFNT, namely 0ng, 0.1ng and 1ng of roIFNT, where the medium was composed of 60% DMEM and 40% SOF + roIFNT . The second experiment, on the other hand, sought to evaluate the effect of the conditioned medium of the stressed embryos under the primary culture of bovine luteal cells, being the groups: without influence of the embryos (NE), group kept under normal temperature of In Vitro culture of embryos (EC), group stressed during the In Vitro maturation phase (IVM), group stressed during In Vitro fertilization (IVF), group stressed during In Vitro cultivation (IVC) and the group that was submitted to temperature increase in all stages of production In Vitro Embryos (MFC). We conclude that the conditioned medium of embryos subjected to thermal stress during embryonic development was able to change the expression of genes stimulated by IFNT in primary culture of bovine corpus luteum cells, at 6 hours. In addition to altering the expression of genes related to angiogenesis, within 18 hours.

**Keywords:** heat stress; corpus luteum; bovine.

## LISTA DE FIGURAS

Figure 1: Relative mRNA expression of steroidogenic genes (StAR, P450 and 3 $\beta$ HSD) at 6h, 12h and 18h of luteal cells treated with conditioned medium from HS embryos during oocyte maturation (IVM), fertilization (IVF), the first day of embryo culture (IVC) or combinations of all treatments (MFC: IVM + IVF + IVC). Bars represent means  $\pm$  SEM in replicates. Different letters indicate significance ( $p < 0.05$ ) among groups. 43

Figure 2: Results of relative mRNA expression of interferon stimulated genes luteal cells, at 6h, 12h and 18h of treated with 0ng, 0,1ng and 1ng of roIFNT, the evaluated genes were ISG15, OAS1, MX1 and MX2. Bars represent means  $\pm$  SEM in replicates. Different letters indicate significance ( $p < 0.05$ ) among groups. 43

Figure 3: Results of relative mRNA expression of interferon stimulated genes luteal cells, at 6h, 12h and 18h of treated with conditioned medium from HS embryos during oocyte maturation (IVM), fertilization (IVF), the first day of embryo culture (IVC) or combinations of all treatments (MFC: IVM + IVF + IVC) ISG15, OAS1, MX1 and MX2. Bars represent means  $\pm$  SEM in replicates. Different letters indicate significance ( $p < 0.05$ ) among groups. 43

Figure 4: Relative mRNA expression of angiogenesis gene (VEGF) and cell survival (AKT and XIAP) in different groups of luteal cells at 6h, 12h and 18h of treated with conditioned medium from HS embryos at different stages of development, at oocyte maturation (IVM), at fertilization (IVF), on the first day of in vitro culture (IVC) and at all stages of embryonic development (MFC: IVM + IVF + IVC). Bars represent the group means  $\pm$  SEM in replicates. Different letters indicate significance ( $p < 0.05$ ) between groups. 43

## LISTA DE TABELAS

Table 1. **Forward and reverse primers sequences of target and reference genes used for quantitative polymerase chain reaction** ISG15 (ISG15 ubiquitin-like protein); MX1 (myxovirus resistance 1); MX2 (myxovirus resistance 2); OAS1 (2'-5'-oligoadenylate synthetase); 3 $\beta$ HSD (3 $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase); P450 (cytochrome P450); StAR (acute regulatory protein of steroidogenesis); AKT-1 (protein kinase B); XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein); VEGF (endothelial growth factor); ACTB (b-actin); GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase); RPL19 (60S L19 ribosomal protein). 42



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1 IMPACTO DO ESTRESSE TÉRMICO NOS ÍNDICES REPRODUTIVOS.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO EM RUMINANTES.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2.1 O Interferon Tau.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.2 Ações do Interferon Tau.....</b>	<b>8</b>
<b>3 CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>12</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>15</b>
<b>2. Materials and methods .....</b>	<b>16</b>
<b>3. Results .....</b>	<b>20</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>22</b>
<b>Declaration of interest .....</b>	<b>24</b>
<b>Funding.....</b>	<b>25</b>
<b>Acknowledgments .....</b>	<b>25</b>
<b>References.....</b>	<b>26</b>
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>5 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é o maior exportador de carne bovina no mundo, além de ser o segundo maior produtor, além de possuir o segundo maior rebanho comercial de bovinos no mundo (ABIEC, 2020). Sendo que no atual cenário mundial, a pecuária, junto com a agricultura terão que expandir sua produção para suprir a demanda alimentar da população humana projetada em aumentar até 30% até 2050 (FAO 2009). Entre os principais fatores de maior importância e que afetam diretamente a eficiência produtiva e a rentabilidade da cadeia produtiva de carne, está a influência do ambiente, genética e sanidade dos animais.

As perdas gestacionais, dentro dos rebanhos, ocorrem em diferentes fases de gestação por diversos fatores, ocorrendo com maior frequência nos primeiros 30 dias. Após uma inseminação artificial, em média, apenas 30% das vacas em lactação concebem, ocorrendo uma redução ainda maior quando os animais estão expostos a condições ambientais desfavoráveis (Wiltbank et al., 2016). A redução das taxas de concepção durante os meses de calor pode estar entre 20 a 30% comparado aos meses de conforto térmico (de Rensis & Scaramuzzi, 2003), os efeitos do estresse térmico causado pelo calor, ainda podem ser observados no outono, devido a influência na foliculogênese (Roth et al., 2001). Portanto os índices reprodutivos não dependem apenas do manejo sanitário, da genética e nutrição animal, mas do ambiente onde estão inseridos. Sendo o estresse térmico um dos principais problemas encontrados em países tropicais e subtropicais, causando redução na produção e reprodução desses rebanhos.

O ambiente de estresse térmico é determinado pelo clima de cada região, tendo grande influência sobre a fisiologia animal. Neste ambiente os principais fatores climáticos que influenciam a ocorrência do estresse térmico são: temperatura, umidade relativa do ar, radiação solar e velocidade do ar, juntas elas formam uma única variável para determinar a temperatura efetiva (Dikmen & Hansen, 2009). Sendo a temperatura e a umidade relativa do ar os fatores com maior influência sobre um ambiente que gera prejuízo pelo estresse térmico (Kadokawa et al., 2012). Em bovinos leiteiros, a hipertermia pode ocorrer mesmo em temperaturas de 25 a 28°C, quando a umidade relativa do ar estiver elevada (Sartori et al., 2002). Clinicamente quando os bovinos apresentam temperatura retal de 39°C é um parâmetro considerado dentro dos parâmetros fisiológicos para a espécie, porém estudos mostram que animais sob estresse térmico e com temperatura de 39°C já apresentam perdas na produção de leite e na fertilidade (Schüller et al., 2014).

A influência do estresse térmico na redução da fertilidade, é um problema de ordem multifatorial, comprometendo o funcionamento de tecidos e tipos celulares. Estudos demonstram que vacas submetidas ao estresse térmico apresentam uma redução do fluxo sanguíneo uterino com diminuição da troca de calor e conseqüente aumento de temperatura interna do útero (Gwazdauskas et al., 1981). Foi observado que vacas holandesas que concebem no verão apresentam 12,3% de perdas embrionárias quando comparadas as que emprenharam no inverno e apresentaram perdas de 2,1% de perdas (García-Ispuerto et al., 2006).

O estresse térmico impacta diretamente no período de desenvolvimento embrionário inicial, na formação e desenvolvimento do corpo lúteo competente e no reconhecimento materno da gestação. Para ocorrer o reconhecimento materno da gestação em ruminantes é essencial a formação de um corpo lúteo especializado na síntese de progesterona. Onde o tamanho do corpo lúteo é diretamente proporcional à concentração sérica de progesterona (Ribeiro et al., 2016). Estudos demonstraram que vacas sob a influência do estresse térmico apresentem um corpo lúteo menos e com menor capacidade de produzir progesterona (Macías-Cruz et al., 2016). Portanto, o entendimento dos efeitos diretos e indiretos do estresse térmico no desenvolvimento embrionário inicial e sua sinalização para que ocorra o reconhecimento materno da gestação de forma adequada a manter a gestação a termo, é fundamental para minimizar perdas econômicas e melhorar os índices reprodutivos e produtivos.

Portanto, nossa hipótese é que a via de sinalização do IFNT em células luteais é alterada em decorrência da menor produção de IFNT pelos embriões bovinos submetidos ao estresse térmico. Nosso objetivo busca avaliar a influência do estresse térmico na comunicação de embriões submetidos ao estresse térmico, com cultivo primário de células luteais bovinas.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 IMPACTO DO ESTRESSE TÉRMICO NOS ÍNDICES REPRODUTIVOS**

O aquecimento global tem provocado nos mamíferos o aumento da temperatura corporal acima dos parâmetros fisiológicos homeotérmico, levando a hipertermia, que gera o estresse térmico e comprometimento das funções fisiológicas e reprodutivas (Boni, 2019). O estresse térmico ocorre quando os animais se encontram fora da sua zona de conforto térmico, podendo ocorrer pela elevação da temperatura ambiente (também definida como estresse calórico), como pela diminuição das temperaturas. Sendo uma consequência da inabilidade dos animais dissiparem ou produzirem calor para manter sua temperatura fisiológica normal (Slimen et al., 2014). Um dos principais fatores relacionado com perdas reprodutivas e produtivas dentro dos rebanhos bovinos é o estresse térmico (de Rensis & Scaramuzzi, 2003).

É difícil a definição de estresse térmico devido a fatores como variabilidade genética e ambiental, sendo utilizados a temperatura e a umidade relativa do ar, que possuem grande influência na termorregulação dos animais, como referência para o estabelecimento do estresse térmico (Boni, 2019; Boni et al., 2014; Kadokawa et al., 2012). Na produção de leite a exigência metabólica dos animais é maior, ocorrendo uma redução nos índices do rebanho, relacionados a eficiência reprodutiva de animais em estresse térmico (de Rensis & Scaramuzzi, 2003). Porém foi demonstrado que, a temperatura retal de 39°C considerada um parâmetro fisiológico normal para a espécie, já pode causar perdas na produção e fertilidades desses animais (Schüller et al., 2014).

Já foi observado que vacas em lactação possuem um maior aumento da temperatura corporal em resposta ao ambiente que estão inseridas, quando comparados a categoria de novilhas (Sartori et al., 2002), isso ocorre, pois entre as diferentes categorias presentes dentro de um rebanho leiteiro, vacas em lactação, apresentam maior ingestão de matéria seca. Esses nutrientes são absorvidos, metabolizados e geram calor, que precisam ser dissipados pelos animais. Ao se encontrar em estresse térmico, esses animais apresentam maior dificuldade em dissipar esse calor e realizar sua termorregulação (de Rensis & Scaramuzzi, 2003; Kadokawa et al., 2012). Por consequência o estresse térmico reduz o consumo da matéria seca (Ammer et al., 2018), o que leva os animais a desenvolverem doenças relacionadas a alteração da atividade ruminal, como acidose ruminal subaguda e cetose (Polsky & von Keyserlingk, 2017), observando, por tanto, uma maior susceptibilidade aos prejuízos causados pelo estresse térmico por calor no grupo de vacas em lactação (P. J. Hansen, 2009; Sartori et al., 2002).

Quanto a reprodução, quando comparamos os meses de conforto e estresse térmico, observamos uma redução de 20 a 30% na taxa de concepção de vacas (de Rensis & Scaramuzzi, 2003), além disso estudos que comparam a sensibilidade de animais expostos ao estresse térmico no ato da concepção e nos 60 dias iniciais de gestação demonstraram que essa exposição gera maior susceptibilidade a perdas gestacionais, quando comparadas a vacas não expostas ao estresse térmico (de Rensis et al., 2015). Essa diminuição na taxa de concepção pode ser observada ainda no outono, onde a foliculogênese é influenciada pelas altas temperaturas da estação anterior (Roth et al., 2001).

Entre os fatores que influenciam a redução das taxas reprodutivas relacionadas ao estresse térmico, podemos citar a inibição ou redução da ovulação de vacas leiteiras (Wilson, Marion, et al., 1998; Wolfenson et al., 2000), o que pode estar relacionado a diminuição dos níveis circulantes de progesterona, estradiol e (Das et al., 2016; de Rensis & Scaramuzzi, 2003; Wilson, Kirby, et al., 1998). O estresse térmico foi relacionado ao atraso da luteólise (Howell et al., 1994; Wilson, Kirby, et al., 1998), por consequência aumenta as chances de ocorrer a inibição da fertilização, do desenvolvimento embrionário e do reconhecimento materno da gestação (Sartori et al., 2002).

O estresse térmico está entre os fatores que comprometem a eficiência dos gametas femininos e masculinos, assim como a viabilidade embrionária. Estudos *in vivo* sugerem uma relação entre a temperatura ambiente no dia da inseminação artificial e a taxa de morte de embriões (de Rensis et al., 2015). Estudos *in vitro* também relataram que a alta temperatura durante a fertilização reduziu a competência embrionária (Sakatani, 2017). Já foi demonstrado que embriões submetidos ao estresse térmico reduzem a produção de IFNT *in vitro* (Amaral et al., 2020) o que compromete o reconhecimento materno da gestação.

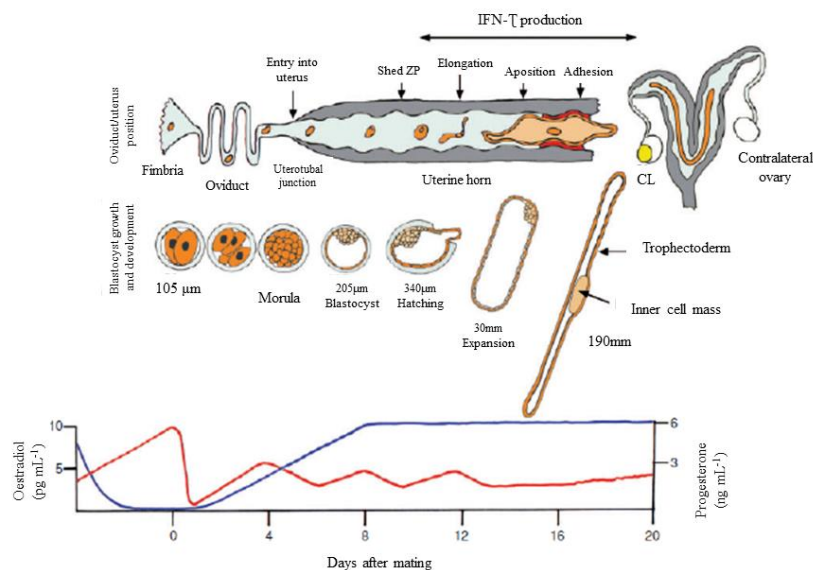
## 2.2 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO EM RUMINANTES

É o período que ocorre nos primeiros dias após a fecundação, onde o conceito sinaliza sua presença para a mãe, através da secreção e IFNT, buscando aumentar a vida útil do corpo lúteo, evitando a luteólise ao bloquear a síntese de prostaglandina F2 alfa (PGF), mantendo o corpo lúteo funcional e evitando o retorno a ciclicidade (Niswender et al., 2000; Spencer & Bazer, 2004). Nos ruminantes esse período ocorre com o alongamento do embrião e a máxima secreção de Interferon-tau (IFNT) pelas células do trofoblasto embrionário no período de pré-implantação (Bazer, 2013; Spencer et al., 2007).

Ao manter o corpo lúteo funcional, mantém-se a produção de progesterona que atua no útero estimulando e mantendo as funções uterinas necessárias para o desenvolvimento embrionário inicial, implantação, placentação e desenvolvimento fetal e placentário (Spencer & Bazer, 2004).

O desenvolvimento embrionário ocorre após a fecundação do oócito com o espermatozoide. Ocorre o estabelecimento da singamia, quando o embrião passa pela fase de zigoto. Em seguida ocorre sucessivas mitoses, até a fase de mórula. Estas fases do desenvolvimento ocorrem a partir da fecundação até o embrião entrar no útero, correspondendo aos dias 4 a 6. Após a entrada no útero ocorre a evolução para o estágio de blastocisto inicial, com a formação da blastocela, ocorre o estabelecimento de dois tipos celulares, o trofoblasto e a massa celular interna. Entre os dias 8 a 9 o blastocisto inicia se desenvolve e expande, até ocorrer a eclosão da zona pelúcida. Neste momento o blastocisto passa a alongar-se para forma tubular, buscando preencher todo o espaço intrauterino (Figura 1). A expressão de IFNT aumenta conforme o desenvolvimento do embrião, ocorrendo um pico máximo de produção entre os dias 18 e 20 (Hirayama et al., 2014).

Figura 1 - Desenvolvimento embrionário inicial em ruminantes.



Fonte: (Spencer et al., 2007).

A secreção de IFNT pelo conceito ovino ocorre na fase de alongamento, com o pico de secreção entre os dias 14 e 16 de gestação (Roberts et al., 1996). Em bovinos, este período

ocorre entre os dias 12 e 26, com o pico entre os dias 18 a 20 (Farin et al., 1990a; Hirayama et al., 2014). O IFNT é a principal citocina secretada pelas células do trofoblasto embrionário, responsável pela sinalização durante o reconhecimento materno da gestação (T. R. Hansen et al., 1999; Roberts et al., 1996). A sinalização parácrina ocorre pela atuação do IFNT baseia-se na inibição da transcrição de receptores de estrógeno (ESR), por consequência do receptor de ocitocina (OXTR) no epitélio luminal endometrial inibindo a liberação de PGF2 $\alpha$ , por consequência evitando o retorno a ciclicidade (Hirayama et al., 2014; Spencer & Bazer, 1996). Sendo um dos fatores mais importantes para o sucesso do reconhecimento materno e o estabelecimento da gestação, proporcionando suporte a luteostase, adesão e fixação, ao estabelecer as bases para implantação do blastocisto e placentação no endométrio (Raheem, 2017).

Foi observado que o desenvolvimento embrionário é dependente das secreções presentes no fluido uterino materno (Barnwell et al., 2016), sendo fatores que modulam as funções uterinas necessárias para manutenção da gestação, entre essas substâncias algumas são dependentes e outras independentes do embrião (Sponchiado et al., 2017). A indução de Genes Estimulados por Interferon (ISGs) ocorre em resposta ao IFNT no endométrio, estes genes são importantes na atuação da receptividade uterina e implantação do embrião (Austin et al., 2004; Sánchez et al., 2019).

Falhas na comunicação do endométrio com o embrião levam a insuficiente suporte de progesterona (Dey et al., 2004), o que predispõe perdas embrionárias durante a gestação inicial e relaciona esse fator como uma das maiores causas de infertilidade em ruminantes (Diskin & Morris, 2008). A produção insuficiente de IFNT pelo embrião está relacionado com a falha na comunicação embrionária-materna (Mann & Lamming, 2001)

### **2.2.1 O Interferon Tau**

Estudos realizados na década de 1960, identificaram que havia uma substância, responsável por adiar a manifestação do estro, que era produzida durante o período de gestação inicial (Moor & Rowson, 1966). Em 1970, foi comprovado que esta substância, era uma proteína secretada pelo embrião, sendo nomeada de trofoblastina (Martal et al., 1979). Em seguida foi descoberto que essa proteína era produzida pelas células do trofoblasto embrionário e então denominada “Proteína X” (Godkin et al., 1982); logo após renomeada como proteína do trofoblasto ovino (ovine trophoblastic protein-1 oTP-1) (Godkin et al., 1984). Ao realizar o sequenciamento da oTP-1, observou-se que sua estrutura era muito

semelhante aos interferons tipo I, portanto, sendo novamente alterada sua nomenclatura para interferon tau (Imakawa et al., 1987), utilizada até os dias de hoje.

O IFNT é uma proteína secretada em grande quantidade pelas células mononucleares do trofoblasto embrionário nos ruminantes (Farin et al., 1989). O tamanho do blastocisto é um fator determinante na quantidade de IFNT produzido (Robinson et al., 2006). A produção de IFNT coincide com o processo de alongamento embrionário, momento de transição de morfologia, passando o embrião de um formato esférico para a forma alongada e tubular (Farin et al., 1990b).

O início da expressão do IFNT é programado geneticamente independente do ambiente uterino, sendo expresso tanto em sistemas *in vivo*, como *in vitro*. Porém, a produção de IFNT é influenciada pelo ambiente uterino, pois há um aumento quando embriões produzidos *in vitro* são colocados em contato com o endométrio (Kerbler et al., 1997). O IFNT começa a ser expresso a partir do quarto dia do desenvolvimento embrionário *in vitro*, estimulado pelas células do oviduto (Talukder et al., 2018; Yao et al., 2009), bem como, fatores dependentes do embrião começam a ser modulados no endométrio, no sétimo dia após a fertilização (Sponchiado et al., 2017). Após a implantação do embrião a expressão de IFNT termina (Demmers et al., 2001), demonstrando que a produção de IFNT inicia previamente ao período clássico do reconhecimento materno da gestação.

O IFNT é considerado como uma molécula imunossupressora, uma vez que inibe a proliferação de linfócitos e desempenha um papel importante na proteção do embrião, como fator semialogênico, do ataque do sistema imunológico materno (Skopets et al., 1992). É um interferon tipo 1 (IFN-1), produzido pelos ruminantes, possui atividade antiviral, antiproliferativa e imunomoduladoras, funções características dos IFN-1 (Imakawa et al., 1987). O IFNT possui alta afinidade com receptores de IFN-1, (IFNAR1 e IFNAR2), ao ligar-se induz sua resposta por meio da sinalização JAK/STAT (Binelli et al., 2001). Estes receptores são expressos em todos os tecidos corporais e possuem como principal função interceder respostas antivirais. Estão presentes no endométrio para realizar a comunicação materna em função do IFNT produzido pelo embrião (Johnson, Austin, et al., 1999a; Johnson, Spencer, et al., 1999).

Ao ligar-se aos seus receptores, o IFNT atua ativando a via de transdução de sinais JAK/STAT, quando a proteína tirosino-quinase fosforilam a proteína STAT formando complexos multiméricos que atuam como fatores de transcrição (Binelli et al., 2001). Em



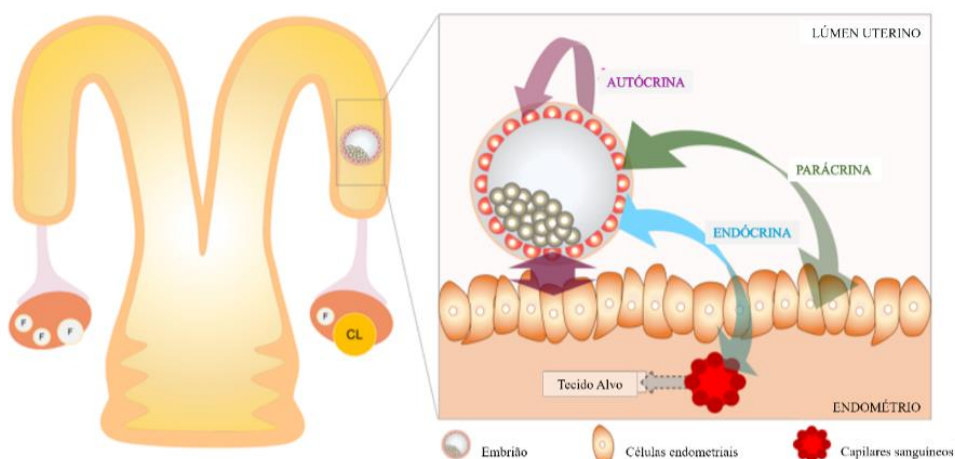
seguida estes complexos atuam por duas vias: a primeira consiste no controle da transcrição de ESR1 e por consequência do OXTR no epitélio endometrial (Spencer & Bazer, 1996), a segunda via ocorre quando os complexos se ligam em regiões específicas do DNA, conhecido como elementos responsivos a estimulação por interferons, que regulam a expressão de ISGs (Antoniazzi et al., 2010; T. R. Hansen et al., 1999).

Entre os ISGs que possuem maior expressão de mRNA durante a gestão em resposta ao IFNT, podemos citar o gene estimulado por interferon 15 (ISG15), gene de resistência ao myxovirus 1 e 2 (MX1 e MX2) e o gene 2',5'oligodenilato sintetase (OAS1 (Austin et al., 1996; Miranda et al., 1991; Ott et al., 1998). A expressão de ISGs já foi descrita durante a gestação no endométrio bovino (Austin et al., 2004; T. R. Hansen et al., 1999; Johnson, Austin, et al., 1999b), em células luteais (Antoniazzi et al., 2013a; Oliveira et al., 2008) e células do sangue (Han et al., 2006; Oliveira et al., 2008) logo após a sinalização do IFNT no período inicial da gestação em ruminantes.

### 2.2.2 Ações do Interferon Tau

Estudos realizados tanto *in vitro*, como *in vivo*, demonstram que o IFNT possui ações em tecidos uterinos e extrauterinos (Antoniazzi et al., 2013b; Bott et al., 2010b; Oliveira et al., 2008), atuando em três vias de sinalização: parácrina, autócrina e endócrina, como observamos na Figura 2.

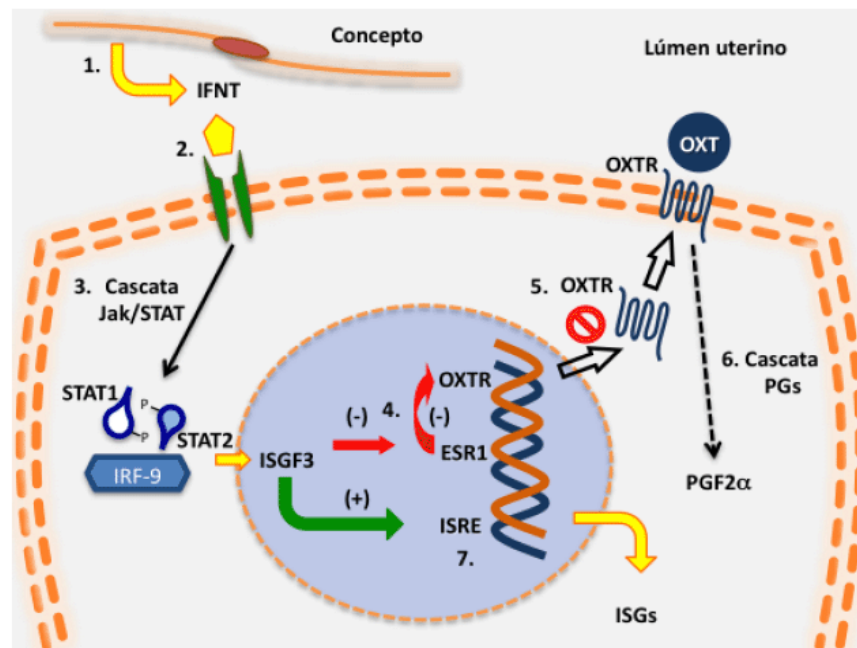
Figura 2: Via de sinalização exercida pelo IFNT durante o reconhecimento materno da gestação (via de sinalização parácrina, quando o alvo de sinalização são as células endometriais; sinalização autócrina, quando a sinalização é no próprio embrião; sinalização endócrina, ocorre pela circulação sanguínea quando os alvos são tecidos extrauterinos).



Fonte: Adaptado de (Sponchiado et al., 2019)

O mecanismo de sinalização parácrino, conhecido como via clássica de sinalização do reconhecimento materno da gestação em ruminantes, se baseia na ligação do IFNT aos seus receptores de superfície nas células do endométrio, sinalizando através da via JAK/STAT e suprimindo a expressão de receptores de estrogênio (ESR 1) e, por consequência de receptores de ocitocina no epitélio luminal do endométrio (Spencer & Bazer, 1996). Por consequência ocorre o bloqueio da produção e liberação dos pulsos de Prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) (Spencer & Bazer, 1996), hormônio responsável pelo início da luteólise (McCracken et al., 1999).

Figura 3. Via de sinalização dos reconhecimentos maternos da gestação em ruminantes.



Fonte: (Antoniazzi et al., 2010)

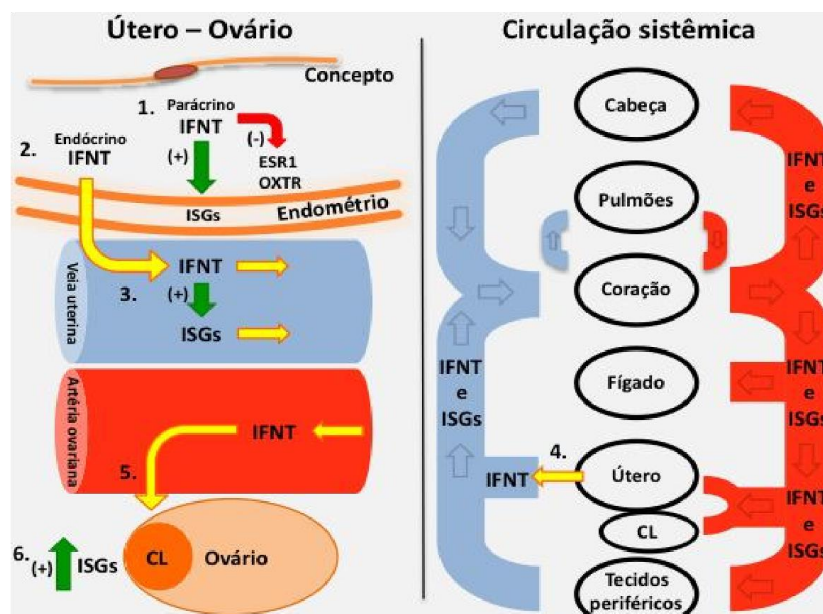
A via de sinalização autócrina foi demonstrada a partir da evidência de que o embrião expressa receptores IFNAR nas células do trofotoderma, o que indica a existência de alguma função do IFNT em suas células produtoras (Imakawa et al., 2002). Em seguida estudos observaram que o IFNT estimula a proliferação das células do trofoblasto e induz a expressão de fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), sendo esse um dos reguladores essenciais para o alongamento embrionário (Wang et al., 2013). O efeito do IFNT através de suas vias de sinalização, não ocorrem somente para o alongamento do conceitoo, mas podem influenciar na expressão do gene IFNT (Brooks et al., 2014).

Outro mecanismo de sinalização do reconhecimento materno da gestação em ruminantes é a via de sinalização endócrina. Esta sinalização é caracterizada pelas expressões

de genes estimulados por interferons (ISGs), que apresentam função biológica importante nos tecidos extrauterinos relacionada com a receptividade uterina e implantação do embrião (M. S. Kim et al., 2013). Foi observado que alguns animais gestantes possuíam a expressão de ISGs na corrente sanguínea, mais especificamente o ISG15 (Han et al., 2006), bem como em tecidos extrauterinos durante o início da gestação em ovinos (Bott et al., 2010b; Oliveira et al., 2008). Através da infusão de IFNT recombinante ovino (roIFNT) na veia uterina de ovelhas, foi demonstrado que o IFNT sai do útero através da veia uterina, em um mecanismo endócrino, onde induz a expressão de ISGs no CL, sendo capaz de atrasar a luteólise (Bott et al., 2010a).

Após comprovação do mecanismo de ação endócrino do IFNT, buscou-se avaliar sua ação em tecidos extrauterinos que podem estar envolvidos no reconhecimento materno da gestação em ruminantes. Onde através de infusão de IFNT na circulação sistêmica durante 72 horas fez com que ovelhas cíclicas conseguissem manter a concentração sérica de progesterona, compatível com a gestação, 24 horas após uma aplicação de  $\text{PGF2}\alpha$ , sugerindo que o IFNT induz a resistência luteal aos pulsos luteolíticos de  $\text{PGF2}\alpha$  (Antoniazzi et al., 2013).

Figura 4. Mecanismo de ação endócrino do reconhecimento materno da gestação em ruminantes.



Fonte: (Antoniazzi et al., 2010)

Entre os tecidos extrauterinos que apresentam a expressão de ISGs, podemos citar o corpo lúteo (CL) (Antoniazzi et al., 2013b; Bott et al., 2010a; Oliveira et al., 2008). O CL é uma glândula endócrina transitória, formada após a ruptura do folículo ovulatório, exerce papel importante na regulação do ciclo estral e na manutenção da gestação, através da produção de progesterona (Stocco et al., 2007). Quando não ocorre o reconhecimento da gestação, o CL regride para permitir o início de um novo ciclo estral (Sakamoto et al., 1995). Portanto o principal tecido do organismo que produz progesterona em fêmeas durante o ciclo estral e gestação é o corpo lúteo (Diaz et al., 2002). O CL é altamente vascularizado, com até 50% de suas células compostas por células endoteliais, que formam vasos sanguíneos (Davis et al., 2003). Entre os fatores angiogênicos presentes no CL está o Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor) (Garrido et al., 1993). Os fatores angiogênicos, como VEGF, estão relacionados com a indução de metaloproteínas de matriz (MMPs) nas células endoteliais do CL (Sato et al., 2000), estas são responsáveis pela remodelação e reorganização tecidual e estão envolvidas na regulação e na inibição do crescimento do CL (Kliem et al., 2007).

A ativação contínua de MMPs pelas células luteais resulta na remissão e degradação do CL (S. H. Kim et al., 2019). Essa remissão e degradação do CL é conhecida como luteólise, processo que ocorre a regressão funcional e estrutural do CL, caracterizado pela queda na produção de progesterona e apoptose das células do CL (Knickerbocker et al., 1988). A luteólise deve ocorrer entre os dias 15 a 17 do ciclo estral de bovinos, quando não há a sinalização do IFNT pelo embrião no ambiente uterino, portanto para que ocorra o reconhecimento materno da gestação o embrião deve sinalizar e evitar que a luteólise ocorra (Bazer & First, 1983).

### **3 CAPÍTULO 1**

## **Conditioned medium by bovine in vitro-produced embryos under heat stress modulate IFNT pathway-associated genes in the luteal cells culture**

Amanda Luiza Prante and Alfredo Quites Antoniazzi

2023

Artigo a ser submetido para a revista *Molecular Reproduction & Development*.

**Conditioned medium by bovine in vitro-produced embryos under heat stress modulate IFNT pathway-associated genes in the luteal cells culture**

Amanda Luiza Prante<sup>1</sup>, Alfredo Q. Antoniazzi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biotechnology and Animal Reproduction, BioRep, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima 1000, ZIP code 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

**\*Corresponding author:**

Email: [alfredo.antoniazzi@ufsm.br](mailto:alfredo.antoniazzi@ufsm.br)

Phone: + 55 (55) 3220 8587

**Short title:** Communication modulation of stressed embryos and primary culture of bovine luteal cells

## **Abstract**

Heat stress impacts the reproduction of ruminants and directly influences on the production of interferon tau (IFNT) by embryos. IFNT is the main cytokine responsible for maternal recognition of pregnancy, with great importance in embryo-maternal communication. Our objective is to evaluate the ISGs, angiogenesis, cell survival and steroidogenic genes on luteal primary cells culture treated with heat stressed embryo conditioned medium. For this, we used conditioned medium from HS-produced embryos on luteal cells culture. The conditioned medium was derived from embryos produced *in vitro* under heat stress on different stages of embryonic development. The luteal response to conditioned medium of heat-stressed embryos showed no steroidogenic ( $3\beta$ HSD, StAR and P450sCC) changes over 6, 12, and 18 hours. However, interferon-stimulated genes (ISG15, OAS1, MX1 and MX2) were altered by the HS groups, as well as changes in the response of genes related to angiogenesis and cell survival (VEGF, AKT and XIAP) over time. In conclusion, the embryo secretion in the conditioned medium alters the expression of interferon stimulated genes, angiogenic and cell survival genes at different hours of treatment. These results bring new insights to understand the influence of heat stress on maternal endocrine recognition of pregnancy signaling.

**Keywords:** interferon, heat stress; corpus luteum; embryo; bovine.

## 1. Introduction

Heat stress (HS) is an important factor affecting ovulation, fertilization, and early embryonic development (DE RENSIS et al., 2021). HS has negative effects on the period from oocyte maturation to preimplantation (SAKATANI et al., 2015). AMARAL et al. (2020) showed that HS during maturation, fertilization and early embryonic development negatively affects embryonic development and impairs IFNT production and leads to cellular and oxidative stress.

In ruminants, maternal recognition of pregnancy (MRP) is the period when the embryo expands and, consequently, interferon tau (IFNT) production by trophoblast cells peaks (ANTONIAZZI et al., 2010; HANSEN; SINEDINO; SPENCER, 2017a; SPENCER et al., 2007). IFNT is the major cytokine involved in MRP (BAZER; THATCHER, 2017; FORDE; LONERGAN, 2017). The conceptus signals its presence to the mother and ensures that the corpus luteum (CL) is maintained, preventing the return to cyclicity. Therefore, the luteal concentration of progesterone (P4) is associated with the expansion of the conceptus and consequently with IFNT secretion (BROOKS; BURNS; SPENCER, 2014). CL is a temporary gland that arises from the ovulated follicle and produces mainly P4, which is responsible for cyclicity and maintenance of pregnancy (NISWENDER et al., 2000). It has been previously reported that CL affects oocyte developmental competence and embryonic development, probably through intraovarian interactions (ARGUDO et al., 2020).

Studies conducted both in vitro and in vivo show that IFNT acts in uterine and extrauterine tissues (Antoniazzi et al., 2013b; Bott et al., 2010b; Oliveira et al., 2008). IFNT acts through different pathways, paracrine (AUSTIN et al., 1996; JOHNSON et al., 1999), endocrine (ANTONIAZZI et al., 2010; HANSEN; SINEDINO; SPENCER, 2017b) and autocrine through trophoblast cells (IMAKAWA et al., 2002). The embryo begins to communicate with the mother around day 4 of development (RASHID et al., 2018). However,



IFNT concentrations can be detected in the systemic circulation around day 15 (HAN et al., 2006); in cattle, peak IFNT production occurs between days 18 and 20 (FARIN et al., 1990; HIRAYAMA et al., 2014; ROBERTS, 1991).

Because IFNT is the major cytokine responsible for embryo-maternal interaction to prevent luteolysis and to establish and maintain pregnancy (MCCRACKEN; CUSTER; LAMSA, 1999), it is important to understand the various factors involved in embryonic and CL endocrine signaling. This anti-luteolytic action of IFNT leads to the maintenance of a functional CL and thus the secretion of P4. Progesterone, the pregnancy hormone, is essential for the creation of a uterine environment that supports the critical events for successful conceptus development (SPENNCER; BAZER, 2002).

*In vitro* produced embryos secrete miRNA CAPALBO et al. (2016) cytokines, vesicles in the culture media that can affect maternal-embryonic communication (BRIDI et al., 2018, 2021). Moreover, our previous studies have shown that embryos produced *in vitro* at HS have IFNT expression compared to embryos without HS (AMARAL et al., 2020). Consequently, HS alters embryo secretion in conditioned medium. Therefore, our hypothesis is that the conditioned medium of embryos generated at HS alters signaling of genes stimulated by interferon in primary culture of bovine luteal cells. We are investigating the influence of HS on the communication of embryos produced *in vitro* for luteal cell culture. Thus, our goal is to evaluate ISGs, angiogenesis, cell survival, and steroidogenic genes in primary cultures of luteal cells treated with conditioned medium from embryos under heat stress.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Chemicals**

Unless otherwise stated, chemicals and reagents were purchased from Sigma Chemical Company (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

## 2.2 Primary culture of luteal cells

Bovine ovaries were collected at the slaughterhouse and transported to the laboratory in 0.9% saline containing penicillin (100UI/ml) and streptomycin sulfate (50 $\mu$ l/ml) at 4°C. Upon arrival at the laboratory, CLs were disinfected with 0.9% saline and 70% alcohol until the solutions became clear, both at a temperature of 4°C. CLs were selected according to their morphological characteristics. They were classified into early (1-6 days post-ovule), intermediate (8-12 days post-ovule) and late (15-17 days post-ovule) according to the criteria of (MIYAMOTO; JAN SKARZYNSKI; OKUDA, 2000). Early or intermediate CLs were selected that were 15 to 25 mm in diameter, had luteal tissue present on the ovarian surface, were bloody to pink, light brown, or orange in color, and had a compact, soft consistency.

The CL were mechanically separated from their fibrous capsule and disinfected in 70% alcohol to avoid contamination. The decapsulated luteal tissue was stored in PBS solution on ice until it was cut into smaller fragments with scalpel blades and then dissociated in 1% collagenase type IA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and DMEM-F12 solution for 40 minutes at 37°C, with vortexing every 10 minutes for 1 minute. Then collagenase was inactivated with DMEM-F12 solution supplemented with 10% FBS and 1% antibiotics (penicillin 10,000IU/ml and streptomycin 10,000 $\mu$ g/ml). The solution is filtered with 0.7 $\mu$ m filters to obtain large and small cells from the corpus luteum to reduce contamination of the culture. Then the cells were resuspended in DMEM-F12 solution supplemented with and 1% antibiotics (penicillin 10,000UI/ml and streptomycin 10,000 $\mu$ g/ml) for 10 minutes. After discarding the supernatant, 2 ml of Red Blood Cell Buffer (Lysing Buffer R757 Sigma) was added and homogenized for 1 minute. Then the suspension was centrifuged three times for 10 minutes at 200Xg in DMEM-F12 solution containing 1% antibiotics. Cells were counted with

0.4% trypan blue solution (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at a dilution of 1:100.

Adapted from PATE, J.L. (1993).

Luteal cell culture was seeded in plates with 24 wells. Plates were previously filled with 200  $\mu$ l DMEM-F12 supplemented with 10% FBS and 1% antibiotic and incubated at 37°C for 30 minutes. The medium was then discarded and replaced with 400  $\mu$ l/well of DMEM-F12 medium without FBS and 1% antibiotic and left in the incubator until the cells were plated out. After assessing the viability of the cells, the DMEM-F12 medium without FBS was removed, the cells were plated out (200,000 cells/well) and kept in the incubator with fresh DMEM-F12 medium containing 1% antibiotic (penicillin 10,000UI/ml and streptomycin 10,000 $\mu$ g/ml) and no FBS for 24 hours at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>.

### 2.3 RNA extraction, reverse transcription and real-time PCR

For determination of mRNA abundance, luteal cells were collected at the end of each treatment and immediately stored at -80 °C. Total RNA was then extracted using the PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions and quantified at a wavelength of 260 nm using a spectrophotometer (NanoDrop1000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA). Total RNA (100ng) was reverse transcribed using the iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Des Plaines, IL, USA) at 25°C for 5 min and 46°C for 30 min (RT). The reaction was terminated by incubation at 95°C for 5 min. Real-time qPCR was performed with the CFX384™ Real-Time System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) using GoTaq® DNA Polymerase (Promega, Madison, WI, USA) and specific primers (Table 1). After an initial denaturation step at 95°C for 3 minutes, 40 cycles were performed at 95°C for 10 seconds, followed by 1 minute at 60°C to amplify each transcript. The reaction was performed in duplicate. Data were normalized to a calibrator sample to quantify relative gene expression using the Pfaffl  $\Delta\Delta$ Ct method with correction for amplification efficiency. Briefly, target gene amplification

Ct was normalized to the average expression level of two proteins and one enzyme, the  $\beta$ -ACTIN, RPL19, and GAPDH housekeeping genes, according to the ratio  $R = \text{housekeeping } ECt / \text{target } ECt$ , where E is the amplification efficiency for each primer pair. Expression of steroidogenic enzymes (P450sCC, StAR, and  $3\beta$ HSD), interferon-stimulated genes (ISG15, OAS1, MX1, and MX2), angiogenesis-related gene VEGF, and cell survival genes such as AKT and XIAP were assessed.

## 2.4 Experimental design

### *Experiment 1: Exposure of bovine luteal cell to roIFNT*

With the hypothesis that embryo communication is altered by heat stress with bovine corpus luteum cells. Our first experiment aimed to investigate the dose-dependent response of cultured bovine corpus luteum cells treated with roIFNT. The relative mRNA expression of genes stimulated by IFNT (ISG15, OAS1, MX1, and MX2) was assessed to validate this model. For this purpose, cells were treated in vitro for 6, 12 and 18 hours with a medium composed of 60% DMEM F-12 and 40% SOF to which 0 (SOF), 0.1 and 1ng roIFNT was added. After treatment, cells were collected and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for subsequent RNA extraction. The experiment was repeated 3 times, using 6 different CLs in each replicate.

### *Experiment 2: Exposure of bovine luteal cells to conditioned medium derived from embryos produced in vitro under heat stress*

After validating the response of primary culture of bovine luteal cells to roIFNT, the aim of the second experiment was to evaluate the response of primary culture of bovine luteal cells to the conditioned medium of embryos exposed to heat stress during in vitro development until day 7. Luteal cells were treated with medium composed of 60% DMEM and 40% SOF (control, without embryos) and with conditioned medium for stressed embryos referred to 2 embryos at day 7. After treatment for 6, 12, and 18 hours, cells were collected

for RNA extraction as previously described. The experiment was performed with 3 replicates of bovine luteal cell cultures (n=6 CLs per replicate).

## 2.5 Statistical analysis

Analysis of variance was performed using JMP software (SAS Institute) with treatment as the main effect and replicates as the random variable. Differences between means were tested with the Tukey multiple comparison test. Homogeneity of variance was tested with the O'Brien test. Data that did not follow a normal distribution (Shapiro-Wilk test) were converted to logarithms. Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM), and  $P < 0.05$  was considered significant.

## 3 Results

### 3.1 Expression of interferon stimulated genes in luteal cell culture treated with roIFNT

The expression of the interferon-stimulated genes (ISGs), ISG15, OAS1, MX1 and MX2, expressed by bovine corpus luteum cells showed a dose-dependent difference when treated with 0ng, 0.1ng and 1ng ovine recombinant IFNT (roIFNT), as shown in Figure 2, at 6 and 18 hours. It is possible to observe a difference in the expression of OAS1 at 12 hours, where it was different between the groups with the highest concentration of roIFNT (1ng/ml) and the lowest dose (0.1ng) but was not different from the group without roIFNT. For the other ISGs, there were no differences between groups at 12 hours.

### 3.2 Cell culture of luteal cells

Culture of luteal cells was treated with negative and positive embryo controls, conditioned medium from embryos under heat stress at different time points of embryonic development until day 7, after 6, 12, and 18 hours. Luteal cells exhibited 80% viability (trypan blue). Also, the expression of genes related to steroidogenesis (StAR, 3beta-HSD, P450sCC) showed no difference in all treated groups during the hours studied (Figure 1). All these results confirm

the luteal culture model. Expression of interferon-stimulated genes in luteal cell culture treated with conditioned medium from heat-stressed embryos.

The expression of ISGs is shown in Figure 3. The effect of luteal cell culture treatment is observed in the 6 hours of treatment when we compare the group EC, without the influence of HS, with the groups IVM, IVF, IVC and MFC. The relative expression for all ISGs increased when we compare the group EC with the group NE, without the influence of embryo, at 6h. The MX1 gene showed a difference at 6 h between the NE and MFC groups compared with the IVM and IVF groups, and the EC and IVC groups showed similar expression to the groups with a difference. The other ISGs showed no difference in expression between the groups studied at 12 and 18 hours.

### 3.3 Expression of genes related to angiogenesis (VEGF) and cell survival (XIAP and AKT) in luteal cell culture treated with heat stress conditioned medium embryos

Assessing the expression of the gene related to angiogenesis (Figure 4), VEGF, we found that after 6 and 12 hours there is no difference in the expression of corpus luteum cells treated with conditioned medium from embryos at HS, but after 18 hours there is a difference between the groups when comparing the group without the influence of embryos (NE) and the groups treated with embryos exposed to HS.

For genes related to cell survival (AKT and XIAP), only the AKT gene showed a decrease in expression in luteal cells treated with conditioned medium from stressed embryos when comparing the group without embryo influence (NE) and with medium from embryos produced in thermal comfort, with the groups subjected to HS being the group most exposed to HS, with lower AKT expression at 6 hours. There was no difference in AKT expression at 12 and 18 hours. The XIAP gene showed no difference in expression between groups at 6, 12, and 18 hours.

#### 4. Discussion

The endocrine communication of the embryo was postulated only recently (OLIVEIRA et al., 2008). Since then, several studies have investigated endocrine communication between mother and embryo (ANTONIAZZI et al., 2013; BRIDI et al., 2021). Previous results from our group (AMARAL et al., 2020) have shown the negative influence of HS on IFNT production. The results presented in this study show the response of the conditioned media of HS embryos to luteal cell culture at 6, 12 and 18 hours. The luteal cells treated with the conditioned media of HS embryos for 6, 12 and 18 hours show decreased cell survival and expression of interferon stimulated genes after 6 hours. This implies that the HS embryo negatively affects the luteal expression of ISGS.

Our luteal cell culture model maintained mRNA levels of steroidogenic acute regulators (StAR), 3-beta hydroxysteriododehydrogenase (3-beta HSD), and P450 side chain cleavage (P450sCC). StAR transports cholesterol into the cell to mitochondria, where it is cleaved by P450scc into pregnenolone (MILLER; AUCHUS, 2011), and 3-beta HSD converts pregnenolone into progesterone (LEE; MILLER; AUCHUS, 1999). Our steroidogenic enzymes indicate that our luteal cell culture is functional. Moreover, our culture responds to embryonic treatment.

Heat stress and oxidative stress can directly damage organelles or cause DNA damage, altering gene expression and reducing the competence of embryonic development prior to implantation (SAKATANI et al., 2015). Embryos exposed to heat stress during in vitro production exhibited a significant reduction in IFNT production, which impairs their signaling effect in maternal detection of pregnancy (AMARAL et al., 2020). IFNT is one of the main factors of conceptional maternal crosstalk, and its action leads to CL maintenance and pregnancy maintenance (HANSEN; SINEDINO; SPENCER, 2017b), which may be released

via the uterine vein and stimulate the expression of several ISGs (GREEN et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2008).

The endocrine function of IFNT may be directly related to the expression of interferon-stimulated genes in extrauterine tissues (ANTONIAZZI et al., 2010). BRIDI et al. (2018) showed that the expression of ISG15 increased when we treated luteal cells with conditioned medium from parthenogenetically produced embryos, which was also observed in our results. We found greater expression of interferon-stimulated genes in the control group of embryos. However, compared with the heat-stressed groups, the expression of mRNA of interferon-stimulated genes decreased. This suggests that the conditioned medium negatively affects the luteal expression of ISGs and alters embryo signaling.

We examined the response of genes stimulated by interferons in the primary culture of CL cells, and we observed a positive response when treated with a nonstressed EC (control group) and a negative response compared with the stressed embryo groups at different time points during in vitro embryo production (IVM HS, IVF HS, IVC HS, MFC). We observed this response in all genes stimulated by IFNT, including ISG15, OAS1, MX1, and MX2. Prolonged effects ( $P < 0.05$ ) between groups were observed for ISG15, OAS1, MX1, and MX2 expression at 6 hours, which were not observed at 12 and 18 hours. This suggests that the expression of ISGs is a rapid response that starts at 6 hours and does not maintain the same pattern of expression over the hours evaluated.

VEGF, also known as vascular permeability factor (VPF), acts on vascular endothelial cells to promote proliferation, migration, tube formation, and vascular permeability (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997), is an essential factor in the regulation of normal and abnormal angiogenesis (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997). It is important for the development of the CL and for the maintenance of its structure and function (STOUFFER; HENNEBOLD, 2015). Activation of protein kinase A for progesterone secretion during



luteinization and VEGF secretion during angiogenesis shows a close temporal relationship to these normal physiological processes (FERRARA; DAVIS-SMYTH, 1997). Kaessmeyer, (2009) reported heterogeneity in endothelial cultures and that this difference is related to the stage of vascular development during the luteal period and is associated with vasculogenesis and angiogenesis. Therefore, it is important to evaluate the CL morphology when selecting the developmental stage so that the cells respond as expected (MIYAMOTO; JAN SKARZYNSKI; OKUDA, 2000). We have observed that over time, cells must find a way to survive when exposed to factors such as HS and oxidative stress (AMARAL, 2020) and begin to increase expression of genes related to angiogenesis, with VEGF appearing at 18 hours.

We investigated whether cell survival genes were affected by treatment with the HS groups; to do so, we assessed the expression of XIAP and AKT genes. XIAP acts by inhibiting the activity of some caspases and other apoptotic proteins, giving it an anti-apoptotic effect (TAKAHASHI et al., 2002), whereas AKT is related to cell growth, survival, proliferation, angiogenesis, metabolism, and cell migration (HOXHAI; MANNING, 2020). Our study showed that treatment affected the expression of cell survival genes, such as AKT, in luteal cell culture during the first 6 hours of treatment. However, over time, treatment had no effect on luteal cell culture, demonstrating that expression of this gene in primary culture of bovine luteal cells occurs during the first hours of culture and the same response does not persist through 12 and 18 hours.

In conclusion, primary culture of bovine luteal cells showed no change in the expression of genes related to steroidogenesis when treated for 6, 12, and 18 hours with conditioned medium from embryos produced at HS. When we evaluated the expression of ISGs, we observed a reduction in the groups influenced by HS that was similar to the values of the group that was not under the influence of the embryos. Moreover, we found that this pattern was not maintained over the hours evaluated. With an increase in oxidative stress and

HS, the embryo can stimulate genes related to angiogenesis in cultured bovine luteal cells through the medium over 18 hours. Thus, we can say that HS is an important environmental factor affecting communication between embryos and bovine luteal cells.

### **Declaration of interest**

The authors declare there are no conflict of interests.

### **Funding**

This study was supported by CAPES Brazil (Funding code 001), FAPERGS, and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

### **Acknowledgments**

This study was supported by CAPES Brazil, FAPERGS, and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). Amanda Luiza Prante was financially supported by CAPES. The authors would also like to thank Frigorífico Silva for providing the bovine ovaries.

## References

AMARAL, C. S. et al. Heat stress on oocyte or zygote compromises embryo development, impairs interferon tau production and increases reactive oxygen species and oxidative stress in bovine embryos produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 87, n. 8, p. 899–909, 2020.

ANTONIAZZI, A. Q. et al. Função do interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes The role of interferon-tau during maternal recognition of pregnancy in ruminants. n. 1, p. 176–185, 2010.

ANTONIAZZI, A. Q. et al. Endocrine delivery of interferon tau protects the corpus luteum from prostaglandin F2 alpha-induced luteolysis in ewes. **Biology of Reproduction**, v. 88, n. 6, 2013.

ARGUDO, D. E. et al. Intraovarian influence of bovine corpus luteum on oocyte morphometry and developmental competence, embryo production and cryotolerance. **Theriogenology**, v. 155, p. 232–239, 1 out. 2020.

AUSTIN, K. J. et al. **Ubiquitin Cross-Reactive Protein Is Released by the Bovine Uterus in Response to Interferon during Early Pregnancy 1BIOLOGY OF REPRODUCTION.** [s.l: s.n.].

BAZER, F. W.; THATCHER, W. W. Chronicling the discovery of interferon tau. **Reproduction**, v. 154, n. 5, p. F11–F20, 2017.

BOTT, R. C. et al. Uterine vein infusion of Interferon Tau (IFNT) extends luteal life span in ewes. **Biology of Reproduction**, v. 82, n. 4, p. 725–735, abr. 2010.

BRIDI, A. et al. Parthenogenetic bovine embryos secrete type I interferon capable of stimulating ISG15 in luteal cell culture. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 4, p. 1268–1277, 2018.

BRIDI, A. et al. Small extracellular vesicles derived from in vivo- or in vitro-produced bovine blastocysts have different miRNAs profiles—Implications for embryo-maternal recognition. **Molecular Reproduction and Development**, v. 88, n. 9, p. 628–643, 1 set. 2021.

BROOKS, K.; BURNS, G.; SPENCER, T. E. **Conceptus elongation in ruminants: Roles of progesterone, prostaglandin, interferon tau and cortisol**. **Journal of Animal Science and Biotechnology** BioMed Central Ltd., , 2014.

CAPALBO, A. et al. MicroRNAs in spent blastocyst culture medium are derived from trophoctoderm cells and can be explored for human embryo reproductive competence assessment. **Fertility and Sterility**, v. 105, n. 1, p. 225- 235.e3, 2016.

DE RENSIS, F. et al. **Effects of heat stress on follicular physiology in dairy cows**. **Animals** MDPI, , 1 dez. 2021.

FARIN, C. E. et al. **Expression of Trophoblastic Interferon Genes in Sheep and Cattle** **BIOLOGY OF REPRODUCTION**. [s.l: s.n.].

FERRARA, N.; DAVIS-SMYTH, T. **The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor**. [s.l: s.n.].

FORDE, N.; LONERGAN, P. **Interferon-tau and fertility in ruminants**. **Reproduction** BioScientifica Ltd., , 2017.

GENDELMAN, M.; ROTH, Z. In vivo vs. in vitro models for studying the effects of elevated temperature on the GV-stage oocyte, subsequent developmental competence and gene expression. **Animal Reproduction Science**, v. 134, n. 3–4, p. 125–134, out. 2012.

GREEN, J. C. et al. Measurement of interferon-tau (IFN- $\tau$ ) stimulated gene expression in blood leukocytes for pregnancy diagnosis within 18-20d after insemination in dairy cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 121, n. 1–2, p. 24–33, ago. 2010.

HAN, H. et al. Low blood ISG15 mRNA and progesterone levels are predictive of non-pregnant dairy cows. **Journal of Endocrinology**, v. 191, n. 2, p. 505–512, nov. 2006.

HANSEN, T. R.; SINEDINO, L. D. P.; SPENCER, T. E. **Paracrine and endocrine actions of interferon tau (IFNT)**. **Reproduction**BioScientifica Ltd., , 2017a.

HANSEN, T. R.; SINEDINO, L. D. P.; SPENCER, T. E. Paracrine and endocrine actions of interferon tau (IFNT). **Reproduction**, v. 154, n. 5, p. F45–F59, 2017b.

HIRAYAMA, H. et al. Enhancement of maternal recognition of pregnancy with parthenogenetic embryos in bovine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 81, n. 8, p. 1108–1115, 2014.

HOXHAJ, G.; MANNING, B. D. **The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism**. **Nature Reviews Cancer**Nature Research, , 1 fev. 2020.

IMAKAWA, K. et al. Temporal expression of type I interferon receptor in the pre-implantation ovine extra-embryonic membranes: demonstration that human IFN $\alpha$  can bind to this receptor. **Endocrine Journal**, v. 49 (2), p. 195–205, 2002.

JOHNSON, G. A. et al. **Expression of the Interferon Tau Inducible Ubiquitin Cross-Reactive Protein in the Ovine Uterus** **1BIOLOGY OF REPRODUCTION**. [s.l: s.n.].

KAESSMEYER, S.; PLENDL, J. Angiogenesis and vasculogenesis in the corpus luteum in vitro. **Clinical Hemorheology and Microcirculation**, v. 41, n. 2, p. 83–101, 2009.

LEE, T. C.; MILLER, W. L.; AUCHUS, R. J. **Medroxyprogesterone Acetate and Dexamethasone Are Competitive Inhibitors of Different Human Steroidogenic Enzymes\*** *J Clin Endocrinol Metab.* [s.l: s.n.].

MCCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. **Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.physiology.org/journal/physrev](http://www.physiology.org/journal/physrev)>.

MILLER, W. L.; AUCHUS, R. J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. **Endocrine Reviews**, v. 32, n. 1, p. 81–151, fev. 2011.

MIYAMOTO, Y.; JAN SKARZYNSKI, D.; OKUDA, K. **Is Tumor Necrosis Factor a Trigger for the Initiation of Endometrial Prostaglandin F<sub>2</sub> Release at Luteolysis in Cattle? 1BIOLOGY OF REPRODUCTION.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.biolreprod.org>>.

NISWENDER, G. D. et al. **Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <[www.physiology.org/journal/physrev](http://www.physiology.org/journal/physrev)>.

OLIVEIRA, J. F. et al. Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN- $\tau$  release from the uterine vein. **Endocrinology**, v. 149, n. 3, p. 1252–1259, mar. 2008a.

OLIVEIRA, J. F. et al. Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN- $\tau$  release from the uterine vein. **Endocrinology**, v. 149, n. 3, p. 1252–1259, mar. 2008b.

PATE, J. Isolation and Culture of Fully Differentiated Bovine Luteal Cells. **Methods in Toxicology**, v. 3B, 1993.

RASHID, M. B. et al. Evidence that interferon-tau secreted from Day-7 embryo in vivo generates anti-inflammatory immune response in the bovine uterus. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 500, n. 4, p. 879–884, 12 jun. 2018.

ROBERTS, M. R. A role for interferons in early pregnancy. **BioEssays**, v. 13, 1991.

SAKATANI, M. et al. Heat stress during in vitro fertilization decreases fertilization success by disrupting anti-polyspermy systems of the oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 82, n. 1, p. 36–47, 1 jan. 2015.

SCHÜLLER, L. K.; BURFEIND, O.; HEUWIESER, W. Impact of heat stress on conception rate of dairy cows in the moderate climate considering different temperature-humidity index thresholds, periods relative to breeding, and heat load indices. **Theriogenology**, v. 81, n. 8, p. 1050–1057, 2014.

SPENCER, T. E. et al. **Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: Roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. Reproduction, Fertility and Development**, 2007.

SPENNCER, T. E.; BAZER, F. W. Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. **Frontiers in Bioscience**, p. 1879–1898, 2002.

STOUFFER, R. L.; HENNEBOLD, J. D. Structure, Function, and Regulation of the Corpus Luteum. In: **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set**. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. v. 1p. 1023–1076.

TAKAHASHI, M. et al. **Promoting Effect of-Mercaptoethanol on In Vitro Development under Oxidative Stress and Cystine Uptake of Bovine Embryos 1BIOLOGY OF REPRODUCTION**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.biolreprod.org>>.

## Tables

Table 1. Forward and reverse primers sequences of target and reference genes used for quantitative polymerase chain reaction ISG15; MX; MX2; OAS1; 3βHSD; P450; StAR; AKT-1; XIAP; VEGF; ACTB; GAPDH; RPL19.

Gene	N° access/Reference	Sequence of primer
ISG15	NM_174366.1	F: GGTATCCGAGCTGAAGCAGTT R: ACCTCCCTGCTGTCAAGGT
OAS1	NM_001029846.2	F: TAGCCTGGAACATCAGGTC R: TTTGGTCTGGCTGGATTACC
MX1	NM_173940.2	F: GTACGAGCCGAGTTCTCCAA R: ATGTCCACAGCAGGCTCTTC
MX2	NM_173941.2	F: CTCAGAGACGCCTCAGTCG R: TGAAGCAGCCAGGAATAGT
StAR	Atili et al 2012	F: CAGCAGAAGGGTGTCATCAGA R: GAGAGGACCTGGTTGATGATG
P450sCC	Wang et al 2021	F: CTTGCACCTTTCTGGCTAGG R: AAGGGGAAGAGGTAGGGTG
3BHSB	NM_001034034.2	F: TGACCCCTTCTTGACCTTC R: CGTTCTCTGCCTTGACTGTG
VEGF	Beindorff et al 2010	F: CCCAGATGAGATTGAGTTCATTTT R: GCCTCGGCTTGTCACATTTT
AKT	NM_173986.2	F: GATTCTTCGCCAGCATCGTG R: GGCCGTGAACTCCTCACTCA
XIAP	NM_001205592.1	F: GAAGCACGGATCATTACATTTTGG R: CCTTCACCTAAAGCATAAAAATCCAG
ACTB	NM_173979.3	F: GGATGAGGCTCAGAGCAAGAGA R: TCGTCCCAGTTGGTGACGAT



RPL19	NM_000981.4	F: CCGGCTGCTTAGACGATACC R: CCGCTTGTTTTTGAACACGTT
GAPDH	NM_001035034.2	F: GATTGTCAGCAATGCCTCCT R: GGTCATAAGTCCCTCCACGA

### Figure legends

Figure 1: Relative mRNA expression of steroidogenic genes (StAR, P450 and 3 $\beta$ HSD) at 6h, 12h and 18h of luteal cells treated with conditioned medium from HS embryos during oocyte maturation (IVM), fertilization (IVF), the first day of embryo culture (IVC) or combinations of all treatments (MFC: IVM + IVF + IVC). Bars represent means  $\pm$  SEM in replicates.

Figure 2: Results of relative mRNA expression of interferon stimulated genes luteal cells, at 6h, 12h and 18h of treated with 0ng, 0,1ng and 1ng of roIFNT, the evaluated genes were ISG15, OAS1, MX1 and MX2. Bars represent means  $\pm$  SEM in replicates. Different letters indicate significance ( $p < 0.05$ ) among groups.

Figure 3: Results of relative mRNA expression of interferon stimulated genes luteal cells, at 6h, 12h and 18h of treated with conditioned medium from HS embryos during oocyte maturation (IVM), fertilization (IVF), the first day of embryo culture (IVC) or combinations of all treatments (MFC: IVM + IVF + IVC) ISG15, OAS1, MX1 and MX2. Bars represent means  $\pm$  SEM in replicates. Different letters indicate significance ( $p < 0.05$ ) among groups.

Figure 4: Relative mRNA expression of angiogenesis gene (VEGF) and cell survival (AKT and XIAP) in different groups of luteal cells at 6h, 12h and 18h of treated with conditioned medium from HS embryos at different stages of development, at oocyte maturation (IVM), at fertilization (IVF), on the first day of in vitro culture (IVC) and at all stages of embryonic development (MFC: IVM + IVF + IVC). Bars represent the group means  $\pm$  SEM in replicates. Different letters indicate significance ( $p < 0.05$ ) between groups.

Figure 1

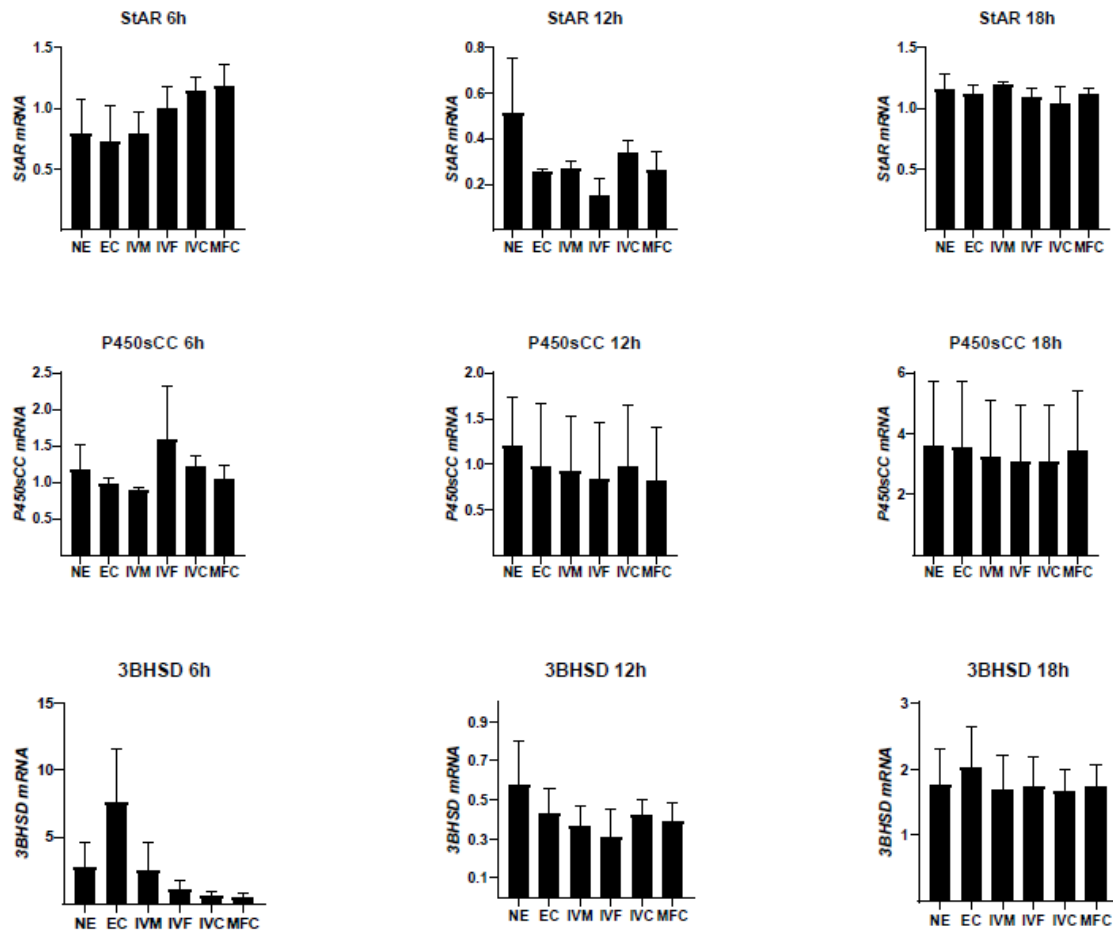


Figure 2

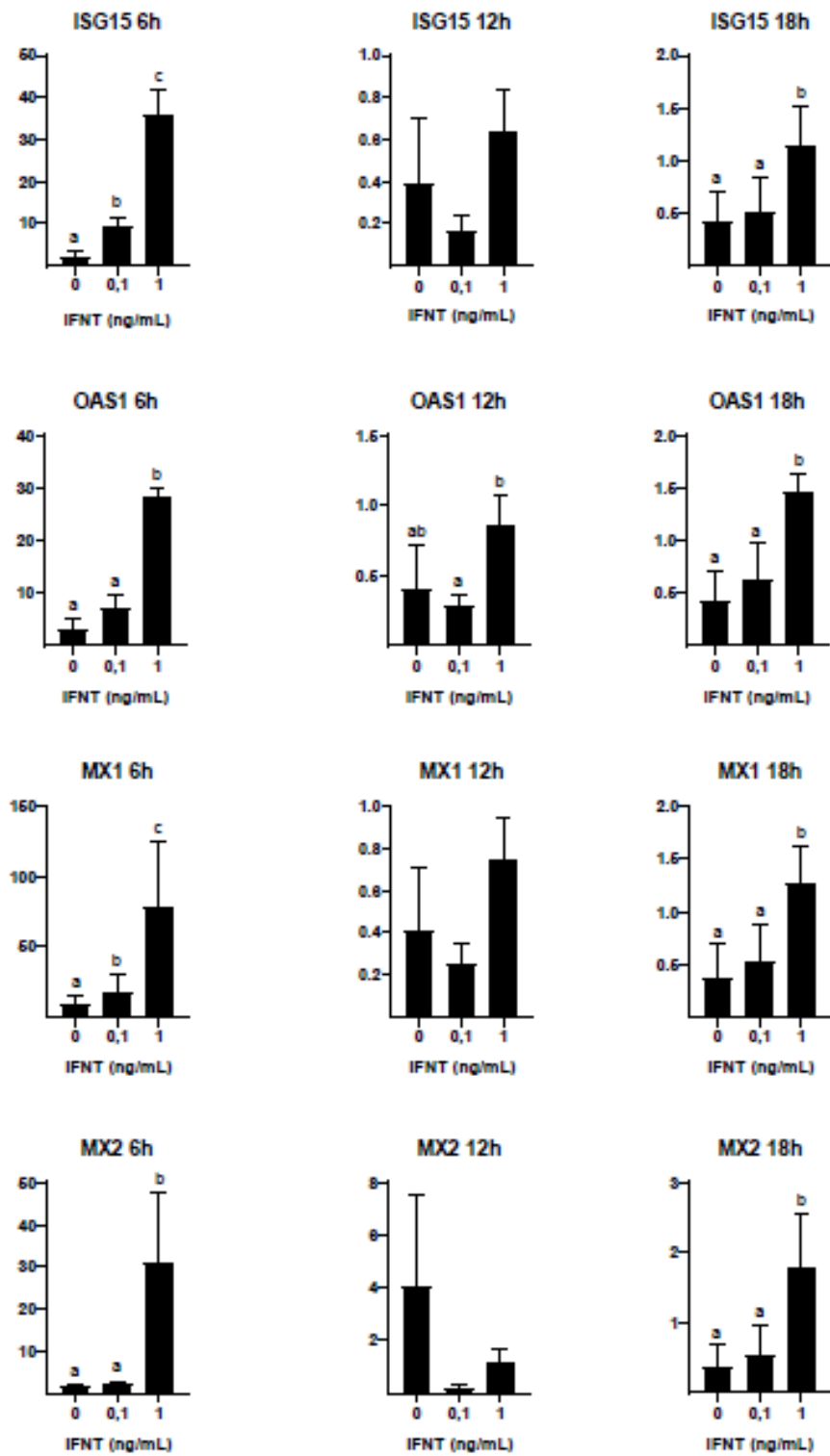


Figure 3

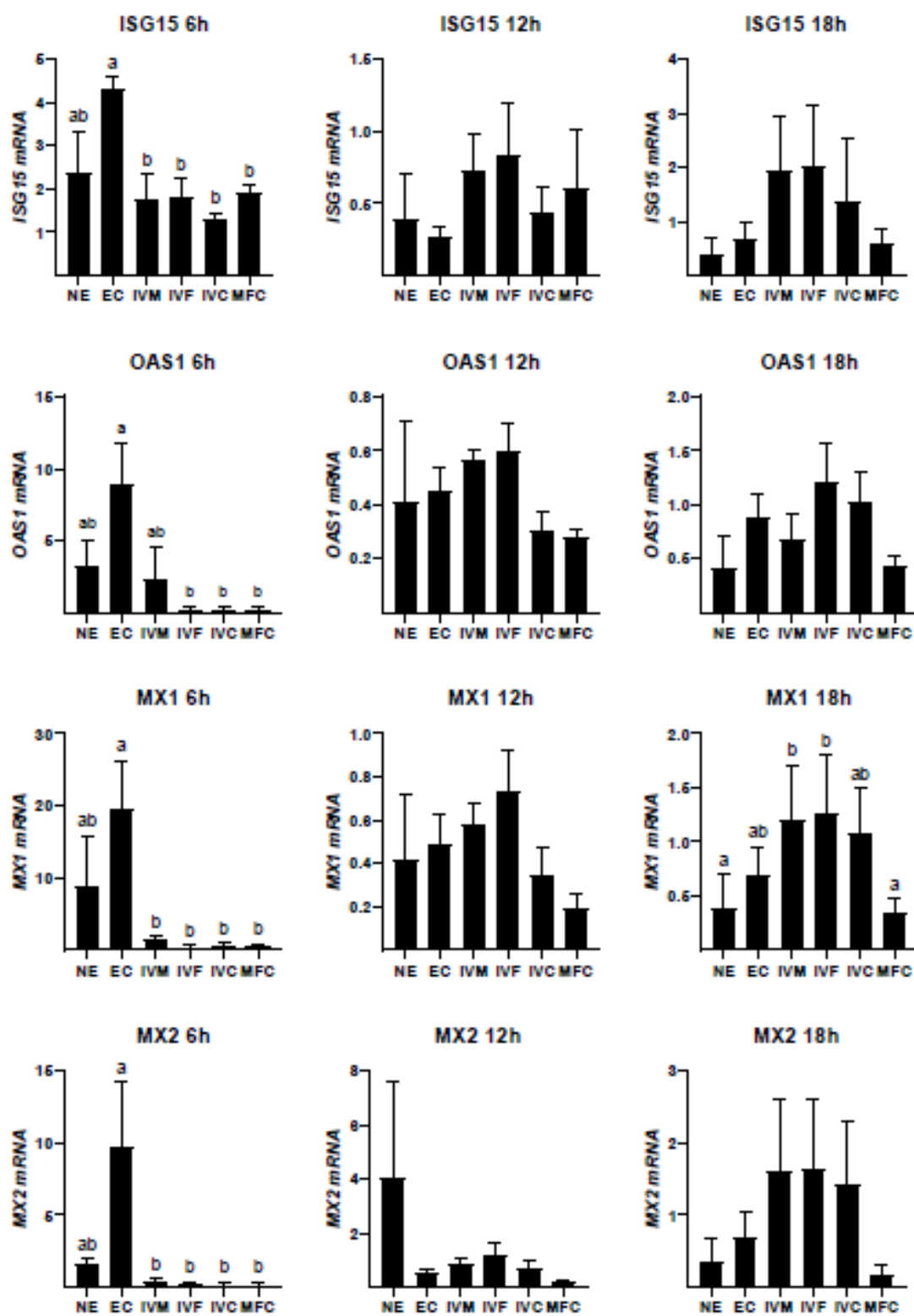
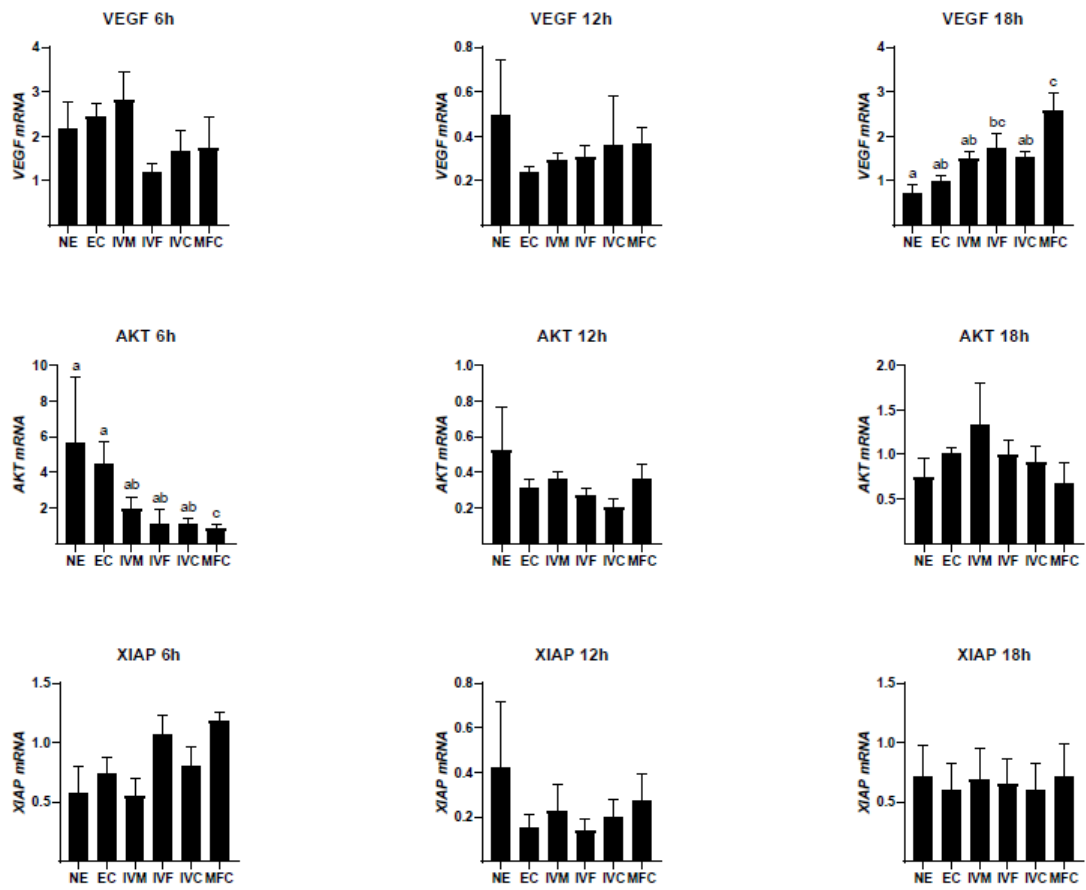


Figure 4



## **4 CONCLUSÃO**

Com base nos resultados obtidos nos experimentos realizados pelo nosso grupo, podemos concluir que o estresse térmico altera a secreção de moléculas, como o IFNT (AMARAL, et. al., 2021), pelos embriões bovinos produzidos in vitro, e essas modulam a expressão de ISGs nas células luteais tratadas com o meio condicionado por esses embriões. Bem como, foi possível observar alteração na expressão de mRNA de genes relacionados a angiogênese ao longo do tempo, as 18 horas. Portanto nossos resultados sugerem que o estresse térmico compromete a comunicação de embriões estressados com o corpo lúteo.

## 5 REFERÊNCIAS

- Amaral, C. S., Koch, J., Correa Júnior, E. E., Bertolin, K., Mujica, L. K. S., Fiorenza, M. F., Rosa, S. G., Nogueira, C. W., Comim, F. v., Portela, V. V. M., Gonçalves, P. B. D., & Antoniazzi, A. Q. (2020). Heat stress on oocyte or zygote compromises embryo development, impairs interferon tau production and increases reactive oxygen species and oxidative stress in bovine embryos produced in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 87(8), 899–909. <https://doi.org/10.1002/mrd.23407>
- Ammer, S., Lambertz, C., von Soosten, D., Zimmer, K., Meyer, U., Dänicke, S., & Gauly, M. (2018). Impact of diet composition and temperature–humidity index on water and dry matter intake of high-yielding dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102(1), 103–113. <https://doi.org/10.1111/jpn.12664>
- Antoniazzi, A. Q., Luiz, A. I., Henkes, E., João, I. I., Coelho, F., Iii, O., Ross, T., & Iv, H. (2010). *Função do interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes The role of interferon-tau during maternal recognition of pregnancy in ruminants. 1*, 176–185.
- Antoniazzi, A. Q., Webb, B. T., Romero, J. J., Ashley, R. L., Smirnova, N. P., Henkes, L. E., Bott, R. C., Oliveira, J. F., Niswender, G. D., Bazer, F. W., & Hansen, T. R. (2013). Endocrine delivery of interferon tau protects the corpus luteum from prostaglandin F2 alpha-induced luteolysis in ewes. *Biology of Reproduction*, 88(6). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.105684>
- Austin, K. J., Carr, A. L., Pru, J. K., Hearne, C. E., George, E. L., Belden, E. L., & Hansen, T. R. (2004). Localization of ISG15 and Conjugated Proteins in Bovine Endometrium Using Immunohistochemistry and Electron Microscopy. *Endocrinology*, 145(2), 967–975. <https://doi.org/10.1210/en.2003-1087>
- Austin, K. J., Ward, S. K., Glaucia Teixeira, M., Dean, V. C., Moore, D. W., & Hansen, T. R. (1996). Ubiquitin Cross-Reactive Protein Is Released by the Bovine Uterus in Response to Interferon during Early Pregnancy 1. In *BIOLOGY OF REPRODUCTION* (Vol. 54).
- Barnwell, C. v., Farin, P. W., Ashwell, C. M., Farmer, W. T., Galphin, S. P., & Farin, C. E. (2016). Differences in mRNA populations of short and long bovine conceptuses on Day 15 of gestation. *Molecular Reproduction and Development*, 83(5), 424–441. <https://doi.org/10.1002/mrd.22640>



- Bazer, F. W. (2013). Pregnancy recognition signaling mechanisms in ruminants and pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 4(1), 1. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-23>
- Bazer, F. W., & First, N. L. (1983). Pregnancy and parturition. *Journal of Animal Science*, 57 Suppl 2, 425–460.
- Binelli, M., Subramaniam, P., Diaz, T., Johnson, G. A., Hansen, T. R., Badinga, L., & Thatcher, W. W. (2001). Bovine Interferon-Stimulates the Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription Pathway in Bovine Endometrial Epithelial Cells 1. In *BIOLOGY OF REPRODUCTION* (Vol. 64). <http://www.biolreprod.org>
- Boni, R. (2019). Heat stress, a serious threat to reproductive function in animals and humans. In *Molecular Reproduction and Development* (Vol. 86, Issue 10, pp. 1307–1323). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/mrd.23123>
- Boni, R., Perrone, L. L., & Cecchini, S. (2014). Heat stress affects reproductive performance of high producing dairy cows bred in an area of southern apennines. *Livestock Science*, 160(1), 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2013.11.016>
- Bott, R. C., Ashley, R. L., Henkes, L. E., Antoniazzi, A. Q., Bruemmer, J. E., Niswender, G. D., Bazer, F. W., Spencer, T. E., Smirnova, N. P., Anthony, R. v., & Hansen, T. R. (2010a). Uterine vein infusion of Interferon Tau (IFNT) extends luteal life span in ewes. *Biology of Reproduction*, 82(4), 725–735. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.079467>
- Bott, R. C., Ashley, R. L., Henkes, L. E., Antoniazzi, A. Q., Bruemmer, J. E., Niswender, G. D., Bazer, F. W., Spencer, T. E., Smirnova, N. P., Anthony, R. v., & Hansen, T. R. (2010b). Uterine vein infusion of Interferon Tau (IFNT) extends luteal life span in ewes. *Biology of Reproduction*, 82(4), 725–735. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.079467>
- Brooks, K., Burns, G., & Spencer, T. E. (2014). Conceptus elongation in ruminants: Roles of progesterone, prostaglandin, interferon tau and cortisol. In *Journal of Animal Science and Biotechnology* (Vol. 5, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-53>
- Das, R., Sailo, L., Verma, N., Bharti, P., Saikia, J., Imtiwati, & Kumar, R. (2016). Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. In *Veterinary World* (Vol. 9, Issue 3, pp. 260–268). Veterinary World. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.260-268>
- Davis, J. S., Rueda, B. R., & Spanel-Borowski, K. (2003). *Microvascular endothelial cells of the corpus luteum*. <http://www.rbej.com/content/1/1/89>

- de Rensis, F., Garcia-Ispierto, I., & López-Gatiús, F. (2015). Seasonal heat stress: Clinical implications and hormone treatments for the fertility of dairy cows. *Theriogenology*, *84*(5), 659–666. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.04.021>
- de Rensis, F., & Scaramuzzi, R. J. (2003). Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow - A review. *Theriogenology*, *60*(6), 1139–1151. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00126-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00126-2)
- Demmers, K. J., Derecka, K., & Flint, A. (2001). *Trophoblast interferon and pregnancy*.
- Dey, S. K., Lim, H., Das, S. K., Reese, J., Paria, B. C., Daikoku, T., & Wang, H. (2004). Molecular cues to implantation. In *Endocrine Reviews* (Vol. 25, Issue 3, pp. 341–373). <https://doi.org/10.1210/er.2003-0020>
- Diaz, F. J., Anderson, L. E., Wu, Y. L., Rabot, A., Tsai, S. J., & Wiltbank, M. C. (2002). Regulation of progesterone and prostaglandin F 2a production in the CL. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *191*, 65–80. [https://doi.org/10.1016/s0303-7207\(02\)00056-4](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(02)00056-4)
- Dikmen, S., & Hansen, P. J. (2009). Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment? *Journal of Dairy Science*, *92*(1), 109–116. <https://doi.org/10.3168/jds.2008-1370>
- Farin, C. E., Imakawa, K., Hansen, R., McDonnell, J. J., Murphy, C. N., Farin, P. W., & Roberts<sup>2</sup>, R. M. (1990a). Expression of Trophoblastic Interferon Genes in Sheep and Cattle<sup>1</sup>. In *BIOLOGY OF REPRODUCTION* (Vol. 43).
- Farin, C. E., Imakawa, K., Hansen, R., McDonnell, J. J., Murphy, C. N., Farin, P. W., & Roberts<sup>2</sup>, R. M. (1990b). Expression of Trophoblastic Interferon Genes in Sheep and Cattle<sup>1</sup>. In *BIOLOGY OF REPRODUCTION* (Vol. 43). <https://academic.oup.com/biolreprod/article/43/2/210/2762766>
- Farin, C. E., Imakawa, K., & Roberts, R. M. (1989). In Situ Localization of mRNA for the Interferon, Ovine Trophoblast Protein-1, during Early Embryonic Development of the Sheep. In *Molecular Endocrinology* (Vol. 3).
- García-Ispierto, I., López-Gatiús, F., Santolaria, P., Yániz, J. L., Nogareda, C., López-Béjar, M., & de Rensis, F. (2006). Relationship between heat stress during the peri-implantation period and early fetal loss in dairy cattle. *Theriogenology*, *65*(4), 799–807. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.06.011>

- Garrido, C., Saule, S., & Gospodarowicz, D. (1993). Transcriptional Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Expression in Ovarian Bovine Granulosa Cells. *Growth Factor*, 8, 109–117. <https://doi.org/10.3109/08977199309046931>
- Godkin, J. D., Bazer, F. W., Moffatt, J., Sessions, F., & Roberts, R. M. (1982). Purification and properties of a major, low molecular weight protein released by the trophoblast of sheep blastocysts at Day 13-21. *Journals of Reproduction & Fertility Ltd*, 65, 141–150. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0650141>
- Godkin, J. D., Bazer, F. W., & Roberts, R. M. (1984). *Ovine Trophoblast Protein 1, an Early Secreted Blastocyst Protein, Binds Specifically to Uterine Endometrium and Affects Protein Synthesis\** (Vol. 114, Issue 1).
- Gwazdauskas, F. C., Thatcher, W. W., Kiddy, C. A., Paape, M. J., & Wilcox, C. J. (1981). Hormonal patterns during heat stress following PGF<sub>2</sub> $\alpha$ -tham salt induced luteal regression in heifers. *Theriogenology*, 16(3), 271–285. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(81\)90012-1](https://doi.org/10.1016/0093-691X(81)90012-1)
- Han, H., Austin, K. J., Rempel, L. A., & Hansen, T. R. (2006). Low blood ISG15 mRNA and progesterone levels are predictive of non-pregnant dairy cows. *Journal of Endocrinology*, 191(2), 505–512. <https://doi.org/10.1677/joe.1.07015>
- Hansen, P. J. (2009). Effects of heat stress on mammalian reproduction. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 364, Issue 1534, pp. 3341–3350). Royal Society. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0131>
- Hansen, T. R., Austin, K. J., Perry, D. J., Pru, J. K., Teixeira, M. G., & Johnson, G. A. (1999). Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 54, 329–339.
- Hirayama, H., Moriyasu, S., Kageyama, S., Sawai, K., Takahashi, H., Geshi, M., Fujii, T., Koyama, T., Koyama, K., Miyamoto, A., Matsui, M., & Minamihashi, A. (2014). Enhancement of maternal recognition of pregnancy with parthenogenetic embryos in bovine embryo transfer. *Theriogenology*, 81(8), 1108–1115. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.039>
- Howell, J. L., Fuquay, J. W., & Smith, A. E. (1994). Corpus Luteum Growth and Function in Lactating Holstein Cows During Spring and Summer. *Journal of Dairy Science*, 77(3), 735–739. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77007-7](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77007-7)

- Imakawa, K., Anthony, R. v., Kazemi, M., Marotti, K. R., Polites, H. G., & Roberts, R. M. (1987). Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm. *Nature*, *330*(26), 377–379. <https://doi.org/10.1038/330377a0>
- Imakawa, K., Tamura, K., Lee, R., Ji, Y., Kogo, H., Sakai, S., & Christenson, R. K. (2002). Temporal expression of type I interferon receptor in the pre-implantation ovine extra-embryonic membranes: demonstration that human IFN $\alpha$  can bind to this receptor. *Endocrine Journal*, *49* (2), 195–205.
- Johnson, G. A., Austin, K. J., Collins, A. M., Murdoch, W. J., & Hansen, T. R. (1999a). Endometrial ISG1 7 mRNA and a Related mRNA Are Induced by Interferon-tau and Localized to Glandular Epithelial and Stromal Cells from Pregnant Cows. In *Endocrine* (Vol. 10, Issue 3).
- Johnson, G. A., Austin, K. J., Collins, A. M., Murdoch, W. J., & Hansen, T. R. (1999b). Endometrial ISG1 7 mRNA and a Related mRNA Are Induced by Interferon-tau and Localized to Glandular Epithelial and Stromal Cells from Pregnant Cows. In *Endocrine* (Vol. 10, Issue 3).
- Johnson, G. A., Spencer, T. E., Hansen, T. R., Austin, K. J., Burghardt, R. C., & Bazer, F. W. (1999). Expression of the Interferon Tau Inducible Ubiquitin Cross-Reactive Protein in the Ovine Uterus 1. In *BIOLOGY OF REPRODUCTION* (Vol. 61).
- Kadokawa, H., Sakatani, M., & Hansen, P. J. (2012). Perspectives on improvement of reproduction in cattle during heat stress in a future Japan. In *Animal Science Journal* (Vol. 83, Issue 6, pp. 439–445). <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2012.01011.x>
- Kerbler, T. L., Buhr, M. M., Jordan, L. T., Leslie, K. E., & Walton, J. S. (1997). RELATIONSHIP BETWEEN MATERNAL PLASMA PROGESTERONE CONCENTRATION AND INTERFERON-TAU SYNTHESIS BY THE CONCEPTUS IN CATTLE. *Theriogenology*, *47*(3), 703–714. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(97\)00028-9](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(97)00028-9)
- Kim, M. S., Min, K. S., & Imakawa, K. (2013). Regulation of interferon-stimulated gene (ISG)12, ISG15, and MX1 and MX2 by conceptus interferons (IFNTs) in bovine uterine epithelial cells. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *26*(6), 795–803. <https://doi.org/10.5713/ajas.2012.12529>

- Kim, S. H., Lee, J. H., & Yoon, J. T. (2019). Expression of matrix metalloproteinases to induce the expression of genes associated with apoptosis during corpus luteum development in bovine. *PeerJ*, 2019(1). <https://doi.org/10.7717/peerj.6344>
- Kliem, H., Welter, H., Kraetzel, W. D., Steffl, M., Meyer, H. H. D., Schams, D., & Berisha, B. (2007). Expression and localisation of extracellular matrix degrading proteases and their inhibitor during the oestrous cycle and after induced luteolysis in the bovine corpus luteum. *Reproduction*, 134(3), 535–547. <https://doi.org/10.1530/REP-06-0172>
- Knickerbocker, J. J., Wiltbank, M. C., & Niswender, G. D. (1988). Mechanisms of luteolysis in domestic livestock. In *DOMESTIC ANIMAL ENDOCRINOLOGY* (Vol. 5, Issue 2).
- Macías-Cruz, U., Gastélum, M. A., Álvarez, F. D., Correa, A., Díaz, R., Meza-Herrera, C. A., Mellado, M., & Avendaño-Reyes, L. (2016). Effects of summer heat stress on physiological variables, ovulation and progesterone secretion in Pelibuey ewes under natural outdoor conditions in an arid region. *Animal Science Journal*, 87(3), 354–360. <https://doi.org/10.1111/asj.12430>
- Mann, G. E., & Lamming, G. E. (2001). Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*, 121, 175–180. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210175>
- Martal, J., Lacroix, M.-C., Loudes, C., Saunier, M., & Torralba, S. W. (1979). Trophoblastin, an antiluteolytic protein present in early pregnancy in sheep. *Journal of Reproduction & Fertilization*, 56, 63–73. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0560063>
- McCracken, J. A., Custer, E. E., & Lamsa, J. C. (1999). *Luteolysis: A Neuroendocrine-Mediated Event*. [www.physiology.org/journal/physrev](http://www.physiology.org/journal/physrev)
- Mirando, M. A., Short, E. C., Geisert, R. D., Vallet, J. L., & Bazer, F. W. (1991). Stimulation of 2',5'-oligoadenylate synthetase activity in sheep endometrium during pregnancy, by intrauterine infusion of ovine trophoblast protein-1, and by intramuscular administration of recombinant bovine interferon-alpha II. *Journals of Reproduction & Fertility LTD*, 93, 599–607. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0930599>
- Moor, R. M., & Rowson, L. E. A. (1966). LOCAL UTERINE MECHANISMS AFFECTING LUTEAL FUNCTION IN THE SHEEP. *Journal of Reproduction & Fertilization*, 11, 307–310. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0110307>

- Niswender, G. D., Juengel, J. L., Silva, P. J., Rollyson, M. K., & McIntush, E. W. (2000). *Mechanisms Controlling the Function and Life Span of the Corpus Luteum*. [www.physiology.org/journal/physrev](http://www.physiology.org/journal/physrev)
- Oliveira, J. F., Henkes, L. E., Ashley, R. L., Purcell, S. H., Smirnova, N. P., Veeramachaneni, D. N. R., Anthony, R. v., & Hansen, T. R. (2008). Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN- $\tau$  release from the uterine vein. *Endocrinology*, *149*(3), 1252–1259. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0863>
- Ott, T. L., Yin, J., Wiley, A. A., Kim, H.-T., Gerami-Naini, B., Spencer, T. E., Bartol, F. F., Burghardt, R. C., & Bazer, F. W. (1998). Effects of the Estrous Cycle and Early Pregnancy on Uterine Expression of Mx Protein in Sheep (*Ovis aries*) 1. In *BIOLOGY OF REPRODUCTION* (Vol. 59).
- Polsky, L., & von Keyserlingk, M. A. G. (2017). Invited review: Effects of heat stress on dairy cattle welfare. *Journal of Dairy Science*, *100*(11), 8645–8657. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12651>
- Raheem, K. A. (2017). An insight into maternal recognition of pregnancy in mammalian species. In *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences* (Vol. 16, Issue 1, pp. 1–6). King Saud University. <https://doi.org/10.1016/j.jssas.2015.01.002>
- Ribeiro, E. S., Greco, L. F., Bisinotto, R. S., Lima, F. S., Thatcher, W. W., & Santos, J. E. (2016). Biology of preimplantation conceptus at the onset of elongation in dairy cows. *Biology of Reproduction*, *94*(4). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.134908>
- Roberts, R. M., Xie, S., & Mathialagan, N. (1996). Maternal Recognition of Pregnancy'. In *BIOLOGY OF REPRODUCTION* (Vol. 54). <https://academic.oup.com/biolreprod/article/54/2/294/2761825>
- Robinson, R. S., Fray, M. D., Wathes, D. C., Lamming, G. E., & Mann, G. E. (2006). In vivo expression of interferon tau mRNA by the embryonic trophoblast and uterine concentrations of interferon tau protein during early pregnancy in the cow. *Molecular Reproduction and Development*, *73*(4), 470–474. <https://doi.org/10.1002/mrd.20431>
- Roth, Z., Meidan, R., Shaham-Albalancy, A., Braw-Tal, R., & Wolfenson, D. (2001). *Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles*. <https://doi.org/10.1530/reprod/121.5.745>

- Sakamoto, K., Miwa, K., Ezashi, T., Okuda-Ashitaka, E., Okuda, K., Houtani, T., Sugimoto, T., Ito, S., & Hayaishi, O. (1995). Expression of mRNA encoding the prostaglandin F2 receptor in bovine corpora lutea throughout the oestrous cycle and pregnancy. *Journal of Reproduction & Fertility*, *103*, 99–105. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1030099>
- Sakatani, M. (2017). *Effects of heat stress on bovine preimplantation embryos produced in vitro*. <https://doi.org/10.1262/jrd.2017-045>
- Sánchez, J. M., Mathew, D. J., Behura, S. K., Passaro, C., Charpigny, G., Butler, S. T., Spencer, T. E., & Lonergan, P. (2019). Bovine endometrium responds differentially to age-matched short and long conceptuses. *Biology of Reproduction*, *101*(1), 26–39. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz060>
- Sartori, R., Sartor-Bergfelt, R., Mertens, S. A., Guenther, J. N., Parrish, J. J., & Wiltbank, M. C. (2002). Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science*, *85*(11), 2803–2812. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74367-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74367-1)
- Sato, Y., Abe, M., Tanaka, K., Iwasaka, C., Oda, N., Kanno, S., Oikawa, M., Nakano, T., & Igarashi, T. (2000). Signal transduction and transcriptional regulation of angiogenesis. In M. Maragoudakis (Ed.), *Angiogenesis: from the molecular to integrative pharmacology* (Vol. 476, pp. 109–115). [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4221-6\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4221-6_9)
- Schüller, L. K., Burfeind, O., & Heuwieser, W. (2014). Impact of heat stress on conception rate of dairy cows in the moderate climate considering different temperature-humidity index thresholds, periods relative to breeding, and heat load indices. *Theriogenology*, *81*(8), 1050–1057. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.01.029>
- Skopets, B., Li, J., Thatcher, W. W., Roberts, R. M., & Hansen, P. J. (1992). Inhibition of lymphocyte proliferation by bovine trophoblast protein-1 (Type I trophoblast interferon) and bovine interferon- $\alpha$  1. In *Veterinary Immunology and Immunopathology* (Vol. 34).
- Slimen, I. B., Najar, T., Ghram, A., Dabbebi, H., ben Mrad, M., & Abdrabbah, M. (2014). Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. In *International Journal of Hyperthermia* (Vol. 30, Issue 7, pp. 513–523). Informa Healthcare. <https://doi.org/10.3109/02656736.2014.971446>

- Spencer, T. E., & Bazer, F. W. (1996). *Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium*. <https://doi.org/10.1210/endo.137.3.8603586>
- Spencer, T. E., & Bazer, F. W. (2004). Conceptus signals for establishing and maintenance of pregnancy. In *Reproductive Biology and Endocrinology* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-49>
- Spencer, T. E., Johnson, G. A., Bazer, F. W., Burghardt, R. C., & Palmarini, M. (2007). Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: Roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. In *Reproduction, Fertility and Development* (Vol. 19, Issue 1, pp. 65–78). <https://doi.org/10.1071/RD06102>
- Sponchiado, M., Gomes, N. S., Fontes, P. K., Martins, T., del Collado, M., Pastore, A. D. A., Pugliesi, G., Nogueira, M. F. G., & Binelli, M. (2017). Pre-hatching embryo-dependent and -independent programming of endometrial function in cattle. *PLoS ONE*, *12*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175954>
- Sponchiado, M., Gonella-Diaza, A. M., Rocha, C. C., Turco, E. G. L., Pugliesi, G., Leroy, J. L. M. R., & Binelli, M. (2019). The pre-hatching bovine embryo transforms the uterine luminal metabolite composition in vivo. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44590-9>
- Stocco, C., Telleria, C., & Gibori, G. (2007). The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. In *Endocrine Reviews* (Vol. 28, Issue 1, pp. 117–149). Endocrine Society. <https://doi.org/10.1210/er.2006-0022>
- Talukder, A. K., Rashid, M. B., Yousef, M. S., Kusama, K., Shimizu, T., Shimada, M., Suarez, S. S., Imakawa, K., & Miyamoto, A. (2018). Oviduct epithelium induces interferon-tau in bovine Day-4 embryos, which generates an anti-inflammatory response in immune cells. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26224-8>
- Wang, X. L., Wang, K., Han, G. C., & Zeng, S. M. (2013). A potential autocrine role for interferon Tau in ovine trophectoderm. *Reproduction in Domestic Animals*, *48*(5), 819–825. <https://doi.org/10.1111/rda.12169>
- Wilson, S. J., Kirby, C. J., Koenigsfeld, A. T., Keisler, D. H., & Lucy, M. C. (1998). Effects of Controlled Heat Stress on Ovarian Function of Dairy Cattle. 2. Heifers. *Journal of Dairy Science*, *81*(8), 2132–2138. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75789-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75789-3)



- Wilson, S. J., Marion, R. S., Spain, J. N., Spiers, D. E., Keisler, D. H., & Lucy, M. C. (1998). Effects of Controlled Heat Stress on Ovarian Function of Dairy Cattle. 1. Lactating Cows. *Journal of Dairy Science*, *81*(8), 2124–2131. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(98\)75788-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(98)75788-1)
- Wiltbank, M. C., Baez, G. M., Garcia-Guerra, A., Toledo, M. Z., Monteiro, P. L. J., Melo, L. F., Ochoa, J. C., Santos, J. E. P., & Sartori, R. (2016). Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology*, *86*(1), 239–253. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.037>
- Wolfenson, D., Roth, Z., & Meidan, R. (2000). Impaired reproduction in heat-stressed cattle: Basic and applied aspects. *Animal Reproduction Science*, *60–61*, 535–547. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00102-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00102-0)
- Yao, N., Wan, P. C., Hao, Z. D., Gao, F. F., Yang, L., Cui, M. S., Wu, Y., Liu, J. H., Liu, S., Chen, H., & Zeng, S. M. (2009). Expression of interferon-tau mRNA in bovine embryos derived from different procedures. *Reproduction in Domestic Animals*, *44*(1), 132–139. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.01009.x>