ESTUDIO PRELIMINAR DEL EFECTO DE LA SUPLEMENTACION CON PROGESTERONA A DIA 16-19 POST-INSEMINACION SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES ESTIMULADOS POR INTERFERÓN TAU (IFN-τ) EN VACAS LECHERAS.

López-Helguera[1], I., Tuono, T., Mur, R., López-Gatius, F. y Serrano-Pérez, B.
[1]Agrotecnio, Universidad de Lleida, Lleida, España. irenelh@prodan.udl.cat

INTRODUCCIÓN

La fertilidad en la vaca es un factor clave en la rentabilidad de la explotación. En los últimos años los problemas reproductivos del vacuno de leche se han intensificado, disminuyendo la fertilidad y eficacia reproductiva de estos animales (López-Gatius, 2003). El origen del problema es multifactorial, siendo el elevado metabolismo de la vaca lechera de alta producción un punto determinante en la reducción de los niveles de progesterona y estradiol en sangre (Wolfenson et al., 2004). La progesterona ejerce un papel muy importante durante el reconocimiento materno de la preñez (Spencer et al., 2007). Por ello, concentraciones de progesterona inadecuadas durante el desarrollo temprano del embrión podrían estar relacionadas con la reducción de la fertilidad observada (Wiltbank et al., 2011). La progesterona es indispensable para la preparación del endometrio y el mantenimiento de la gestación, por lo que un aporte exógeno de esta hormona post-inseminación (IA) podría incrementar la fertilidad de las vacas lecheras en lactación. Además, la progesterona está directamente relacionada con el crecimiento del conceptus y éste con los niveles de interferón tau (INF-τ) (O´Hara et al., 2014). La producción de interferón tau (INF-τ) por el embrión, no sólo bloquea la luteólisis, sino que induce la expresión de genes estimulados por interferón (ISG) tanto a nivel local como en la circulación periférica (Gifford et al., 2007). Algunos de estos ISGs, como el ISG15, o las proteínas Mx1 y Mx2 (*myxovirus resistance 1 y 2*) poseen un importante papel en la respuesta antiviral y en la inmunomodulación materna durante la implantación (Hansen y Pru, 2014).

El objetivo de este estudio fue determinar los efectos de la suplementación con progesterona mediante un dispositivo intravaginal (PRID) entre los días 16-19 post-IA sobre la expresión de los genes ISG15, Mx1 y Mx2 en vacas lecheras de alta producción.

MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en una granja comercial con 650 vacas en lactación situada en la franja de Lleida-Huesca. La población de estudio estuvo constituida por 14 vacas multíparas de raza Frisona inseminadas mediante IA a celo visto con dosis seminales de toros Frisones de fertilidad probada. El día 16 post-IA, los animales se asignaron aleatoriamente a un grupo control (n=5) o tratamiento (n=9) a los que se les introdujo un PRID (1,55 g de progesterona; CEVA, Francia) durante 3 días, retirando el dispositivo el día 19 post-IA. El diagnóstico de gestación se realizó los días 28-34 post-IA mediante ecografía transrectal. De cada animal, se tomaron muestras de sangre de la vena coccígea en 2 tubos con EDTA (5 ml) (BD Vacutainer®, Becton, Dickinson and Company, Plymouth, GB) el día 20 post-IA. A partir de esta muestra se aislaron las poblaciones mononucleares 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), 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 ISG15, Mx1, Mx2 y el gen de referencia β-actina 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 fertilidad, y de la expresión génica de ISG15, Mx1, Mx2 y β-actina el día 20 post-IA. Los datos se analizaron estadísticamente mediante el test U de Mann-Whitney con el paquete SPSS v.17 (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La fertilidad de la población de estudio fue del 50% (7/14). De los animales gestantes, tres pertenecían al grupo control (3/5) y cuatro al grupo tratado con PRID (4/9). La fertilidad estuvo significativamente relacionada con la expresión génica del ISG15 (*P*=0,013), Mx1 (*P*=0,035), y Mx2 (*P*=0,018), presentando los animales gestantes niveles de expresión superiores a los no gestantes (Figura 1). Estos resultados concuerdan con lo descrito por Hansen y Pru (2014) en hembras preñadas. Sin embargo, la suplementación con progesterona entre los días 16 y 19 post-IA no afectó a la expresión génica de los ISGs, observándose niveles similares de ISGs entre el grupo control y el grupo tratado con PRID (Figura 2). En un estudio previo, la suplementación con progesterona a través de un PRID entre los días 4 y 11 post-IA no mejoró la fertilidad en vacas lecheras inseminadas a tiempo fijo (Colazo et al., 2013). De la misma manera, el tratamiento con progesterona entre los días 4 y 18 post-IA no mejoró la fertilidad ni incrementó la expresión de ISGs a día 19 post-IA a celo visto (Monteiro et al., 2014). Por el contrario, otros trabajos encontraron mejoras en la fertilidad tras el tratamiento con progesterona post-IA (Friedman et al., 2012). A la vista de los resultados preliminares obtenidos no observamos un efecto del tratamiento con progesterona a día 16 post-IA sobre la expresión de genes ISGs en vacas multíparas, siendo necesarios posteriores estudios que clarifiquen esta interacción.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Colazo, M.G., Dourey, A., Rajamahendran, R., Ambrose, D.J. 2013. Theriogenology 79: 833-41. • Friedman, E., Roth, Z., Voet, H., Lavon, Y., Wolfenson, D. 2012. J Dairy Sci 95: 3092-9. • Gifford, C.A., Racicot, K., Clark, D.S., Austin, K.J., Hansen, T.R., Lucy, M.C., Davies, C.J., Ott, T.L. 2007. J. Dairy. Sci. 90: 274-80. • Hansen TR, Pru JK. 2014. Adv. Exp. Med. Biol. 759: 13-31. • López-Gatius F. 2003. Theriogenology 60: 89–99. • Monteiro Jr., P. L. J., Ribeiro, E. S., Maciel, R. P., Dias, A. L. G., Solé Jr., E., Lima, F. S., Bisinotto, R. S., Thatcher, W. W., Sartori, R., and Santos, J.E.P. 2014. J. Dairy Sci. 97: 1-15. • O'Hara, L., Forde, N., Carter, F., Rizos, D., Maillo, V., Ealy, A.D., Kelly, A.K., Rodriguez, P., Isaka, N., Evans, A.C., Lonergan, P. 2014. Reprod Fertil Dev 26(2):328-36. • Spencer, T. E., G. A. Johnson, F. W. Bazer, R. C. Burghardt, and M.Palmarini. 2007. Reprod. Fertil. Dev. 19: 65–78. • Wiltbank, M. C., A. H. Souza, P. D. Carvalho, R. W. Bender, and A. B. Nascimento. 2011. Reprod. Fertil. Dev. 24: 238–243. • Wolfenson D., Inbar G., Roth Z., Kaim M., Bloch A., Braw-Tal R. 2004. Theriogenology 62: 1042–1055.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración de la granja Allué (Sucs, Lleida).

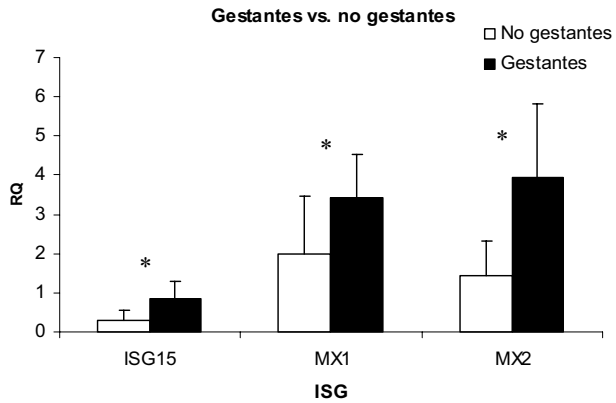


Figura 1. *Medias (± desviación estándar) de la expresión relativa (RQ) de los genes estimulados por el interferón tau (ISGs) en vacas gestantes (n=7) y no gestantes (n=7). * p<0,05.*

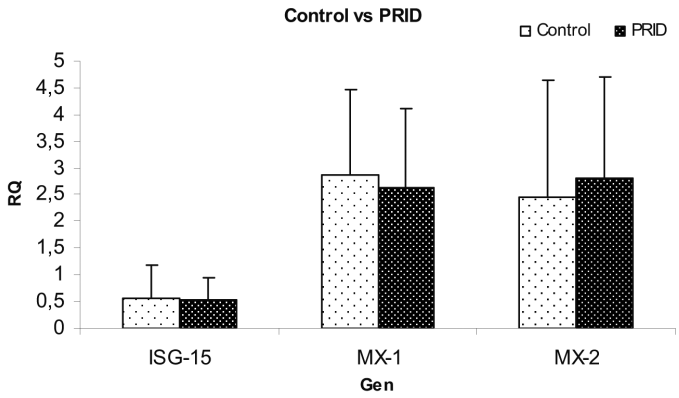


Figura 2. *Medias (± desviación estándar) de la expresión relativa (RQ) de los genes estimulados por el interferón tau (ISGs) en vacas control (n=5) y tratadas con implantes de progesterona (n=9).*

EFFECTS OF PROGESTERONE SUPPLEMENTATION POST ARTIFICIAL INSEMINATION ON THE EXPRESSION OF INTERFERON TAU (IFN-τ)-STIMULATED GENES IN DAIRY COWS: A PRELIMINARY STUDY

ABSTRACT: Progesterone is essential for the preparation of the endometrium and the maintenance of pregnancy, so supplementation with progesterone after artificial insemination (AI) could increase fertility in lactating dairy cows. The aim of this study was to determine the effects of treatment with a progesterone intravaginal device (PRID) between Days 16 and 19 post-AI on the expression of the genes ISG15, Mx1 and Mx2. On Day 16 post-AI, lactating dairy cows were randomly allocated to one of two groups, control (n=5) or treatment (n=9) with a PRID for 3 days. Blood samples were collected on Day 20 after AI and the expression of genes in peripheral mononuclear cells was determined by RT-qPCR. The overall pregnancy was 50% (7/14). Cows diagnosed as pregnant had a higher gene expression of ISG15, Mx1 and Mx2 compared to those non-pregnant ($p<0.05$). Supplementation with progesterone post-IA did not affect the expression of ISG, Mx1 and Mx2 on Day 20 post-IA. Further studies are needed to clarify the effect of progesterone treatment on ISGs.

Keywords*:* Dairy cows, progesterone, interferon-stimulated genes, fertility.