

EFFECTO DE LA SUBNUTRICIÓN DURANTE EL PERIODO PERI-IMPLANTACIONAL SOBRE DE LA EXPRESIÓN DE GENES ESTIMULADOS POR INTERFERON (ISGs) EN VACAS NODRIZAS. EL USO DEL ÁRBOL DE DECISIÓN COMO HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA.

López-Helguera, I., Serrano-Pérez B., Molina, E., Noya, A., Sanz, A., Casasús I., Villalba, D.

¹Universitat de Lleida (UdL). Av. Alcalde Rovira Roure 191, 25198 Lleida, España. ²Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón – IA2 (CITA-Universidad de Zaragoza). Avda. Montañana 930, 50059 Zaragoza, España; irenelh@ca.udl.cat

INTRODUCCIÓN

La productividad en los sistemas de ganado vacuno depende no solo de la selección genética sino también de factores como la nutrición o el ambiente (revisado por Chavatte-Palmer et al. 2018). A una correcta productividad hay que sumarle una adecuada gestión económica de los recursos, lo que implica una optimización de los costes de la ración. La restricción en la dieta o el uso de elementos de baja calidad nutricional puede suponer un ahorro económico considerable, pero puede repercutir en la reproducción, afectando negativamente a los periodos tempranos de gestación y el desarrollo placentario (Long et al. 2009; McLean et al. 2018). Una manera de valorar la viabilidad del conceptus durante el periodo preimplantacional en rumiantes es la caracterización de los genes estimulados por interferón (ISGs) en sangre materna, inducidos por el interferón tau (Han et al., 2006; Matsuyama et al., 2102). Algunos de estos ISGs, como el ISG15, o las proteínas Mx1 y Mx2 (*myxovirus resistance 1 y 2*) poseen un importante papel en la inmunomodulación materna durante la implantación (Hansen y Pru, 2014). Un incremento en los niveles de expresión de estos ISGs el día 19 post inseminación artificial (IA) se asocia con un posterior diagnóstico de gestación positivo (Green et al., 2010). Sin embargo, apenas existe información sobre el uso de métodos de aprendizaje automático, como los árboles de decisión, para predecir la preñez y su viabilidad a partir de la expresión de ISGs. El objetivo de este estudio fue evaluar la expresión de ISGs a días 18 y 21 post-IA en células mononucleares sanguíneas periféricas (CMSP) en vacas nodrizas subnutridas durante los días 1-82 post-IA mediante árboles de decisión.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó entre Septiembre 2014 y Marzo 2015 en la granja experimental La Garcipollera (945 msnm, Jaca, Huesca). Se incluyeron 53 vacas nodrizas multíparas de raza Parda de Montaña (n=34, PA) y Pirenaica (n=19, PI). Las vacas se sincronizaron y se inseminaron 65± 14 días después del parto. El día de la IA los animales se distribuyeron de manera aleatoria en dos grupos. Un grupo CONTROL (n=23) con una alimentación con el 100% de los requerimientos energéticos de mantenimiento, lactación y gestación (10,9 y 10,0 kg MS/vaca/día para la PA y PI respectivamente) y otro de alimentación restringida (SUBNUT; n=30) con el 65% de los requerimientos energéticos (7,0 y 6,4 kg MS/vaca/día) hasta el día 82 de gestación, donde se les administró el 100% de los requerimientos a ambos grupos. El diagnóstico de gestación se realizó el día 37 post-IA mediante ecografía transrectal (transductor de 7,5MHz) y se confirmó a día 90 post-IA.

De cada animal, se tomaron muestras de sangre de la vena coccígea en 2 tubos con EDTA (BD Vacutainer®, Becton, Dickinson and Company, Plymouth, RU) el día 18 y 21 post-IA para el aislamiento de CMSP. El aislamiento de CMSP se realizó mediante un gradiente de densidad con Histopaque-1077 (SIGMA-ALDRICH, Madrid, España), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ARN de las células mononucleares se extrajo mediante el protocolo Trizol (Invitrogen Carlsbad, California, EEUU), se trató con DNAsas y se obtuvo ADN copia (cDNA) mediante transcripción reversa en presencia de iniciadores *random* con la enzima RevertAid Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, Alcobendas-Madrid, España). La expresión de ARN mensajero para los genes *OAS1*, *ISG15*, *MX1*, *MX2* y el gen de referencia β -actina (*ACTB*) se determinó mediante PCR a tiempo real empleando el sistema SYBR Green (Thermo Scientific, Alcobendas-Madrid, España) en un aparato de detección ABI PRISM™ 7500 (Applied Biosystem, Foster City, CA, EEUU). Los resultados se expresaron en

expresión relativa (RQ). De cada animal se tomaron datos de la raza, fertilidad, y de la expresión génica de *ISG15*, *MX1*, *MX2* y *ACTB* el día 18 y 21.

Los niveles de expresión transformados de forma logarítmica fueron analizados mediante un modelo lineal (JMPPro, SAS Institute Inc., Cary, NC, EEUU) que incluía el día de muestreo, el nivel de alimentación, la raza y el diagnóstico de gestación. Se usó el procedimiento de árboles de decisión del mismo paquete estadístico para evaluar la bondad de los cuatro genes ISGs para predecir el estatus de gestación. Los cuatro ISGs eran potenciales predictores y el algoritmo del árbol de decisión seleccionó cuál de ellos (y a partir de qué umbral) era estadísticamente mejor (a partir de los parámetros G2 y $-\log$ (probabilidad)) para estimar el estatus de gestación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tasa de preñez registrada en el estudio fue del 66% (n=14 en vacas CONTROL; n=21 en vacas SUBNUT, $p=0,36$). No se observó un efecto de la subnutrición materna o de la raza en la expresión de ISGs, sin embargo, el día de muestreo (18 vs. 21) y el estado de preñez afectaron significativamente la expresión. Los niveles de expresión de *OAS1*, *MX1*, *MX2* y *ISG15* fueron superiores a día 21 en comparación con el día 18 ($p<0,001$). Las hembras gestantes presentaron mayor nivel de expresión de *OAS1*, *MX2*, *ISG15* en contraste con las hembras no preñadas. La detección de ISGs en sangre materna ha demostrado ser una herramienta excelente para la detección de la viabilidad embrionaria en rumiantes (Green et al., 2010).

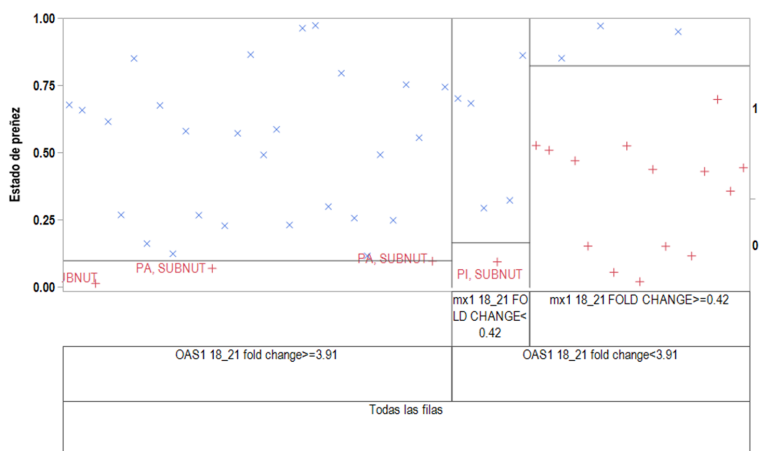


Figura 1. Árbol de partición. Estado de preñez a 90 días post-IA, representado en el eje de abscisas (X gestante, + no gestante), de acuerdo con los niveles umbrales establecidos de las variaciones de *OAS1* y *MX1* del día 18 al 21, representado en el eje de ordenadas. PA, parda de montaña, PI pirenaica.

El análisis estadístico mediante árbol de decisión determinó la mejor combinación de parámetros relacionados con la expresión de ISGs (aumento en la expresión de *MX1*, *MX2*, *OAS1* y *ISG15* del día 18 al 21 post-IA) en relación a su carácter predictivo sobre el estado de preñez a día 37. El aumento de *OAS1* fue la primera variable detectada para discriminar los animales gestantes. Un aumento de *OAS1* de 3,91 y de *MX1* por debajo de 0,42 fueron los niveles de referencia para definir el estado de preñez (32 de 35 animales preñados cumplieron estos valores) (Figura 1). Cuatro vacas del grupo SUBNUT cumplieron estos parámetros pero fueron diagnosticadas como no preñadas a día 37 o 90 y por lo tanto clasificadas como pérdidas de gestación tempranas. El resto de las 14 vacas no gestantes se clasificaron como no preñadas de acuerdo a la clasificación estadística realizada. Los

resultados muestran que la combinación de los cambios en *OAS1* y *MX1* en los días 18-21 post-IA podrían ser los mejores indicadores para discriminar el estado de preñez en el ganado de carne. A pesar del marcado efecto de la subnutrición en el crecimiento embrionario en los estadios tempranos de preñez descrito en otros trabajos (Long et al. 2009; McLean et al. 2018), nuestros resultados sugieren que la mayoría de las hembras fueron capaces de desarrollar respuestas adaptativas para garantizar la formación del blastocisto (Velazquez et al. 2015). Sin embargo, el efecto de la subnutrición en el ambiente uterino pudo condicionar la supervivencia embrionaria aumentando el riesgo de pérdida durante las primeras semanas de gestación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Chavatte-Palmer, P., Velazquez, M.A., Jammes, H & Duranthon, V. 2018. *Animal*. 24:1-9.
- Han, H., Austin, K.J., Rempel, L.A. & Hansen, T.R. 2006. *J Endocrinol*. 191:505-12.
- Hansen, T.R. & Pru, J.K. 2014. *Adv. Exp. Med. Biol.* 759: 13-31.
- Green, J.C., Okamura, C.S., Pooock, S.E., Lucy, M.C. 2010. *Anim Reprod Sci*. 121(1-2):24-33.
- Long, N.M., Vonnahme, K.A., Hess, B.W., Nathanielsz, P.W. & Ford, S.P. 2009. *J Anim Sci*. 87, 1950–1959.
- Matsuyama, S., Kojima, T., Kato, S. & Kimura, K. 2012. *Reprod Biol Endocrinol*. 10:21.
- McLean, K.J., Crouse, M.S., Crosswhite, M.R., Negrin Pereira, N., Dahlen, C.R., Borowicz, P.P., Reynolds, L.P., Ward, A.K., Neville, B.W. & Caton, J.S. 2018. *J Anim Sci*. 96:950-963.
- Velazquez, M.A. 2015. *Domest Anim Endocrinol*. 51:27-45.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el proyecto INIA RTA13-059-C02.

EFFECT OF PERI-IMPLANTACIONAL MATERNAL NUTRIENT RESTRICTION ON INTERFERON STIMULATED GENES (ISGs) IN SUCKLER BEEF DAMS. DECISION TREE ANALYSES AS A DIAGNOSTIC TOOL

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate ISG expression on Days 18 and 21 post-AI in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) in suckler beef cows suffering nutrient restriction from days 1-82 post-AI, by using decision tree analyses. Suckler beef dams were submitted to fixed-time insemination and were assigned to a CONTROL (n = 23) or SUBNUT (n = 30) group, receiving 100% or 65%, respectively, of their estimated nutritional requirements from Day 1 to 82 post-AI. Expression patterns of ISGs were measured in PBMCs on days 18 and 21 post-AI. Decision tree analysis determined the best predictive combination of parameters (Fold changes in expression of *MX1*, *MX2*, *OAS1* and *ISG15* from day 18 to 21 post-AI) for predict pregnancy status on day 37. The combination of *OAS1* and *MX1* fold change where the thresholds that define pregnancy status (32 out the 35 pregnant cows accomplished the threshold). Treatment did not affect ISG expression nor fertility. These results indicate that maternal nutrient restriction during the first third of pregnancy did not impair embryo signalling although may increase the risk of pregnancy failure.

Keywords: Suckler cow, subnutrition, ISGs.