

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

Fabício Amadori Machado

**PERFIL DA EXPRESSÃO DE *ISG15* NO SANGUE PERIFÉRICO
DURANTE O PERÍODO DE RECONHECIMENTO MATERNO DA
GESTAÇÃO EM BOVINOS**

Santa Maria, RS
2018

Fabício Amadori Machado

PERFIL DA EXPRESSÃO DE *ISG15* NO SANGUE PERIFÉRICO DURANTE O PERÍODO DE RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO EM BOVINOS

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: Dr. Alfredo Quites Antoniazzi
Co-orientadora: Dra. Monique TomazeleRovani

Santa Maria, RS
2018

Machado, Fabrício Amadori

Perfil da expressão de ISG15 no sangue periférico durante o período de reconhecimento materno da gestação em bovinos / Fabrício Amadori Machado.- 2018.

47 p.; 30 cm

Orientador: Alfredo Antoniazzi

Coorientadora: Monique Rovani

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2018

1. ISG15 2. Sinalização embrionária 3. Novilhas de corte 4. Diagnóstico de gestação 5. células do sangue periférico I. Antoniazzi, Alfredo II. Rovani, Monique III. Título.

Fabício Amadori Machado

PERFIL DA EXPRESSÃO DE *ISG15* NO SANGUE PERIFÉRICO DURANTE O PERÍODO DE RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO EM BOVINOS

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 27 de fevereiro de 2018:

Alfredo Quites Antoniazi, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Fernando Silveira Mesquita, PhD (Unipampa)

Mateus José Sudano, Dr. (Unipampa)

Santa Maria, RS
2018

RESUMO

PERFIL DA EXPRESSÃO DE *ISG15* NO SANGUE PERIFÉRICO DURANTE O PERÍODO DE RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO EM BOVINOS

AUTOR: Fabrício Amadori Machado
ORIENTADOR: Alfredo Quites Antoniazzi

O período de reconhecimento materno da gestação (RMG) em ruminantes é um evento complexo, envolvendo diversos mecanismos celulares. É nesse momento que ocorre a maior mortalidade embrionária em bovinos. O período de RMG é caracterizado pela secreção de interferon tau (IFNT) pelas células do trofoblasto do embrião, com maior intensidade aos 18 dias de gestação. A principal função dessa proteína é manter o corpo lúteo em plena atividade, evitando a luteólise. A ação direta do IFNT em tecidos extrauterinos eleva a expressão de genes estimulados por interferon (ISGs destacando-se o gene estimulado por interferon 15 (*ISG15*). A elevação dos níveis da expressão de ISGs em células sanguíneas e luteais ocorrem logo após a sinalização por IFNT no início da gestação em ruminantes. As células polimorfonucleares do sangue periférico (PMN) são mais sensíveis ao estímulo do IFNT comparadas às células mononucleares do sangue periférico (PBMC). Os objetivos deste estudo são: (1) determinar o tempo mais precoce possível para identificar a expressão de *ISG15* em novilhas de corte gestantes; (2) estabelecer a fração celular sanguínea para determinar o diagnóstico precoce de gestação com alta acurácia em novilhas de corte; e, (3) demonstrar o perfil da expressão de *ISG15* nos dias 16 e 18 após a inseminação artificial (IA). A sincronização do ciclo estral foi realizada em 28 novilhas. O diagnóstico de gestação foi realizado nos dias 29 e 60 após IA e resultou em 10 novilhas gestantes, 14 novilhas não gestantes, e 4 novilhas não inseminadas (grupo controle negativo). O sangue foi coletado da veia coccígea após a IA (dias 16 e 18). As frações celulares de PBMC e PMN foram coletadas e armazenadas a -80°C até a posterior manipulação de RNA, cDNA e qPCR. A expressão relativa de *ISG15* diferiu entre a fração celular de PMN e PBMC de novilhas gestantes ($p < 0,0001$). A expressão do *ISG15* em células PMN no dia 16 diferiu entre novilhas gestantes e novilhas não inseminadas ($p < 0,04$), bem como no dia 18 após IA ($p < 0,01$). No entanto, a expressão do *ISG15* em células PMN no dia 16 não diferiu entre novilhas gestantes e novilhas não gestantes. Em PBMC, a expressão do *ISG15* no dia 16 não diferiu entre as novilhas gestantes, não gestantes e não inseminadas. No entanto, no dia 18 após IA, há uma diferença na expressão de *ISG15* entre novilhas gestantes e não gestantes ($p < 0,02$). A expressão de *ISG15* nas células PMN aos 16 e 18 de gestação é ao menos 30 vezes maior do que a expressão em PBMC. Além disso, a expressão de *ISG15* em PMN pode ser usada para identificação da sinalização embrionária aos 16 e 18 dias após a inseminação em novilhas de corte. A expressão de *ISG15* em PMN no dia 18 após a IA resultou em 93% de acurácia para o diagnóstico de gestação. Sugerimos que ambas as frações celulares (PMN e PBMC) podem ser utilizadas como ferramentas para identificar a sinalização embrionária aos 18 dias de gestação em novilhas de corte.

Palavras-chave: *ISG15*, sinalização embrionária, células polimorfonucleares do sangue periférico, células mononucleares do sangue periférico, diagnóstico de gestação, novilhas de corte.

ABSTRACT

***ISG15* EXPRESSION PROFILE IN PERIPHERAL BLOOD DURING THE MATERNAL RECOGNITION OF PREGNANCY IN CATTLE**

AUTHOR: Fabrício Amadori Machado

ADVISOR: Alfredo Quites Antoniazzi

The maternal recognition of pregnancy (MRP) in ruminants is a complex event, involving several cellular mechanisms. It is at that moment that the highest embryonic mortality occurs in cattle. The MRP period is characterized by the secretion of interferon tau (IFNT) by the embryo. IFNT is produced and secreted by the trophoblast cells of the embryo, with greater intensity at 18 days of pregnancy. The main function of this protein is to keep the corpus luteum fully active, avoiding luteolysis. Direct action of IFNT on extrauterine tissues raises the expression of interferon-stimulated genes (ISGs). Among the ISGs stimulated by IFNT, the gene stimulated by interferon 15 (*ISG15*) stands out. Studies have demonstrated endocrine action of IFNT. An elevation in ISG expression levels in blood and luteal cells was observed shortly after signaling by IFNT at the start of gestation in ruminants. Peripheral blood polymorphonuclear cells (PMN) are more sensitive to the IFNT stimulus compared to peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The objectives of this study are: (1) to determine the earliest possible time to identify *ISG15* expression in pregnant heifers; (2) establish the cell fraction to determine the early diagnosis of pregnancy with high accuracy in cut heifers; (3) demonstrate the expression profile of *ISG15* on days 16 and 18 after artificial insemination (AI). Synchronization of the estrous cycle was performed in 28 heifers. The pregnancy diagnosis was performed on days 29 and 60 after AI and resulted in 10 pregnant heifers, 14 non-pregnant heifers, and 4 non-inseminated heifers (negative control group). Blood was collected from the coccygeal vein after AI (Days 16 and 18). Cellular fractions of PBMC and PMN were collected and stored at -80 ° C until further extraction of RNA, cDNA and qPCR, respectively. The relative expression of *ISG15* differed between the PMN and PBMC cell fraction of pregnant heifers ($p < 0.0001$). *ISG15* expression in PMN cells on Day 16 differed from heifers and non-inseminated heifers ($p < 0.04$), as well as on Day 18 after AI ($p < 0.01$). However, *ISG15* expression in PMN cells on Day 16 did not differ from pregnant heifers and non-pregnant heifers. In PBMC cells, *ISG15* expression on Day 16 did not differ from pregnant, non-pregnant and non-inseminated heifers. However, on Day 18 after AI, there is a difference in *ISG15* expression of pregnant and non-pregnant heifers ($p < 0.02$). Expression of *ISG15* in PMN cells on Days 16 and 18 pregnancy is greater 30 times than expression in PBMC. In addition, the expression of *ISG15* in PMN can be used to identify embryonic signaling on Day 16 after insemination in beef heifers. Expression of *ISG15* in PMN on Day 18 after AI resulted in 93% accuracy for the diagnosis of pregnancy. We suggest that both cellular fractions (PMN and PBMC) can be used as a tool to identify embryonic signaling on Day 18 of pregnancy in beef heifers.

Keywords: *ISG15*, embryonic signaling, peripheral blood polymorphonuclear cells, peripheral blood mononuclear cells, diagnosis of gestation, beef heifers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Desenvolvimento embrionário inicial em ruminantes.	11
Figura 2. Regulação hormonal do mecanismo endometrial luteolítico e antiluteolítico através da sinalização da secreção de IFNT pelo embrião.	12
Figura 3. Mecanismo de ação parácrina do interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em bovinos.	13
Figura 4. Regulação endócrina do interferon tau (IFNT).	15
Figura 5. Proposta da sinalização do IFNT nas células imunes e luteais na transformação do corpo lúteo cíclico em corpo lúteo da gestação.	19

Capítulo I

Figure 1. Experimental design. A) Estrous cycle synchronization protocol and AI. Only animals that exhibited estrus by 36 hours after receiving PGF were included in the experiment. AI was performed 48 hours (Day 0) after withdrawal of intravaginal device (IVD). Transrectal ultrasonography scanning (US) was performed previous to AI (Days -10), at the moment of AI (Day 0), and on Days 18, 29 and 60, following AI. Blood was collected after AI (Days 16 and 18). B) Isolation of leukocytes scheme. After centrifugation, the following fractions were obtained: plasma, peripheral blood mononuclear cells (PBMC), erythrocytes and polymorphonuclear cells (PMN). Abbreviations: EB, estradiol benzoate; US, ultrasound scanning.	37
Figure 2. Characterization of ovarian structures at synchronization protocol. A) Diameter (mm) of preovulatory follicle at AI (Day 0). B) Diameter (mm) of corpus luteum on the Day 18 following AI. Values are presented as mean \pm SE (n = 28; P > 0.05).	38
Figure 3. <i>ISG15</i> expression on polymorphonuclear cells (PMN) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) on Days 16 and 18. Values are presented as mean \pm SE (p<0.0001).	39
Figure 4. <i>ISG15</i> expression in polymorphonuclear cells (PMN) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) on Days 16 and 18 after AI. A) PMN on Day 16 (n=12); B) PMN on Day 18 (n=28); C) PBMC on Day 16 (n=12); and D) PBMC on Day 18 (n=15). Values are presented as mean \pm SE. Different letters indicate p<0.05.	40
Figure 5. Receiver operator characteristic (ROC) curves for <i>ISG15</i> expression on PMN on Day 18 after AI in beef heifers. Area under the ROC curve 0.93 (n=24).	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 Reconhecimento materno da gestação em ruminantes	11
2.2 Receptores de interferon tipo I.....	13
2.3 Genes estimulados por interferon tau (ISGs).....	14
2.4 Ação endócrina do IFNT	14
2.5 Gene estimulado por interferon 15 (<i>ISG15</i>).....	15
2.6 Expressão de <i>ISGs</i> nas células sanguíneas periféricas.....	16
2.7 Diagnóstico precoce de gestação em bovinos.....	20
2.8 Diagnóstico de mortalidade embrionária no primeiro mês de gestação em bovinos.....	21
3 CAPÍTULO I.....	24
4 CONCLUSÃO.....	42
5 REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

A perda da gestação pode ocorrer em diferentes períodos do desenvolvimento embrionário ou fetal (BERG et al., 2010; WILTBANK et al., 2016). Existe uma variedade de causas que ocasionam a perda de gestação, sendo que, produzem um impacto negativo para os desempenhos reprodutivos e econômicos nos rebanhos bovinos. Estima-se que cerca de 50% das perdas gestacionais ocorram no primeiro mês de gestação em bovinos (BERG et al., 2010; WILTBANK et al., 2016).

O reconhecimento materno da gestação (RMG) é um evento complexo, envolvendo mecanismos celulares autócrinos, parácrinos e endócrinos (NISWENDER et al., 2000; ANTONIAZZI et al., 2010). O RMG é compreendido entre os dias 12 e 21 da gestação. O principal fato desse período é a presença do embrião no lúmen uterino secretando uma proteína denominada interferon tau (IFNT), sendo uma das suas funções regular a expressão gênica no endométrio e inibir a luteólise (OLIVEIRA et al., 2008; ANTONIAZZI et al., 2013; ZHAO et al., 2018). O IFNT também atua de forma parácrina no útero, juntamente com a progesterona, estimulando a produção de histotrofo pelo endométrio e melhorando o desenvolvimento embrionário (CLEMENTE et al., 2009; FORDE et al., 2009). Através da ação endócrina, o IFNT também eleva a expressão genes estimulados por interferon (*ISGs*) em tecidos extrauterinos (OLIVEIRA et al., 2008).

Recentemente, a expressão *ISGs* em leucócitos de sangue periférico tem sido uma alternativa como ferramenta para diagnóstico precoce de gestação (HAN et al., 2006; GIFFORD et al., 2007; GREEN et al., 2010). A expressão de *ISGs* em leucócitos durante o RMG identifica indiretamente a sinalização do IFNT produzido pelo embrião, pois apresenta uma correlação positiva entre quantidade de IFNT no lúmen uterino e expressão de *ISGs* em leucócitos de sangue periférico (MATSUYAMA et al., 2012). Porém, esta metodologia apresenta resultados inconsistentes para o diagnóstico de gestação e também é pouco utilizada para avaliar a mortalidade embrionária. Além disso, a maioria das pesquisas utiliza leucócitos totais de sangue periférico (PBL) e células mononucleares de sangue periférico (PBMC) para diagnóstico precoce de gestação, principalmente na bovinocultura leiteira (GIFFORD et al., 2007; GREEN et al., 2010; HAQ et al., 2016; SOUMYA et al., 2016). No entanto, sabe-se que a população de células polimorfonucleares de sangue periférico (PMN) são mais sensíveis ao estímulo de IFNT para a expressão de *ISGs* comparada à PBMC (SHIRASUNA et al., 2012; KIZAKI et al., 2013; TOJI et al., 2017).

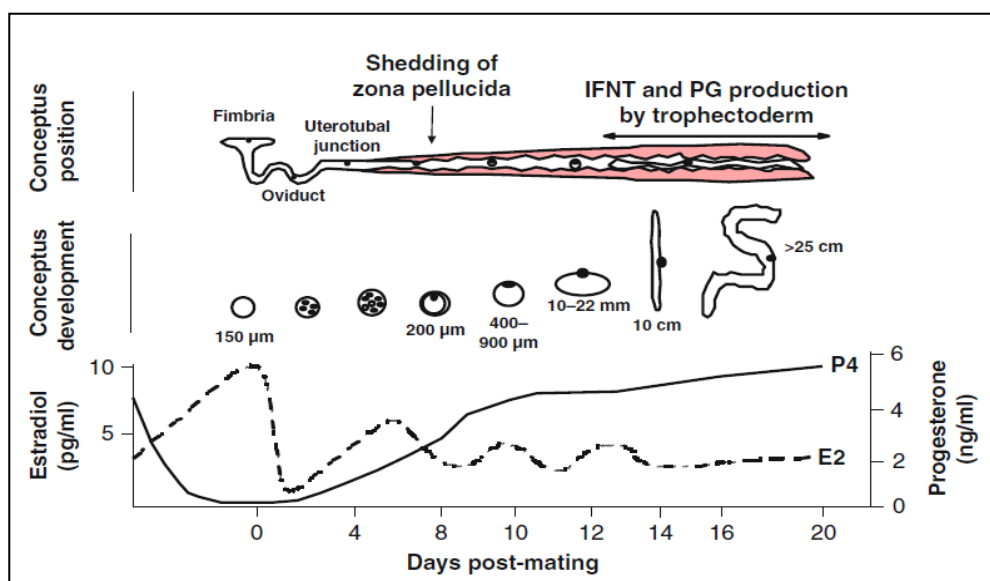
Estudos em bovinocultura de corte, com foco em diagnóstico de gestação e mortalidade embrionária em novilhas através da avaliação de *ISG15* em distintas populações de leucócitos (PBMC e PMN) não foram conduzidos. Portanto, são necessários estudos para elucidar os eventos que ocorrem nesse período de reconhecimento materno da gestação, visando gerar biotecnologias para identificar animais que apresentam mortalidade embrionária, e conseqüentemente, gerar ferramentas de diagnóstico super precoce de gestação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Reconhecimento materno da gestação em ruminantes

O reconhecimento materno da gestação (RMG) é o período em que o conceito sinaliza sua presença para a mãe. Em bovinos, a sinalização ocorre com maior intensidade entre os dias 12 a 26 de gestação através de uma proteína denominada interferon tau (IFNT) (FARIN et al., 1990; ROBERTS, 1993). O período de sinalização coincide com o alongamento do embrião e a máxima produção de IFNT (Figura 1) (BERG et al., 2010; GEISERT & BAZER, 2015). Sabe-se que o embrião já inicia sua sinalização aos 7 dias do desenvolvimento, nas células do endométrio localizadas na região úterotubárica ipsilateral ao corpo lúteo (SPONCHIADO et al., 2017).

Figura 1. Desenvolvimento embrionário inicial em ruminantes.



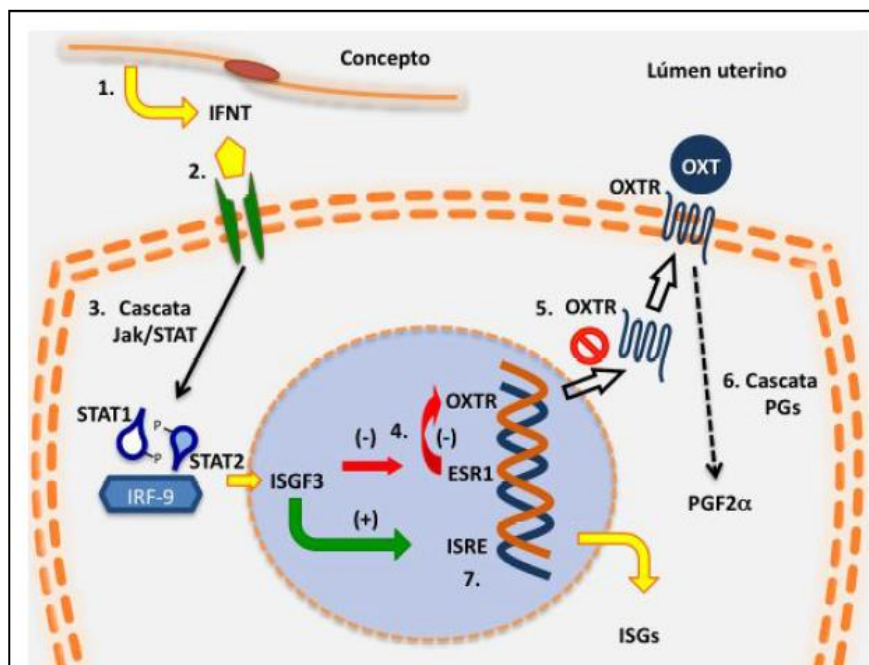
Fonte: (SPENCER & HANSEN, 2015)

A progesterona é um hormônio essencial para o desenvolvimento do embrião e manutenção da gestação (CLEMENTE et al., 2009). Animais com elevada concentração sérica de progesterona durante o RMG tem maior crescimento do embrião e maior produção de IFNT pelas células do trofoblasto (CLEMENTE et al., 2009; O'HARA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2016). O diâmetro folicular também é importante, pois vacas com maior foliculo préovulatório desenvolvem um corpo lúteo de maior diâmetro, portanto, produzem mais progesterona, favorecendo o desenvolvimento embrionário (RIBEIRO et al., 2016). A

2.2 Receptores de interferon tipo I

O IFNT liga-se aos receptores de interferon tipo I (IFNAR1 e IFNAR2) e induz sua resposta por meio da sinalização via janusquinase (JAK) e proteínas transdutoras de sinais e ativadoras da transcrição (STAT) (BINELLI et al., 2001). Os receptores de interferon alfa e beta subunidades 1 (IFNAR1) e 2 (IFNAR2) são expressos em todos os tecidos corporais e têm como função principal mediar respostas antivirais (SADLER & WILLIAMS, 2008). Também estão localizados no útero para mediar respostas maternas em função do IFNT produzido pelo embrião. O IFNT se liga a esses receptores para exercer sua ação pela via de transdução de sinais JAK/STAT, onde as proteínas tirosino-quinases fosforilam proteínas STAT formando complexos multiméricos que agem como fatores de transcrição (BINELLI et al., 2001). Esses complexos se ligam a regiões definidas no DNA, chamadas de elementos responsivos à estimulação por interferons (ISREs), que regulam a expressão de genes estimulados por interferon (ISGs) (Figura 3) (HANSEN et al., 1998; ANTONIAZZI et al., 2010).

Figura 3. Mecanismo de ação parácrina do interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em bovinos.



Fonte: (ANTONIAZZI et al., 2010).

2.3 Genes estimulados por interferon tau (ISGs)

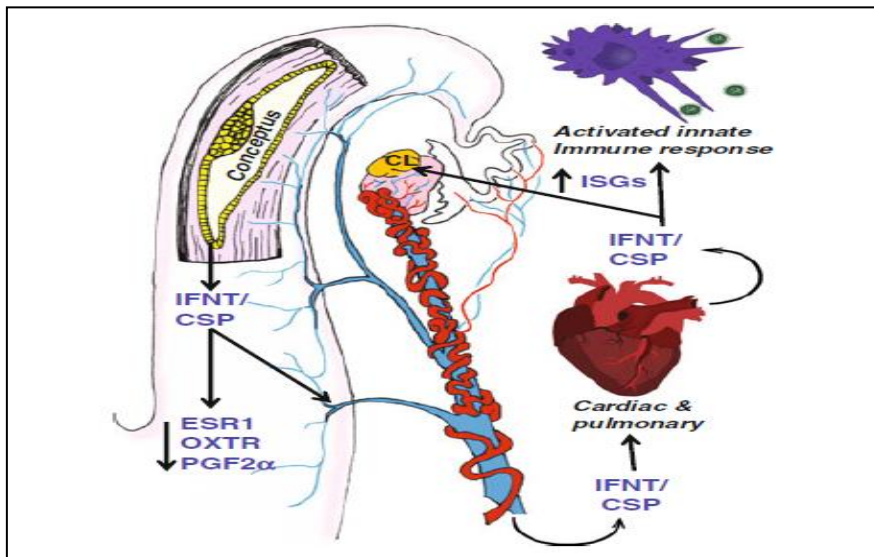
Dentre os ISGs que aumentam a expressão de RNAm durante o início da gestação em resposta ao IFNT, estão os genes 2',5' oligoadenilatosintetase (*OAS1*) (MIRANDO et al., 1991; SCHMITT et al., 1993), o gene de resistência ao myxovirus 1 (*MX1*) (OTT et al., 1998) e o gene estimulado por interferon 15 (*ISG15*) (AUSTIN et al., 1996). Estudos demonstraram a expressão de ISGs em leucócitos do sangue periférico (HAN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008) e células luteais (OLIVEIRA et al., 2008), logo após a sinalização por IFNT no início da gestação em ruminantes. As funções destas proteínas induzidas por IFNT na resposta antiviral estão bem caracterizadas (SADLER & WILLIAMS, 2008). No entanto, a sua função de ISGs durante o reconhecimento materno da gestação ainda não foi estabelecida.

2.4 Ação endócrina do IFNT

Até o momento, não foi possível mensurar a presença do IFNT na circulação periférica. No entanto, foi demonstrado que o IFNT possui uma ação endócrina em outros locais, como por exemplo, células imunes e luteais (HAN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008). A comprovação da saída de IFNT do útero pela veia uterina sugere que a ação endócrina do IFNT possa ser um mecanismo complementar ao mecanismo intrauterino de RMG (OLIVEIRA et al., 2008). Um dos estudos conduzidos para elucidar sua ação endócrina foi realizado através da infusão de IFNT recombinante ovino (roIFNT) na veia uterina de ovelhas. Os resultados demonstraram que a infusão de IFNT estende o ciclo estral (pseudogestação) além do dia 32, ou seja, o IFNT preserva a funcionalidade do corpo lúteo (BOTT et al., 2010).

A ação direta do IFNT em tecidos extrauterinos eleva a expressão de ISGs que, no corpo lúteo, estão envolvidos com a resistência à ação luteolítica da PGF (ANTONIAZZI et al., 2013). O IFNT aumenta a expressão de vários ISGs no endométrio, corpo lúteo, fígado e em células sanguíneas durante o RMG (Figura 4) (OLIVEIRA et al., 2008). Recentemente foi verificado que a sinalização do embrião no endométrio ocorre antes do período clássico do RMG, especificamente na junção úterotubárica, aos sete dias do desenvolvimento embrionário, elevando a expressão de genes no endométrio, dentre eles *ISG15* (SPONCHIADO et al., 2017).

Figura 4. Regulação endócrina do interferon tau (IFNT).



Fonte: (SPENCER & HANSEN, 2015)

2.5 Gene estimulado por interferon 15 (*ISG15*)

O *ISG15*, também conhecido por proteína de reação cruzada de ubiquitina (UCRP), foi identificado logo após a descoberta da ubiquitina, e imediatamente reconhecido como um homólogo de ubiquitina (LOEB & HAAS, 1992). O *ISG15* é uma das principais proteínas induzidas durante a infecção viral via resposta por interferon tipo I (SADLER & WILLIAMS, 2008). Além da resposta antiviral, o *ISG15* tem sido pesquisado também como marcador de gestação em bovinos e ovinos (HAN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008; YOSHINO et al., 2018).

Ubiquitinas são pequenos polipeptídeos e a ligação de uma ou várias resulta no processo denominado de ubiquitinação. A ubiquitinação frequentemente serve para marcar proteínas para degradação proteolítica pelos lisossomas ou proteossomas, este último sendo o passo crítico na via de MHC de classe I do processamento e apresentação de antígeno (HERSHKO et al., 2000). A ubiquitinação de proteínas regula muitos aspectos da resposta imune inata, incluindo a transdução de sinal intracelular como a ativação do fator nuclear κ B e funções do sistema imune adaptativo (LIU et al., 2005).

O *ISG15*, proteína semelhante à ubiquitina se liga a proteínas alvo através da ação sequencial de três enzimas: enzima ativadora de ubiquitina E1 (UBE1L), a enzima conjugadora E2 (UBCH8), e a grande ligante E3 (Herc5). O processo de ativação de *ISG15* e ubiquitina é semelhante (NARASIMHAN et al., 1996). A distinção é que a afinidade de

ligação de E1 para ISG15 é significativamente diminuída em relação à da ubiquitina. Portanto, a conjugação de ISG15 prossegue através de uma via enzimática distinta da ubiquitina, pelo menos em relação ao passo de ativação. Assim, as células responsivas ao INF possuem uma via de ligação do ISG15 que é paralela, mas distinta da ubiquitina (NARASIMHAN et al., 1996).

Além da sua função intracelular, o ISG15 é secretado em grandes quantidades no ambiente extracelular e foi demonstrado como uma citocina moduladora das respostas imunes (D'CUNHA et al., 1996). O mecanismo pelo qual as funções extracelulares de ISG15 ocorrem não está claro. As ubiquitinas também são secretadas de células e tem efeitos imunomoduladores que não estão esclarecidos (MAJETSCHAK et al., 2003). Em estudos realizados com a deleção de *ISG15* em ratos foi demonstrada uma alta taxa de mortalidade embrionária (70%), principalmente quando os animais eram submetidos a situações de estresse (HENKES et al., 2015).

O ISG15 foi identificado no endométrio bovino em resposta à gestação, sendo observado coincidentemente com a liberação de IFNT pelo embrião (AUSTIN et al., 1996; JOHNSON et al., 1998). A proteína ISG15 é detectada em quantidades significativas em lavados uterinos no dia 18 de gestação (AUSTIN et al., 1996; JOHNSON et al., 1998), e aos 20 dias de gestação em células mononucleares do sangue periférico (HAQ et al., 2016). As enzimas UBE1L e UBCH8 também são induzidas por interferon tipo 1 (SADLER & WILLIAMS, 2008). Baseado nisso, foi verificado que a secreção de IFNT pelo embrião também induz resposta nos níveis de *ISG15*, *UBE1L* e *UBCH8* em PBMC (HAQ et al., 2016). Portanto, o ISG15 pode estar envolvido na regulação de proteínas essenciais para o estabelecimento da gestação em ruminantes (HAQ et al., 2016).

2.6 Expressão de ISGs nas células sanguíneas periféricas

Devido à ação endócrina do IFNT, a expressão de ISGs em leucócitos totais de sangue periférico (PBL) vem sendo estudada como possível método para diagnóstico precoce de gestação (HAN et al., 2006; GREEN et al., 2010). As primeiras pesquisas utilizaram PBL entre 18 e 20 dias após a inseminação artificial (HAN et al., 2006; GIFFORD et al., 2007). Dentre os principais ISGs estudados, podemos destacar *ISG15*, *MX1*, *MX2* e *OAS1*.

A expressão de *ISG15* em PBL aos 18 dias após a inseminação artificial resultou em uma acurácia de 78% no diagnóstico de gestação (HAN et al., 2006). Baixos níveis de expressão de *ISG15*, aos 18 dias após a inseminação artificial, podem ser um indicador de

animais não gestantes, com 89-100% de acurácia (HAN et al., 2006). Outro grupo de pesquisadores também demonstrou que *ISG15* e *MX2*, tiveram uma menor expressão no sangue periférico de vacas leiteiras não gestantes em comparação a vacas gestantes, aos 18 dias após inseminação artificial (GIFFORD et al., 2007).

Sabe-se que o pico de produção de IFNT pelo embrião ocorre entre os dias 17 e 18 após a concepção (NISWENDER et al., 2000). No entanto, pesquisadores relataram que a expressão de *MX2* em leucócitos é maior, em vacas gestantes comparado a vacas não gestantes, aos 14 dias após a inseminação artificial (GREEN et al., 2010). Esses estudos demonstram que o IFNT transmite sinais endócrinos antes do dia 15 da gestação.

A população de leucócitos é constituída de vários tipos celulares, como os linfócitos, monócitos, neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Essas células são classificadas em dois grupos de acordo com as características de granulação e morfologia do núcleo. Os granulócitos polimorfonucleares (PMN) possuem granulações no citoplasma e núcleo multilobulado. Os tipos celulares que fazem parte dos PMN são os neutrófilos, eosinófilos e basófilos. As células mononucleares (PBMC) não possuem granulações no citoplasma e seu núcleo é regular, sem lobulações. Os tipos celulares que fazem parte dos PBMC são os monócitos e linfócitos (TIZARD, 2013).

Separando as populações de leucócitos em PBMC e PMN, observou-se uma diferença no perfil de expressão de ISGs durante o desenvolvimento embrionário em estudos realizados *in vivo*. A expressão de ISGs é maior em PMN em vacas gestantes a partir do dia 5 após a inseminação, sugerindo que essa população de células imunes seja mais sensibilizada na presença do embrião (SHIRASUNA et al., 2012). Na avaliação da expressão de ISGs em PBL, separando as frações em granulócitos, linfócitos e monócitos, ocorre uma maior expressão de ISGs em granulócitos (PMN), a partir dos 14 dias de gestação em bovinos (KIZAKI et al., 2013).

A presença de IFNT estimula a abundância de RNAm e proteínas de ISGs em cultivo *in vitro* de PMN e PBMC. Os níveis de RNAm e/ou proteína de *ISG15*, *UBE1L* e *UBCH8* aumentaram após o tratamento de PBMCs com diferentes concentrações de IFNT (HAQ et al., 2016). Mesmo na dose de 0,1ng/mL, o IFNT consegue estimular a expressão de ISGs apenas em PMN, demonstrando uma maior sensibilidade nesse tipo celular (SHIRASUNA et al., 2012). A expressão de ISGs (*ISG15*, *OAS1*, *MX1* e *MX2*) foi regulada nos PMN nos dias 12 a 21 após inseminação artificial em vacas gestantes (MANJARI et al., 2016).

A expressão de *ISG15* em PMN no dia 20 de gestação em bovinos é aproximadamente 26 vezes maior comparada com PBMC (HIRAYAMA et al., 2014). É possível que a vida útil

do tipo de células sanguíneas possa causar diferenças na sensibilidade ao IFNT, uma vez que os granulócitos são viáveis por apenas algumas horas, enquanto os linfócitos permanecem viáveis por 2 a 3 meses (TOJI et al., 2017). Sendo assim, a expressão de *ISGs* nos PMN destaca-se como um possível marcador de diagnóstico precoce de gestação no sangue periférico em bovinos, pois a expressão de *ISGs* reflete a sinalização momentânea de IFNT. Outra hipótese é que o número de receptores para IFNT seja diferente entre PMN e PBMC. Em estudos realizados *in vitro* foi verificado que o desafio com IFNT recombinante em PMN resultou no aumento de 30 a 900 vezes no número de receptores de IFNT (*IFNAR1* e *IFNAR2*), ao passo que em PBMC o mesmo desafio elevou em 1,5 a 2,5 vezes (TOJI et al., 2017). No entanto, quando as coletas foram realizadas em estudos *in vivo*, em vacas gestantes, essa diferença na expressão de receptores não ocorreu entre PMN e PBMC (TOJI et al., 2017). Portanto, o motivo exato da maior sensibilidade de PMN na expressão de *ISGs* ainda não está estabelecido.

O IFNT também atua modificando a expressão de interleucinas no período do reconhecimento materno da gestação em bovinos. A interleucina 10 (IL-10) possui ação anti-inflamatória. No cultivo *in vitro* de PBMC, o IFNT estimula a expressão de IL-10 (SHIRASUNA et al., 2012). A expressão de *IL-10* aumenta a partir do dia 8 após a inseminação artificial em vacas gestantes em PBMC (SHIRASUNA et al., 2012). No plasma, o aumento da citocina IL-10 foi detectado nos dias 12, 14, 18 e 21 após a inseminação artificial em vacas gestantes comparado a vacas não gestantes (MANJARI et al., 2016). Já a IL-8 é uma citocina pró-inflamatória, que sinaliza para a migração de neutrófilos. Ocorre um aumento de IL-8 no plasma e expressão de *IL-8* em PMN aos 14, 16 e 18 dias após o estro em vacas não gestantes. Elevadas concentrações de IL-8 indicam um aumento na resposta quimioestática de neutrófilos, que poderá prejudicar a implantação do embrião (MANJARI et al., 2016).

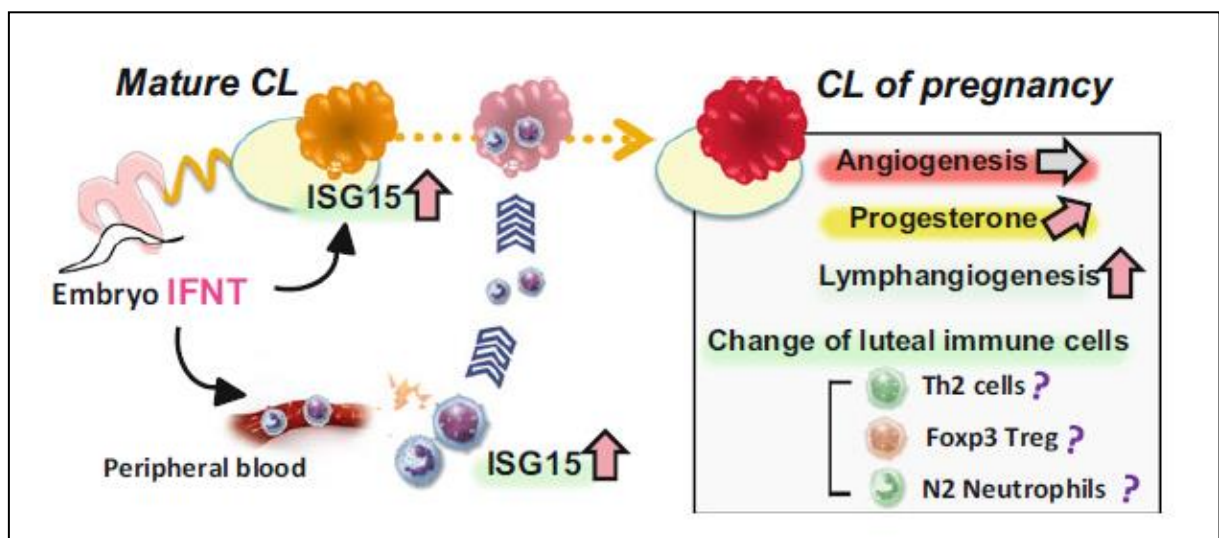
Os marcadores de adesão dos neutrófilos, a selectina (CD62L) e a integrina (CD11b) têm níveis de RNAm maiores em vacas não gestantes comparado a gestantes (MANJARI et al., 2016). Isso indica que os neutrófilos estão mais ativos durante os dias 12 a 18 após a inseminação em vacas não gestantes (MANJARI et al., 2016). A regulação na atividade de CD62L, CD11b e IL-8 em vacas não gestantes no início da gestação indica condição adversa para a implantação do embrião e, portanto, pode influenciar o resultados de gestação (MANJARI et al., 2016).

Existe uma complexa via entre hormônios esteróides e IFNT. Esta via regula a expressão de diversos genes no local de implantação do embrião no endométrio bovino, para a

manutenção da gestação (FORDE et al., 2011). O IFNT também atua modificando a expressão da proteína induzida por interferon gama (*IFI16*), também conhecida como ativadora da transcrição de diferenciação mielóide induzida por interferon (MANJARI et al., 2016). Uma das funções da IFI16 é regular a p53, proteína envolvida na morte celular programada (LIN et al., 2017). A expressão de *IFI16* foi maior no dia 16 após o estro no endométrio bovino de vacas gestantes (FORDE et al., 2011). A expressão de *IFI16* em PMN é maior nos dias 12, 14, 16, 18 e 21 após a inseminação artificial em vacas gestantes (MANJARI et al., 2016). No entanto, a função desses genes em neutrófilos durante o RMG necessita de investigações.

Alterações no sistema imune materno ocorrem antes e durante o período de reconhecimento materno da gestação. É clara a evidência de que o IFNT está presente na veia uterina e possui ação endócrina (OLIVEIRA et al., 2008). No entanto, como as células periféricas são condicionadas a expressar ISGs e quais suas funções, ainda segue sendo tema de pesquisas. Recentemente foi lançada uma proposta de que as células do sistema imune são condicionadas por IFNT na circulação periférica elevando a expressão de *ISG15*, e ao chegar ao corpo lúteo possuem uma ação ao qual sinalizam, juntamente com IFNT, na manutenção da produção de progesterona (Figura 5). Deste modo transformam o “corpo lúteo do ciclo estral” em “corpo lúteo da gestação” (SHIRASUNA & MIYAMOTO, 2017).

Figura 5. Proposta da sinalização do IFNT nas células imunes e luteais na transformação do corpo lúteo cíclico em corpo lúteo da gestação.



Fonte: (SHIRASUNA & MIYAMOTO, 2017)

2.7 Diagnóstico precoce de gestação em bovinos

A rentabilidade das fazendas deve-se a vários fatores, dentre eles o manejo reprodutivo. Com os programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) houve aumento da demanda de diagnóstico precoce nos rebanhos bovinos. Esse diagnóstico precoce de gestação é essencial para definir o futuro reprodutivo da matriz o mais breve possível, antecipando tomadas de decisões.

O método comumente utilizado para o diagnóstico precoce é a ultrassonografia transretal, sendo possível realizar o diagnóstico com 26 a 35 dias de gestação (RACEWICZ et al., 2016). A ultrassonografia também é utilizada para a sexagem fetal, que só é possível entre os dias 55 a 70 de gestação. Porém, essa técnica necessita de equipamentos de custos elevados e profissionais altamente capacitados. No entanto, a ultrassonografia não detecta morte embrionária no período de reconhecimento materno de gestação.

Métodos alternativos à ultrassonografia, que possuem uma maior precocidade, vêm sendo desenvolvidos, como os testes para detecção de prenhez no sangue e urina. Em mulheres, é possível detectar a gestação pela quantidade de gonadotrofina coriônica humana (hCG) na urina utilizando um teste de ELISA. Em ruminantes ainda não foi possível detectar uma molécula na urina para o diagnóstico de gestação. No entanto, no sangue de bovinos podemos determinar o diagnóstico de gestação através da presença de glicoproteínas associadas à prenhez (PAGs) a partir dos 24-25 dias de gestação (GREEN et al., 2005; REESE et al., 2018).

A mensuração da concentração de progesterona sérica também pode ser um método de diagnóstico de gestação aos 21 dias após a inseminação artificial. Vacas com concentrações de progesterona no sangue ou leite abaixo de 1ng/mL são consideradas não gestantes (WISHART, 1975). Atualmente, a ultrassonografia em modo Doppler também tem sido utilizada para avaliar a funcionalidade do corpo lúteo aos 17 a 30 dias de gestação (UTT et al., 2009; PUGLIESI et al., 2014). É possível detectar animais não gestantes devido a não funcionalidade do corpo lúteo com 91% de acurácia (PUGLIESI et al., 2014). No entanto, o modo Doppler não detecta a sinalização do embrião, e sim apenas a funcionalidade do corpo lúteo.

A avaliação da expressão de ISGs nos leucócitos aos 17 a 22 dias após a inseminação artificial tem sido objeto de estudos para diagnóstico precoce de gestação em vacas (HAN et al., 2006; GREEN et al., 2010; PUGLIESI et al., 2014; YOSHINO et al., 2018). As primeiras pesquisas utilizaram PBL, que resultou em 70% de acurácia na técnica (HAN et al., 2006).

Vários grupos de pesquisas estão aprimorando as técnicas para o diagnóstico de gestação através da expressão de ISGs (GREEN et al., 2010; KIZAKI et al., 2013; PUGLIESI et al., 2014; YOSHINO et al., 2018). A associação entre a expressão de ISGs e a utilização de Doppler resultou em 84,4% de acurácia para o diagnóstico precoce de gestação aos 20 dias em vacas multíparas de corte (PUGLIESI et al., 2014). Apenas a expressão de ISGs em granulócitos aos 20 dias de gestação em vacas de leite resultou em uma acurácia de 80% (YOSHINO et al., 2018). Esses resultados demonstram que a acurácia dos testes está evoluindo ao longo dos anos; no entanto, a precocidade do diagnóstico não diminuiu, permanecendo aos 20 dias de gestação.

A maioria dos trabalhos é realizada em multíparas, principalmente de raças leiteiras. Em novilhas de leite, foi possível realizar o diagnóstico de gestação aos 18 dias após a IA, mensurando expressão de *OAS1* e *MX2* em PBL, no entanto, em multíparas não foi possível (GREEN et al., 2010). Em nulíparas *Bos indicus* gestantes, a expressão de *ISG15* em PMBC é maior aos dias 18 dias gestação, comparado a multíparas *Bos indicus* aos 21 dias de gestação (SOUMYA et al., 2016). É possível que estudos conduzidos com a expressão de ISGs em PMN de novilhas, aos 18 dias de gestação gerem bons resultados de acurácia no diagnóstico de gestação.

2.8 Diagnóstico de mortalidade embrionária no primeiro mês de gestação em bovinos

A mortalidade embrionária no primeiro mês de gestação (período 1 e 2) em bovinos é a responsável por grande parte das perdas gestacionais em bovinos (WILTBANK et al., 2016). O primeiro período de perdas gestacionais ocorre durante a primeira semana após a ovulação, com falta de fertilização e morte do embrião. As principais causas de perda embrionária nesse período são devido a condições ambientais e hormonais específicas. Em geral, 20% a 50% de vacas leiteiras de alta produção já foram afetadas com perda embrionária nesse período (WILTBANK et al., 2016).

O segundo período, dos dias 8 a 27 de gestação, engloba o alongamento embrionário e o clássico período de reconhecimento materno da gestação. As perdas embrionárias nesse período são de 30%, com variações entre fazendas (25% à 41%) (WILTBANK et al., 2016). Fatores como alterações na funcionalidade do corpo lúteo, deficiência na sinalização do embrião através de IFNT, alterações no útero e falhas ou atrasos no desenvolvimento do embrião resultam em perda da gestação nesse período.

O diagnóstico de mortalidade embrionária pode ser feito através de algumas técnicas, no entanto, nenhuma delas define com certeza a presença do embrião no lúmen uterino. O retorno prolongado ao estro, mensuração de progesterona, funcionalidade do corpo lúteo, PAGs, e recentemente, a mensuração dos níveis de *ISGs* no sangue periférico são algumas alternativas. Geralmente a mortalidade embrionária nesse período é mensurada pela redução da concentração de progesterona e diminuição do volume do corpo lúteo. Recentemente, a ultrassonografia Doppler tem sido utilizada também para mensurar o fluxo sanguíneo do corpo lúteo durante o RMG, tornando-se um método alternativo.

É possível mensurar a ação do IFNT através de níveis de *ISGs* em células do sangue periférico. A maioria dos estudos avaliou os *ISGs* para diagnóstico de gestação, porém poucos avaliaram a mortalidade embrionária. Em ovinos foi induzida a mortalidade embrionária através da luteólise com aplicação de prostaglandina intramuscular no dia 18 da gestação. Um dia após (dia 19), a concentração de progesterona e os níveis de *ISG15* e *MX1* em PBMC estavam reduzidos comparados a ovelhas gestantes que não receberam o fármaco (KOSE et al., 2016).

Em um estudo com vacas submetidas a IA ou transferência de embrião (TE), avaliaram-se os níveis de *ISG15* em PBMC nos dias 18, 21 e 25 da gestação (MATSUYAMA et al., 2012). As vacas gestantes através da IA tiveram elevação dos níveis de *ISG15* aos 18 dias de gestação, comparado a vacas não gestantes, incluindo o grupo de vacas que tiveram ciclo estral prolongado (32%) e ciclo regular. Não foi possível detectar aumento dos níveis *ISG15* aos 18 dias após IA no grupo de vacas que receberam IA e tiveram retorno ao estro prolongado (após 25 dias da IA). Portanto, o diagnóstico de possível mortalidade foi através do retorno ao estro prolongado e não através da sinalização de *ISG15* em PBMC (MATSUYAMA et al., 2012). O mesmo não ocorreu nas vacas que receberam TE, pois houve um aumento nos níveis de *ISG15* em PBMC de vacas gestantes e vacas que tiveram um ciclo estral prolongado (39%), comparado a vacas não gestante com retorno ao cio regular (MATSUYAMA et al., 2012), ou seja, é provável que houvesse embrião sinalizando IFNT aos 18 dias de gestação nas vacas do grupo TE que tiveram o ciclo estral prolongado. O monitoramento dos níveis de *ISG15* em PBMC é difícil, pois apresenta uma taxa de falsos negativos de 14% (HAN et al., 2006; WILTBANK et al., 2016). Em outras palavras, 14% das vacas não apresentaram níveis de *ISG15* elevados aos 19 dias de gestação, embora diagnosticadas gestantes através de ultrassonografia aos 30 dias. Diversos fatores podem afetar os resultados, como a técnica do PCR e também as variações biológicas na quantidade de IFNT capaz de estimular as células do sangue periférico (WILTBANK et al., 2016).

Portanto, estudos são necessários para elucidar os eventos que ocorrem nesse período visando gerar biotecnologias para identificar mortalidade embrionária e posteriormente criar alternativas para reduzi-las.

3 CAPÍTULO I

***ISG15* expression in peripheral blood polymorphonuclear cells as an indicator of embryonic signaling on maternal recognition of pregnancy in beef heifers**

Fabício Amadori MACHADO, Monique Tomazele ROVANI, Alfredo Quites
ANTONIAZZI

Artigo a ser submetido ao periódico *Theriogenology*

Fevereiro, 2018

***ISG15* expression in peripheral blood polymorphonuclear cells as an indicator of embryonic signaling on maternal recognition of pregnancy in beef heifers**

Fabício Amadori MACHADO¹, Monique Tomazele ROVANI¹, Alfredo Quites ANTONIAZZI^{1*}

¹Biotechnology and Animal Reproduction Laboratory, BioRep, Federal University of Santa Maria, Av. Roraima 1000, 97105-900, University Veterinary Hospital, Santa Maria, RS, Brazil.

***Corresponding author:**

Email: alfredo.antoniazzi@ufsm.br

Fone: +55 55 999938111

Abstract

We aimed to establish the earliest possible time point to identify embryonic signaling through *ISG15* expression in blood cells on early maternal recognition of pregnancy in beef heifers; to evaluate in which blood cell type the pregnancy diagnosis can be implemented with high accuracy in beef heifers. Synchronization of the estrous cycle was performed and resulted in 28 heifers presenting estrus 36 hours after the progesterone intravaginal device withdrawal. The pregnancy diagnosis was performed on Days 29 and 60 after AI, and resulted in 10 pregnant (P) and 14 non-pregnant (NP). Four heifers were not inseminated (non-artificial insemination; NAI) and used as a negative control. On Day 16, blood samples from four heifers from each group (P n=4; NP n=4; NAI n=4) were included in the analysis. On Day 18, blood samples from 15 heifers (P n=7; NP n=4; NAI n=4) were used for peripheral blood mononuclear cells (PBMC) isolation and from 28 heifers (P n= 10; NP n=14; NAI n= 4) for polymorphonuclear cells (PMN) isolation. The PBMC and PMN fraction was collected and stored at -80°C until subsequent RNA extraction, reverse transcription and real-time PCR. The relative expression of *ISG15* differed between the cellular fraction of PMN and PBMC ($P < 0.0001$). The expression of *ISG15* on Day 16 differed from P and NAI in PMN cells ($p < 0.04$), as well as on Day 18 after AI ($p < 0.01$). However, *ISG15* expression on Day 16 did not differ between P and NP in PMN cells. On PBMC cells, the expression of *ISG15* on Day 16 did not differ from P, NAI and NB groups. However, on Day 18 after AI, there is a difference in *ISG15* expression between P and NAI ($p < 0.02$). The expression of *ISG15* in PMN cells is 38.6-fold higher than PBMC and we suggest as a tool for diagnosis on Day 18 following AI. The expression of *ISG15* on Day 18 differed from P and NP in PMN cells ($p < 0.01$). The Receiver Operator Characteristic (ROC) curve showed that the increase of *ISG15* in PMN on Day 18 was suitable cut-off for a reliable pregnancy test in beef heifers (Accuracy 93%). Furthermore, the expression of *ISG15* in PMN on Days 16 and 18 can be used to identify embryonic signaling. Our results report the pregnancy diagnosis in beef heifers using PMN and PBMC as source of gene expression as early as Day 18.

Keywords: *ISG15*, embryonic signaling, peripheral blood mononuclear cells, polymorphonuclear cells, early pregnancy diagnosis, beef heifers.

1. Introduction

Maternal recognition of pregnancy (MRP) period corresponds to the pregnancy stage of higher embryonic losses in cattle [1]. Around this time, the concept signals its presence to the mother in the uterus [2]. In ruminants, embryo signaling occurs through interferon tau (IFNT), a protein produced by trophoblast cells [3]. In cattle, the peak production of IFNT occurs between Days 17 and 18 after conception [4]. However, the embryo signals as early as Day 7 to endometrial cells at the uterotubal junction ipsilateral to the CL [5]. Therefore, the understanding of events during the MRP is essential to create alternatives to reduce pregnancy losses during this critical period and to identify embryonic signaling for diagnose pregnancy as early as possible.

IFNT induces the synthesis and secretion of several genes stimulated by interferons (ISG), as interferon-stimulated gene 15 (ISG15), a protein homologous to ubiquitin [6]. ISG15, also known as “ubiquitin cross-reactive protein” (UCRP), is a protein identified in the bovine endometrium in response to pregnancy, being observed concomitantly with the IFNT embryo release [6]. ISG15 is present in significant amounts in uterine flushing on Day 18 of pregnancy and in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) on Day 20 of pregnancy [6, 7]. There is a greater expression of *ISG15* in response to IFNT in endometrial, luteal, hepatic and leukocyte cells in pregnant cows and sheep [8-10]. ISG15 may be involved in the regulation of essential proteins for the establishment of pregnancy in ruminants [11]. However, the function of ISG15 during the MRP was not identified yet.

Endocrine mechanism of IFNT during MRP in ruminants has been recognized few years ago [12]. Since then, the expression of *ISG15* in peripheral blood leukocytes (PBL) has been studied as a possible method for early diagnosis of pregnancy [13]. Initial studies aimed to diagnose pregnancy through *ISG15* expression in PBL between 18 and 20 days after AI [13, 14]. However, the use of PBL has provided inconsistent results for this purpose [13-15]. The analysis of gene expression in separate fractions of PBL during MRP highlights a difference in *ISG15* abundance between PBMC and polymorphonuclear cells (PMN) in response to IFNT in dairy cows [16, 17]. Furthermore, the same concentration of IFNT induces higher *ISG15* expression in PMN when compared to PBMC [17]. The profile of *ISG15* expression during MRP in beef heifers using different cell fractions (PBMC and PMN) has a promising potential to identify both pregnancy and embryonic losses.

In addition to the cell type, other variables may also affect *ISG15* expression, as the breed, animal category, follicle diameter, corpus luteum diameter, and concentration of sex steroids [13, 14, 18]. Concentration of estradiol in the preovulatory period is important to

modulate the endometrial response to receive the embryo [18]; and progesterone is fundamental for the maintenance of pregnancy, favoring the embryo elongation when in high concentrations [8, 19]. Larger embryos secrete more IFNT, which in turn has a positive correlation with the expression of ISGs in PBMC [20].

Few studies have evaluated embryonic mortality through *ISGs* signaling in peripheral blood cells in ruminants [20, 21]. Frequently, only the pregnancy diagnosis through *ISGs* concentration in PBMC is evaluated; however, this provides a considerable rate of false negative diagnosis [13, 15]. It has been estimated 19% to 41% of embryonic losses occurring during the first month of pregnancy, suggesting that MRP is particularly problematic to maintain pregnancy in lactating dairy cows [1].

Our hypothesis is that pregnant beef heifers have a different *ISG15* expression in PBMC and PMN according to their pregnancy status. Therefore, our objectives are: (1) to determine the earliest possible time point to identify embryonic signaling through *ISG15* expression in blood cells on early maternal recognition of pregnancy in beef heifers; (2) to establish in which leukocyte type *ISG15* expression can be identified with high accuracy.

2. Materials and Methods

2.1 Animals and experimental design

All procedures using animals were approved by the Institutional Committee for Ethics in Animal Experiments (CEUA/UFSM, protocol #5728120217). Crossbred *Bos taurus* vs *Bos indicus* were included: 28 beef heifers (nulliparous) aged between 2 and 3 years old, and above 280kg live body weight. Animals were kept in native pasture with free access to mineral salt and water, and body condition score between 2.5 and 3.5 (1 = thin and 5 = obese in a scale 1-5). The beef heifers were synchronized to perform AI (Figure 1A). The groups were formed after the pregnancy diagnosis. The groups were formed as follows: pregnant (P), non-pregnant (NP) and non-AI (NAI) heifers. The NAI group were synchronized as the other groups, however they were not artificially inseminated.

2.2 Synchronization protocol and artificial insemination (AI)

The estrous cycle synchronization protocol (Figure 1A) was initiated by the insertion of a progesterone intravaginal device (IVD, 1g of progesterone) and administration of estradiol benzoate im (2mg) 10 days prior to AI (Day -10). Two days before AI (Day -2), IVD was withdrawn and the animals received 2mL of sodium cloprostenol (PGF; Ciosin; Intervet/Schering-Plough, Brazil; 250 µg/mL). Beef heifers were artificially inseminated 48

hours (Day 0) later. The semen was obtained from a commercial company and kept in liquid nitrogen. Thawing was performed at 37 °C for 30 seconds previous to AI.

2.3 Ultrasound scanning – ovarian evaluations and pregnancy diagnosis

Transrectal ultrasonography scanning was performed with a linear transducer (6.5 MHz; Medsono P3V) 10 days prior to AI (Day -10), on the Day of AI (Day 0), and on Days 18, 29 and 60 following AI (Figure 1A). At Day -10, the uterine conditions were evaluated to select only animals without any evident pathology at the ultrasonographical examination. The diameters (mm) of the preovulatory follicle (Day 0) and the corpus luteum (Day 18) were evaluated. The pregnancy scanning was performed 29 days after AI through ultrasonography to detect the embryo, and rechecked on Day 60. On Day 16, samples from four heifers from each group were included in the analysis. On Day 18, samples from 15 heifers (P n=7; NP n=4; NAI n=4) were used for PBMC isolation and from 28 heifers (P n= 10; NP n=14; NAI n= 4) for PMN isolation.

2.4 Blood sample collection

Blood was collected from the coccygeal vein using a 21 G needle coupled to a vacuum collection system (BD Vacutainer®) in 4mL EDTA-containing tubes. The collections were performed on Day16 and 18 following AI. The tube of 4 mL of blood was designated for the isolation of leukocytes.

2.5 Isolation of leukocytes, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and polymorphonuclear peripheral blood (PMN)

The isolation of leukocytes (PBMC and PMN) was modified from Kizaki et al. (2013). Briefly, after blood collection, 2 mL of whole blood was diluted in 2 mL of saline. In a 15 mL tube, 3 mL of Ficoll-Paque PREMIUM® was added, and subsequently diluted blood was added. Centrifugation was performed at 400 X g for 20 min at room temperature. After centrifugation, the following fractions were obtained: plasma, PBMC, erythrocytes and PMN (Figure 1B). Plasma was withdrawn to collect the PBMC fraction. The PBMC fraction was collected and added to a tube containing 5 mL of saline to centrifuge at 400 X g for 15 min. The supernatant was discarded, and the sample was resuspended in 0.5 mL saline in the cryotube for further storage in liquid nitrogen. The fraction containing erythrocytes and granulocytes was collected adding 5 mL saline, followed by centrifugation 400 X g for

15min. The supernatant was removed and added 0.5 mL of saline. Next, the sample was stored in a cryotube in liquid nitrogen for transportation to the laboratory for subsequent total RNA extraction. After isolation of PBMC and PMN fractions, a cell smear was used to check the purity of each cell sorting procedure. Cells smears were stained using a panoptic rapid stain according to the manufacturer's recommendations. The purity of the samples was assessed based on cells morphology. Samples above 90% of specific cell type (PBMC or PMN) [17] were included in the study.

2.6 RNA extraction, reverse transcription and real-time PCR

Total RNA was extracted from leukocyte cells using Tri Reagent (BD), according to the manufacturer's recommendations. To quantify the extracted RNA, the optical density was determined using NanoDrop spectrophotometer (Thermo) at a wave length of 260 nm. The purity of the RNA was assessed by the rate of absorption of the OD260/OD280 ratio and values below 1.8 were not used. Total RNA was treated with DNase (Invitrogen), as recommended by the manufacturer, to digest any contaminating DNA. The reverse transcriptase reaction was performed using iScript DNA Synthesis Kit (Bio-Rad). Gene expression was performed by real-time PCR (CFX384, Bio-Rad) using GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), and the variability in the mRNA concentration was corrected by the amplification of the constitutive genes *RPL19* (F: GCCAACTCCCGTCAGCAGA; R: TGGCTGTACCCTTCCGCTT) and *RN18S1* (F: CCTTCCGCGAGGATCCATTG; R: CGCTCCCAAGATCCAACACTAC). The relative expression report was performed according to PFAFFL [22]. The target gene expression was *ISG15* (F: GGTATCCGAGCTGAAGCAGTT; R: ACCTCCCTGCTGTCAAGGT).

2.7 Statistical analysis

Continuous data were tested for normal distribution using Shapiro-Wilk test and normalized when necessary. Abundance of mRNA was analyzed by ANOVA and multiple comparisons were performed by Tukey using the JMP Software (13.1.0; SAS Institute Inc.). Results are presented as means \pm S.E.M. $P \leq 0.05$ was considered significant. Receiver operator characteristic (ROC) curve were generated in Prism 3.

3. Results

3.1 Synchronization protocol and AI

The estrous synchronization resulted in 28 heifers presenting estrus 36 hours after IVD withdrawal. All animals had a preovulatory follicle ($12.31 \text{ mm} \pm 0.61$) and uterus tonus matching estrogenic status at AI moment. The pregnancy ultrasound scanning was performed on Days 29 and 60 following AI, and resulted in 14 NP heifers and 10Pheifers. Embryonic mortality was not detected on ultrasonography exams. The diameter of the dominant follicle on Day 0 (Figure 2A) and diameter of the corpus luteum (Figure 2B) on Day 18 after AI did not differ between groups.

3.2 ISG15 expression according to the cellular fraction of PMN and PBMC

The P heifers group revealed the relative *ISG15* expression different between the cellular fraction of PMN and PBMC on Days 16 and 18 following AI (Figure 3; $p < 0.0001$). On Day 16, the *ISG15* expression in PMN is greater when compared to PBMC (Figure 3A; $p < 0.0001$; 36.1-fold). Similarly, on Day 18, results are greater on PMN, but in a higher magnitude (Figure 3B; $p < 0.0001$; 38.6-fold compared to PBMC).

3.3 ISG15 gene expression according to pregnancy status

The expression of *ISG15* in P heifers differed from NAI heifers on Day 16 in PMN cells (Figure 4A; $p < 0.046$), but it was not different from NP heifers. On Day 18 the expression of *ISG15* in Pheifers differed from NP and NAI heifers (Figure 4B; $p < 0.01$). In PBMC cells, the expression of *ISG15* on Day 16 did not differ among all groups (Figure 4C). However, on Day 18 after AI, the *ISG15* expression differed between P and NP heifers (Figure 4D; $p < 0.022$).

3.4 ROC curve: Expression ISG15 in PMN on Day 18

The ROC curve was obtained using *ISG15* expression in PMN on Day 18 following AI in P ($n = 10$) and NP ($n = 14$) groups. The ROC curve revealed that the *ISG15* expression increase in PMN on Day 18 was suitable cut-off for a reliable pregnancy test in beef heifers (accuracy of 93%).

4. Discussion

The results presented in this study are the first to use *ISG15* expression in PMN to identify pregnant beef heifers, and the increased in pregnant animals reinforces IFNT production by the embryo in the same period. The success of detection of *ISG15* expression by

qPCR as early as day 16 in PMN provides an early pregnancy diagnosis through a non-invasive method in beef heifers.

In the present study, we obtained 93% of accuracy through expression of *ISG15* in PMN on Day 18 after AI in beef heifers. The results suggest a high accuracy in the diagnosis of pregnancy on Day 18. Days 16 and PBMC were not tested through the ROC curve due to the low number of samples. *ISG15* and *MX2* in granulocytes were reliable indicators of pregnancy in dairy cows within three weeks after AI with 80% accuracy [23]. ROC curve based on the expression of *OAS1* and *MX1* in peripheral blood leukocytes at 18 days after AI was performed in dairy heifers (n = 24) and dairy cows (n = 54) [14]. The results for the diagnosis of pregnancy were satisfactory only in heifers. In each case, 82% true positive rate and 0% false positive rate could be obtained with the appropriate cutoff [14]. The earliest period used to diagnose pregnancy, with 100% sensitivity and 99% specificity, is Day 26 for heifers and 29 for cows, using the transrectal ultrasonography method [24]. Using blood components, an EIA method measured pregnancy-associated glycoproteins (PAGs), as early as 28 days [25]. However, the diagnosis through PAGs can result in false positive, and their use can only occur 60 days after calving in cattle [25].

The data from the present study focused not only on pregnancy diagnosis, but also on embryonic mortality on beef heifers. The expression of *ISG15* in P heifers differed from NAI heifers on Day 16 and 18 after AI in PMN cells. The most interesting results are from the NP group, in which some heifers had *ISG15* expression similar to NAI (2 out of 14) group and some similar to P (2 out of 14) (Figure 4B). This means some heifers had no embryo signaling at all and some had late embryonic mortality, and consequently 10 out of 14 heifers were located in the interval from NB and P groups. These results suggest that IFNT signaling may have occurred in some animals in the NP heifers group.

It is possible to measure the action of IFNT through levels of ISGs in peripheral blood cells [12, 20]. Most of the studies evaluated the ISGs aiming to diagnose pregnancy, but few evaluated the embryonic mortality [20, 21]. In sheep, embryonic mortality was induced through luteolysis after PGF treatment at Day 18 of pregnancy. On Day 21, *ISG15* and *MX1* levels in PBMC were reduced compared to pregnant sheep not receiving PGF [21]. In a study with cows submitted to AI or embryo transfer (ET), the concentration of *ISG15* in PBMC was evaluated on Days 18, 21 and 25 of pregnancy [20]. The diagnosis of possible embryo mortality was through prolonged return to estrus, not through *ISG15* signaling in PBMC from AI cows. However, the ET cows with embryonic mortality presented both prolonged estrous cycle and increased in *ISG15* expression [20]. This may be explained because ET cows

received viable embryos on Day 6 of development, and embryo signaling in the endometrium occurs before the classic period of the MRP, specifically in the uterotubal junction on Day 7 of development, increasing the expression of genes in the endometrium, among them *ISG15* [5].

In PBMC, the expression of *ISG15* on Day 16 did not differ among pregnant, non-pregnant and non-AI heifers. It is difficult to monitor the levels of *ISG15* in PBMC because it has a false negative rate of 14% [1, 13]. In other words, 14% of the cows did not present elevated *ISG15* abundance on Day 19 of pregnancy, although they were diagnosed pregnant through ultrasound on Day 30. Several factors may affect the results, such as the PCR technique and the biological variations in the amount of IFNT capable of stimulate the peripheral blood cells [1]. In the present study, we adjusted the technique by reducing the amount of starting blood sample and centrifugation steps, making the technique faster.

Previous studies revealed the expression of ISGs in PBL by separating the fractions in granulocytes, lymphocytes and monocytes; and there was a greater expression of ISG in granulocytes (PMN) on Day 14 of pregnancy in dairy cattle [26]. It has been observed that a difference in the expression profile of ISGs occurs during embryonic development by separating the leukocyte populations in PBMC and PMN in dairy cows [16, 17]. In the present study, on Day 16 and 18, the expression of *ISG15* in PMN was 36.1-fold and 38.5-fold greater, compared to PBMC in beef heifers. In another study in dairy cattle, the expression of *ISG15* in PMN on Day 20 of pregnancy is approximately 26-fold higher compared to PBMC [27]. Our results confirm that *ISG15* expression in PMN stands out as a biomarker of early pregnancy diagnosis using peripheral blood leukocytes in beef heifers. PMN and PBMC have a different half-life: PMN lasts no more than 8 to 12 hours circulating; however, PBMC may circulate in the blood stream longer than 6 months [28]. Considering IFNT is produced by the embryo during MRP period [3], *ISG15* expression on PMN reflects closely IFNT signaling. This is interpreted to mean, our hypothesis to use PMNs as an early pregnancy diagnosis tool, is not only due to its sensibility, but also for their short half-life in blood stream. The increased expression of *ISG15* in heifers PBMC and PMN may also be related to innate immune response. There are studies in pregnant sheep demonstrating high innate response genes in PBMC during MRP [29]. Elevated *ISG15* expression in heifers can be explained by the first exposure to embryo signaling, and consequently to IFNT. Another hypothesis is that the number of IFNT receptors is different in PMN and PBMC. The challenge with recombinant IFNT in PMN resulted in a 30 to 900 fold increase in the number

of IFNT receptors *in vitro* (IFNAR1 and IFNAR2), whereas in PBMC the same challenge raised by 1.5 to 2.5 times [30]. However, this difference in receptor expression did not occur between PMN and PBMC in pregnant cows. Therefore, the exact reason for the increased PMN sensitivity in ISG expression is not known [30].

The trophoblast cells are responsible for the production and secretion of IFNT at the beginning of the embryonic development. *IFNT* begins to be expressed significantly 7 days of embryonic development [31]. IFNT peak production occurs between Days 17 and 18 after conception [4, 27]. Recently, it has been observed that there is an increase in *ISG15* in endometrial cells from uterotubal junction ipsilateral to the corpus luteum 7 days of embryonic development [5]. Based on the known period of IFNT production and secretion, blood was collected to evaluate *ISG15* expression in leukocytes on Days 16 and 18 after AI. This is the main period of embryo signaling through the secretion of IFNT. Its paracrine signaling to endometrial cells causes the inhibition of the expression of estrogen and oxytocin receptors, resulting in antiluteolytic effect, consequently inhibiting the release of PGF by the uterus [32]. In addition, IFNT regulates a large number of genes in the endometrium, which are essential for embryonic development [8], and also regulates the maintenance of the structural and functional integrity of the corpus luteum [9]. Therefore, compromised embryo development or under development of trophoctoderma allows the onset of luteolysis, resulting in embryonic mortality. In addition to paracrine action in the uterus and endocrine in luteal cells, IFNT stimulates the expression of ISGs in peripheral blood leukocytes [12, 13]. The expression of ISGs in PBL has been studied as a possible method for early pregnancy diagnosis [13, 14, 17, 26]. The first investigations using PBL between 18 and 20 days after AI were performed in dairy cattle [13]. Among the ISGs studied, we can highlight *ISG15*, *MX1*, *MX2* and *OAS1* [13, 14].

In the present study, follicle diameter and corpus luteum diameter did not differ among the P, NP and NAI groups. The follicular diameter at AI is important, as it has a high correlation to estradiol concentration [33]. Estradiol plays an essential role modulating endometrial response to embryonic development [18], as low concentration in the preovulatory period is associated to higher embryonic losses during MRP [18]. The follicular diameter is also related to development of the corpus luteum, and with consequent increased progesterone production [34] an essential hormone for MRP, positive correlated with *ISG15* expression. All these events should be related: follicular development, corpus luteum diameter, and concentration of sex steroids, and finally embryo health. The variability in *ISG15* expression levels during the early stages may be due to differences in embryo development and health.

5. Conclusion

In conclusion, we identified the earliest possible time point to detect embryonic signaling through *ISG15* expression in PMN as early as Day 16 in beef heifers. Also, we established that *ISG15* expression in PMN cells is 38.6-fold higher than PBMC and we suggest as a tool for diagnosis with 93% accuracy on Day 18 following AI. Furthermore, the expression of *ISG15* in PMN on Days 16 and 18 can be used to identify embryonic signaling. Our results report the diagnosis of pregnancy in beef heifers using PMN and PBMC as source of gene expression as early as Day 18.

Conflict of Interest

The authors have nothing to declare.

Acknowledgements

We are thankful to the financial support by CNPq and CAPES from Brazil.

Figure legends

Figure 1. Experimental design. **A)** Estrous cycle synchronization protocol and AI. Only animals that exhibited estrus by 36 hours after receiving PGF were included in the experiment. AI was performed 48 hours (Day 0) after withdrawal of intravaginal device (IVD). Transrectal ultrasonography scanning (US) was performed previous to AI (Days -10), at the moment of AI (Day 0), and on Days 18, 29 and 60, following AI. Blood was collected after AI (Days 16 and 18). **B)** Isolation of leukocytes scheme. After centrifugation, the following fractions were obtained: plasma, peripheral blood mononuclear cells (PBMC), erythrocytes and polymorphonuclear cells (PMN). Abbreviations: EB, estradiol benzoate; US, ultrasound scanning.

Figure 2. Characterization of ovarian structures at synchronization protocol. **A)** Diameter (mm) of preovulatory follicle at AI (Day 0). **B)** Diameter (mm) of corpus luteum on the Day 18 following AI. Values are presented as mean \pm SE (n = 28; P > 0.05).

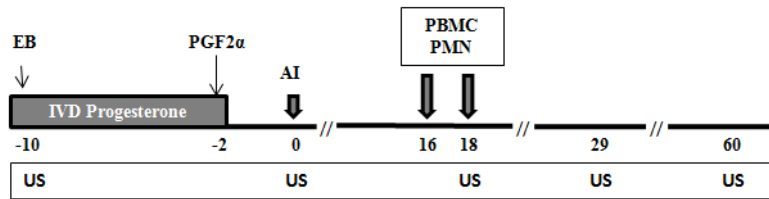
Figure 3. *ISG15* expression on polymorphonuclear cells (PMN) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) on Days 16 and 18. Values are presented as mean \pm SE (p<0.0001).

Figure 4. *ISG15* expression in polymorphonuclear cells (PMN) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) on Days 16 and 18 after AI. **A)** PMN on Day 16 (n=12); **B)** PMN on Day 18 (n=28); **C)** PBMC on Day 16 (n=12); and **D)** PBMC on Day 18 (n=15). Values are presented as mean \pm SE. Different letters indicate p<0.05.

Figure 5. Receiver operator characteristic (ROC) curves for *ISG15* expression on PMN on Day 18 after AI in beef heifers. Area under the ROC curve 0.93 (n=24).

Figure 1.

A



B

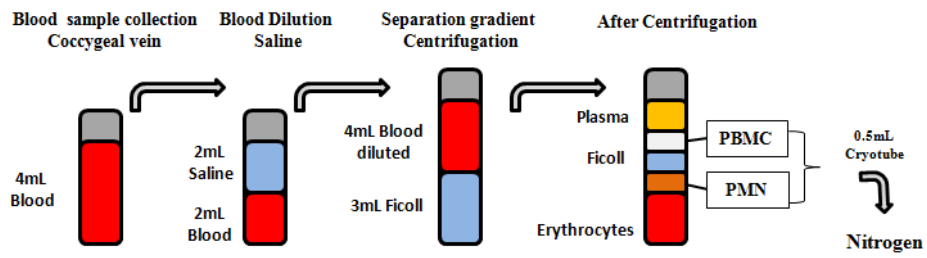
Isolation of leukocytes:

Figure 2.

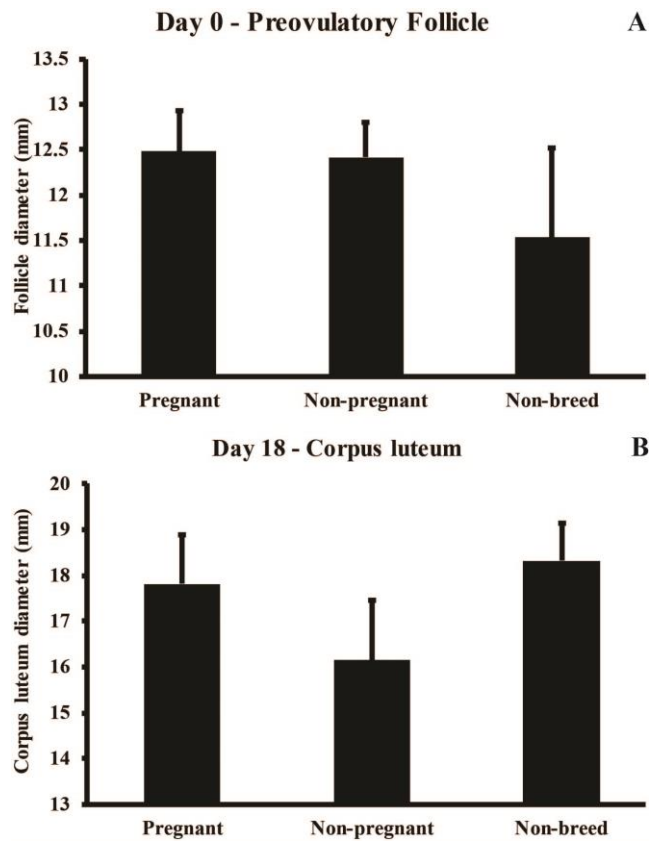


Figure 3.

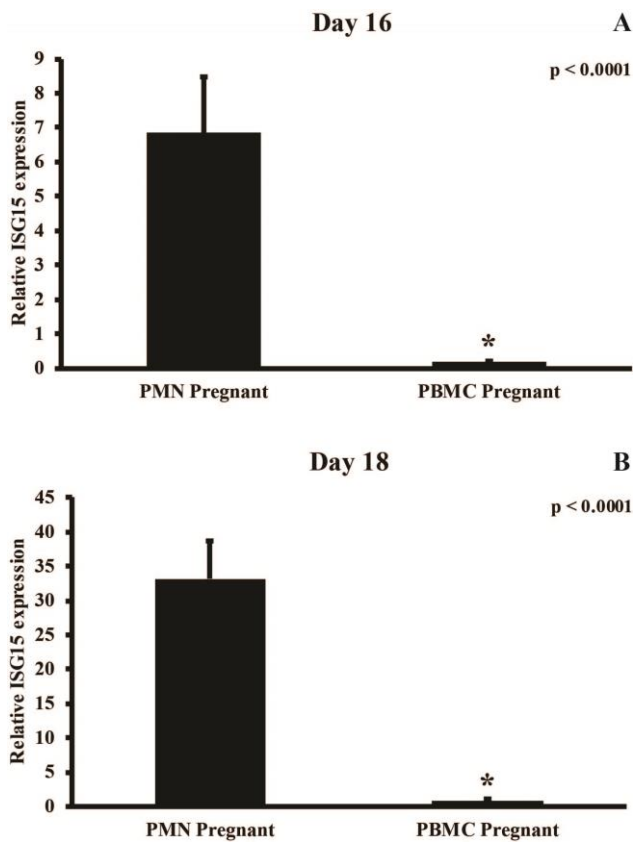


Figure 4.

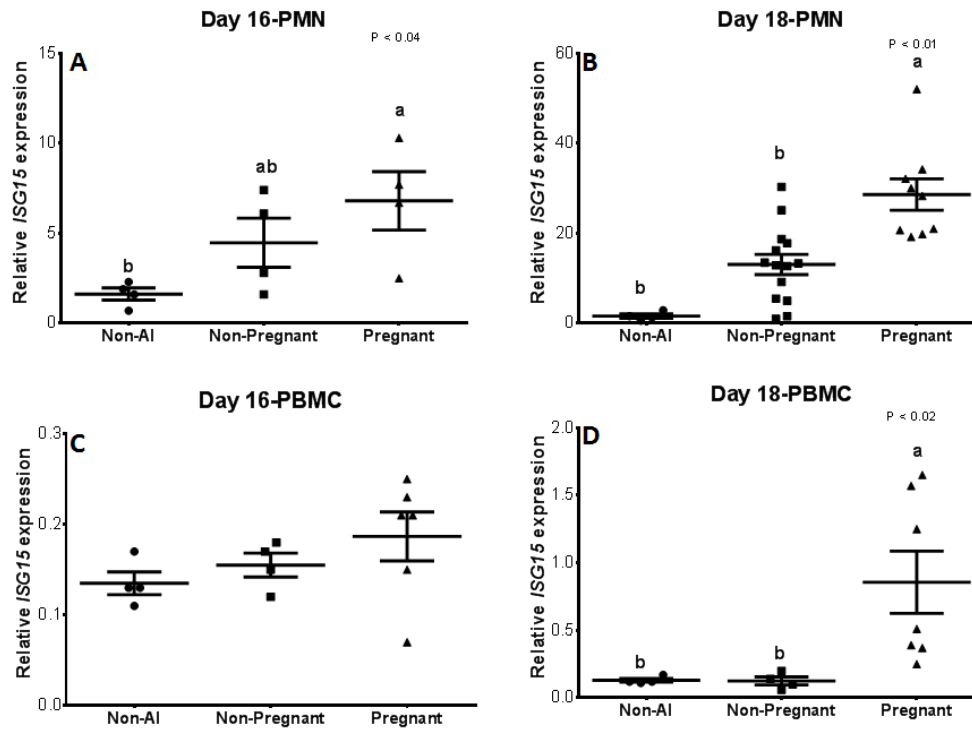
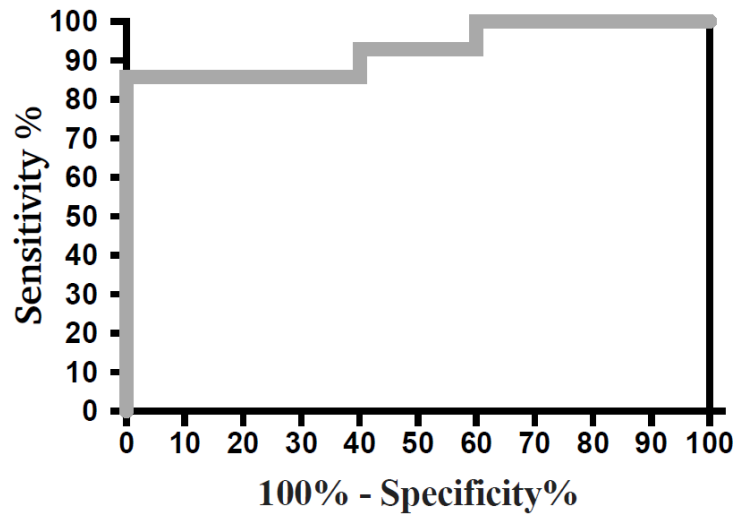


Figure 5.



4 CONCLUSÃO

A expressão de *ISG15* em PMN pode ser usada para a identificação sinalização embrionária aos 16 e 18 dias após a inseminação artificial em novilhas de corte. A expressão de *ISG15* em PMN no dia 18 após a IA resultou em 93% de acurácia para o diagnóstico de gestação. Sugerimos que ambas as frações celulares (PMN e PBMC) podem ser utilizadas como ferramenta para identificar sinalização embrionária aos 18 dias de gestação em novilhas de corte.

5 REFERÊNCIAS

ANTONIAZZI, A. Q., et al. Função do interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes. **Ciência Rural**, v.41, n.1. 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782011000100029>.

ANTONIAZZI, A. Q., et al. Endocrine Delivery of Interferon Tau Protects the Corpus Luteum from Prostaglandin F₂ Alpha-Induced Luteolysis in Ewes 1. **Biology of reproduction**, v.88, n.6, p.Article 144, 1-12. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23616594>>.

AUSTIN, K. J., et al. Ubiquitin cross-reactive protein is released by the bovine uterus in response to interferon during early pregnancy. **Biology of reproduction**, v.54, n.3, p.600-606. 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8835381>>

BERG, D., et al. Embryo loss in cattle between Days 7 and 16 of pregnancy. **Theriogenology**, v.73, n.2, p.250-260. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19880168>>.

BINELLI, M., et al. Bovine interferon- τ stimulates the janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway in bovine endometrial epithelial cells. **Biology of reproduction**, v.64, n.2, p.654-665. 2001. Disponível em: <<http://www.bioreprod.org/content/64/2/654.short>>.

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. 2010. Disponível em: <<http://www.bioreprod.org/content/82/4/725.short>>.

CLEMENTE, M., et al. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? **Reproduction**, v.138, n.3, p.507-517. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19556439>>.

D'CUNHA, J., et al. In vitro and in vivo secretion of human ISG15, an IFN-induced immunomodulatory cytokine. **The Journal of Immunology**, v.157, n.9, p.4100-4108. 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8892645>>.

FARIN, C., et al. Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. **Biology of reproduction**, v.43, n.2, p.210-218. 1990. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1696139>>.

FARIN, C., et al. In situ localization of mRNA for the interferon, ovine trophoblast protein-1, during early embryonic development of the sheep. **Molecular Endocrinology**, v.3, n.7, p.1099-1107. 1989. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2797003>>.

FORDE, N., et al. Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. **Biology of reproduction**, v.81, n.4, p.784-94. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19553605>>.

FORDE, N., et al. Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow know she is pregnant? **Biology of reproduction**, v.85, n.1, p.144-156. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21349821>>.

GEISERT, R. D.; F. W. BAZER. **Regulation of Implantation and Establishment of Pregnancy in Mammals**. 2015. Disponível em: <<http://www.springer.com/us/book/9783319158556>>.

GIFFORD, C., et al. Regulation of interferon-stimulated genes in peripheral blood leukocytes in pregnant and bred, nonpregnant dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, n.1, p.274-280. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17183095>>.

GREEN, J., et al. Measurement of interferon-tau (IFN- τ) stimulated gene expression in blood leukocytes for pregnancy diagnosis within 18–20d after insemination in dairy cattle. **Animal reproduction science**, v.121, n.1, p.24-33. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20554404>>.

GREEN, J. A., et al. The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. **Theriogenology**, v.63, n.5, p.1481-1503. 2005. Disponível em: <[http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X\(04\)00248-1/abstract](http://www.theriojournal.com/article/S0093-691X(04)00248-1/abstract)>.

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. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17088421>>.

HANSEN, T., et al. Mechanism of action of interferon-tau in the uterus during early pregnancy. **Journal of reproduction and fertility**. Supplement, v.54, p.329-339. 1998. Disponível em: <<http://europepmc.org/abstract/med/10692865>>.

HAQ, I. U., et al. Expression of interferon-stimulated gene ISG15 and ubiquitination enzymes is upregulated in peripheral blood monocyte during early pregnancy in dairy cattle. **Reproductive Biology**, v.16, n.4, p.255-260. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27802914>>.

HENKES, L. E., et al. Embryo mortality in *Isg15*^{-/-} mice is exacerbated by environmental stress. **Biology of reproduction**, v.92, n.2. 2015. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article/92/2/36,%201-10/2434169>>.

HERSHKO, A., et al. The ubiquitin system. **Nature medicine**, v.6, n.10, p.1073. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759494>>.

HIRAYAMA, H., et al. Enhancement of maternal recognition of pregnancy with parthenogenetic embryos in bovine embryo transfer. **Theriogenology**, v.81, n.8, p.1108-15. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24581587>>.

JOHNSON, G. A., et al. Pregnancy and interferon-tau induce conjugation of bovine ubiquitin cross-reactive protein to cytosolic uterine proteins. **Biology of reproduction**, v.58, n.4, p.898-904. 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9546718>>.

KIZAKI, K., et al. Differential neutrophil gene expression in early bovine pregnancy. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.11, n.1, p.6. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23384108>>.

KOSE, M., et al. Expression profile of interferon tau-stimulated genes in ovine peripheral blood leukocytes during embryonic death. **Theriogenology**, v.85, n.6, p.1161-1166. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26748865>>.

KUBISCH, H. M., et al. Relationship between age of blastocyst formation and interferon- τ secretion by in vitro-derived bovine embryos. **Mol Reprod Dev**, v.49, n.3, p.254-260. 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9491377>>.

LIN, W., et al. IFI16 restoration in hepatocellular carcinoma induces tumour inhibition via activation of p53 signals and inflammasome. **Cell proliferation**, v.50, n.6. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28990231>>.

LIU, Y.-C., et al. Immunity by ubiquitylation: a reversible process of modification. **Nature Reviews Immunology**, v.5, n.12, p.941. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16322747>>.

LOEB, K. R.; A. L. HAAS. The interferon-inducible 15-kDa ubiquitin homolog conjugates to intracellular proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.267, n.11, p.7806-7813. 1992. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1373138>>.

MADSEN, C. A., et al. Effects of preovulatory estradiol on embryo survival and pregnancy establishment in beef cows. **Animal reproduction science**, v.158, p.96-103. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26022231>>.

MAJETSCHAK, M., et al. Extracellular ubiquitin inhibits the TNF- α response to endotoxin in peripheral blood mononuclear cells and regulates endotoxin hyporesponsiveness in critical

illness. **Blood**, v.101, n.5, p.1882-1890. 2003. Disponível em: <<http://www.bloodjournal.org/content/101/5/1882/tab-e-letters?sso-checked=true>>.

MANJARI, P., et al. Neutrophil gene dynamics and plasma cytokine levels in dairy cattle during peri-implantation period. **Veterinary immunology and immunopathology**, v.173, p.44-49. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27090626>>.

MATSUYAMA, S., et al. Relationship between quantity of IFNT estimated by IFN-stimulated gene expression in peripheral blood mononuclear cells and bovine embryonic mortality after AI or ET. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.10, n.1, p.21. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22439976>>.

MCCRACKEN, J. A., et al. Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. **Physiol Rev**, v.79, n.2, p.263-323. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10221982>>.

MIRANDO, M., et al. 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- α 11. **Journal of reproduction and fertility**, v.93, n.2, p.599-607. 1991. Disponível em: <<http://www.reproduction-online.org/content/93/2/599.full.pdf+html>>.

NARASIMHAN, J., et al. Conjugation of the 15-kDa interferon-induced ubiquitin homolog is distinct from that of ubiquitin. **Journal of Biological Chemistry**, v.271, n.1, p.324-330. 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8550581>>.

NISWENDER, G. D., et al. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological reviews**, v.80, n.1, p.1-29. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10617764>>.

O'HARA, L., et al. Paradoxical effect of supplementary progesterone between Day 3 and Day 7 on corpus luteum function and conceptus development in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.26, n.2, p.328-336. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23439105>>.

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- τ release from the uterine vein. **Endocrinology**, v.149, n.3, p.1252-1259. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18063687>>.

OTT, T. L., et al. Effects of the estrous cycle and early pregnancy on uterine expression of Mx protein in sheep (*Ovis aries*). **Biology of reproduction**, v.59, n.4, p.784-94. 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9746726>>.

PUGLIESI, G., et al. Conceptus-induced changes in the gene expression of blood immune cells and the ultrasound-accessed luteal function in beef cattle: how early can we detect pregnancy? **Biology of reproduction**, v.91, n.4, p.95. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25210129>>.

RACEWICZ, P., et al. Ultrasonographic diagnosis of early pregnancy in cattle using different ultrasound systems. **Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere**, v.44, n.3, p.151-6. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27090352>>.

REESE, S., et al. Pregnancy diagnosis in cattle using pregnancy associated glycoprotein concentration in circulation at day 24 of gestation. **Theriogenology**, v.106, p.178-185. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29073542>>.

RIBEIRO, E. S., et al. Biology of preimplantation conceptus at the onset of elongation in dairy cows. **Biology of reproduction**, v.94, n.4, p.97, 1-18. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26935601>>.

ROBERTS, R. M. Interferon-tau. **Nature**, v.362, n.6421, p.583. 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8464509>>.

SADLER, A. J.; B. R. WILLIAMS. Interferon-inducible antiviral effectors. **Nat Rev Immunol**, v.8, n.7, p.559-68. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18575461>>.

SCHMITT, R., et al. Uterine cellular changes in 2', 5'-oligoadenylate synthetase during the bovine estrous cycle and early pregnancy. **Biology of reproduction**, v.48, n.3, p.460-466. 1993. Disponível em: <<http://www.bioreprod.org/content/48/3/460.short>>.

SHIRASUNA, K., et al. Upregulation of interferon-stimulated genes and interleukin-10 in peripheral blood immune cells during early pregnancy in dairy cows. **Journal of Reproduction and Development**, v.58, n.1, p.84-90. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22052007>>.

SHIRASUNA, K.; A. MIYAMOTO. Immune Cells and Their Effects on the Bovine Corpus Luteum. In: (Ed.). *The Life Cycle of the Corpus Luteum*: Springer, 2017. **Immune Cells and Their Effects on the Bovine Corpus Luteum**, p.99-116. Disponível em: <https://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-319-43238-0_6>.

SOUMYA, N., et al. Differential expression of ISG 15 mRNA in peripheral blood mononuclear cells of nulliparous and multiparous pregnant versus non-pregnant *Bos indicus* cattle. **Reproduction in Domestic Animals**. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27766692>>.

SPENCER, T. E.; F. W. BAZER. Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. **Endocrinology**, v.137, n.3, p.1144-1147. 1996. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8603586>>.

SPENCER, T. E.; T. R. HANSEN. Implantation and establishment of pregnancy in ruminants. In: (Ed.). **Regulation of Implantation and Establishment of Pregnancy in Mammals**: Springer, 2015. Implantation and establishment of pregnancy in ruminants, p.105-135

SPONCHIADO, M., et al. Pre-hatching embryo-dependent and-independent programming of endometrial function in cattle. **PloS one**, v.12, n.4, p.e0175954. 2017. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0175954>>.

TIZARD, I. R. **Veterinary immunology**: Elsevier Health Sciences. 2013

TOJI, N., et al. Evaluation of interferon-stimulated genes in peripheral blood granulocytes as sensitive responders to bovine early conceptus signals. **The Veterinary Journal**, v.229, p.37-44. 2017. Disponível em:

UTT, M., et al. The evaluation of corpus luteum blood flow using color-flow Doppler ultrasound for early pregnancy diagnosis in bovine embryo recipients. **Theriogenology**, v.71, n.4, p.707-715. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29183572>>.

WILTBANK, M. C., et al. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.86, n.1, p.239-53. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27238438>>.

WISHART, D. F. Early pregnancy diagnosis in cattle. **Vet Rec**, v.96, n.2, p.34-8. 1975. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1114632>>.

YAO, N., et al. Expression of interferon-tau mRNA in bovine embryos derived from different procedures. **Reprod Domest Anim**, v.44, n.1, p.132-9. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19019066>>.

YOSHINO, H., et al. A predictive threshold value for the diagnosis of early pregnancy in cows using interferon-stimulated genes in granulocytes. **Theriogenology**, v.107, p.188-193. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29172175>>.

ZHAO, G., et al. Specific interferon tau gene-regulation networks in bovine endometrial luminal epithelial cells. **Theriogenology**, v.105, p.51-60. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28923706>>.