

Informe final publicable de proyecto

Estudio longitudinal de la microbiota bacteriana vaginal bovina a nivel taxonómico y su relación con el ciclo reproductivo

Código de proyecto ANII: FCE_1_2019_1_155852

Fecha de cierre de proyecto: 04/11/2022

CALLEROS BASILIO, Lucía (Responsable Técnico - Científico)

LOCKHART, Bernardo (Investigador)

GARZÓN, Juan Pablo (Investigador)

URIOSTE ARRICAR, Victoria (Investigador)

ANTUNES GASTAL, Gustavo Desire (Investigador)

GRECCO PATIÑO, Sofía (Investigador)

LOZANO TERRA, Joaquín (Investigador)

PÉREZ CROSSA, Ruben Gustavo (Investigador)

SANGUINETTI ELIZONDO, Virginia Margarita (Investigador)

BARCELLOS COITIÑO, Maila Sabrina (Investigador)

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS (Institución Proponente) \\ INIA \\

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS

Resumen del proyecto

La composición de la microbiota tiene grandes implicancias en la salud humana y animal. En bovinos, se propuso que la composición de la microbiota del tracto reproductivo de las hembras condiciona el comportamiento reproductivo, la susceptibilidad a patógenos genitales y la salud de los animales neonatos.

Estas hipótesis deben ser probadas a través del análisis de diferencias en la microbiota de casos y controles, para lo cual es importante contar con información de la microbiota del ganado sano.

Este proyecto estuvo enfocado en analizar la composición de la microbiota vaginal bovina en relación al ciclo reproductivo. Mediante secuenciación masiva de un fragmento del gen 16S, se obtuvo un perfil taxonómico de la microbiota vaginal bacteriana de animales sanos. Los individuos se muestrearon en distintos momentos del ciclo reproductivo.

Se comparó la composición de la microbiota de todos los animales para cada momento del ciclo, encontrándose grandes diferencias interindividuales. La composición de la microbiota al momento de la inseminación entre las vacas que resultan preñadas y las que no es significativamente diferente.

Los resultados del proyecto serán una línea de base para el diseño de futuros proyectos que analicen la asociación entre la microbiota y el comportamiento reproductivo, lo cual podrá influir en mejorar la productividad de los rodeos.

Ciencias Naturales y Exactas / Ciencias Biológicas / Biología Celular, Microbiología / Metagenómica

Palabras clave: Microbiota vaginal bovina / Reproducción bovina / /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Históricamente la economía de Uruguay se ha basado en la exportación de productos agropecuarios, especialmente de carne bovina y sus derivados. Por lo tanto, puede considerarse a la producción bovina como uno de los pilares de la economía nacional.

El éxito económico de la industria cárnica y lechera depende en gran parte de las tasas reproductivas del rodeo. Cualquier desviación (bajas tasas de preñez, largos intervalos entre pariciones, bajos números de vacas preñadas en función del número de inseminaciones artificiales y pérdidas tempranas del embrión, entre otras) redundan en pérdidas ocasionadas por la baja tasa de procreo y/o de producción de leche. Frecuentemente, las vacas con problemas reproductivos son retiradas del rodeo, por lo cual se ocasionan pérdidas también por este motivo (Gábor et al. 2016; Saraswat y Purohit 2016).

Actualmente, a pesar de la tecnología y avances disponibles en el área sanitaria, los productores a nivel mundial siguen sufriendo pérdidas por repeticiones de celos y problemas con la fertilidad, y nuestro país no es una excepción a este respecto (Easton et al. 2003; Repisso et al. 2005).

La etiología de los problemas reproductivos es multifactorial. Entre las causas que influyen en el comportamiento reproductivo bovino se destacan los factores nutricionales y de manejo (Quintans 2013), los infecciosos a nivel de todo el aparato reproductivo, malformaciones o disfunciones hormonales (Saraswat y Purohit 2016) y causas genéticas diversas (Diskin et al. 2016).

La metagenómica es un área que ha ganado creciente interés en los últimos años, con una gran diversidad de enfoques ecológicos, biotecnológicos y sanitarios. En particular el estudio de las comunidades microbianas presentes en determinadas partes del cuerpo tiene grandes implicancias en la salud humana y animal, y recientemente se ha puesto de manifiesto el rol preponderante que juegan los microorganismos en procesos fisiológicos.

Existen múltiples estudios que muestran que la microbiota vaginal y sus variaciones tienen gran influencia en la salud reproductiva de diversas especies de mamíferos (Li et al. 2017; Miller et al. 2017, Mahalingan et al. 2019). En humanos, se ha detectado que la microbiota vaginal de mujeres saludables es muy dinámica, y cambios importantes en su composición a lo largo del tiempo están asociados a varios factores como el ciclo menstrual, el embarazo, la etapa de la vida, comportamientos sexuales y de higiene, entre otros (Ma et al. 2013). Estas variaciones resaltan la importancia de contar con un buen grupo control y datos de individuos saludables para poder buscar asociaciones con diversos factores como el comportamiento reproductivo.

En el ganado bovino, se estima que un individuo posee 120 veces más células bacterianas que bovinas, en parte debido a la gran cantidad de microorganismos que son responsables por la fermentación en el rumen (Ross et al. 2013).

Se han realizado numerosos estudios de la microbiota del sistema digestivo (Noyes et al. 2016), asociando fenotipos complejos como el nivel de producción de metano con la composición de comunidades bacterianas (Ross et al. 2013). En el sistema reproductivo, se han realizado algunos estudios de la diversidad bacteriana utilizando métodos basados en cultivo (Otero et al.

2000).

Los estudios independientes de cultivo están en sus comienzos (Laguardia-Nascimento et al. 2015; Bicalho et al. 2017a, 2017b, 2017c), y aun no se cuenta con un bagaje de información suficiente para evaluar cuáles son los factores que influyen con mayor importancia en la composición de la microbiota vaginal, o su correlación con el ciclo reproductivo (Laguardia-Nascimento et al. 2015).

La microbiota vaginal bovina sufre de variaciones a lo largo del ciclo reproductivo, (Laguardia-Nascimento et al. 2015). Una característica llamativa es que la microbiota vaginal y del útero comparten la mayoría de los géneros presentes, por lo que se supone que las bacterias pueden ingresar por vía vaginal hasta el útero, donde algunos desbalances pueden llevar a infecciones uterinas que pueden provocar abortos o partos prematuros (Swartz et al. 2014).

Ha sido propuesto que la microbiota vaginal también puede tener influencia en la susceptibilidad a patógenos del tracto reproductivo (*Brucella ovis*, *Campylobacter fetus*, *Helicobacter trogontum*, o *Arcobacter cryaerophilus*, entre otros), en la colonización temprana de los animales neonatos, lo cual afectaría la salud del recién nacido, y un impacto directo en el comportamiento reproductivo, incluyendo la producción de abortos (Swartz et al. 2014).

Las hipótesis descritas arriba deben ser probadas a través de la comparación y análisis estadístico de diferencias en la microbiota de grupos de casos y controles, para lo cual es importante contar con una base de información de la microbiota del ganado sano (Miranda-Casoluengo et al. 2018).

El presente proyecto está enfocado en el estudio taxonómico de la microbiota vaginal bovina a lo largo del ciclo reproductivo, con el objetivo de generar información para elaborar una clasificación de los individuos según la composición de su microbiota, que ha demostrado ser útil como línea de base en estudios de problemas reproductivos diversos en humanos (Ma et al. 2017, Golstman et al. 2018).

Nuestra hipótesis de trabajo postula que existen diferencias entre la diversidad de especies de bacterias presentes en la vagina de individuos sin problemas reproductivos en los distintos momentos del ciclo reproductivo.

El objetivo del proyecto, por lo tanto, fue realizar un análisis taxonómico de la microbiota vaginal bacteriana de hembras de bovinos a lo largo del ciclo reproductivo mediante la secuenciación masiva de amplicones del gen 16S, y asociar los cambios en la microbiota a lo largo del tiempo con las diferentes fases del ciclo.

El desarrollo de esta propuesta permitirá contar con información detallada y sistemática de la microbiota vaginal del ganado bovino en un contexto de salud reproductiva. Los datos obtenidos generarán una línea de base de la microbiota y su dinámica a lo largo del ciclo reproductivo. La información obtenida será un punto de partida para visualizar la factibilidad del desarrollo de estrategias de control de problemas reproductivos basadas en la evaluación de la microbiota, que repercutirán en una mejora generalizada de la salud reproductiva bovina.

El proyecto aporta herramientas de monitoreo del desarrollo de posibles alteraciones en la salud del tracto reproductivo a lo largo del ciclo. Esta información será útil a la hora del diseño de terapias basadas en la remediación de desbalances en la microbiota vaginal que puedan ser asociados a problemas reproductivos. También sentará las bases para el diseño de estudios tendientes a correlacionar los cambios en la microbiota y su asociación con el comportamiento reproductivo, con diferentes formas de cría y alimentación del ganado. A su vez, esta línea base será de utilidad para estudios de la relación de la microbiota del tracto reproductivo con la presente en distintos sectores del ambiente (comida y fuentes de agua, suelos, aguas residuales, etc.). Eventualmente, el futuro desarrollo de este tipo de proyectos redundará en una mejora generalizada de la salud reproductiva bovina.

Por lo tanto, una vez publicados los resultados, se espera un beneficio para la parte de la comunidad científica que estudia estos temas, y para los organismos y sectores que utilizan de forma directa o indirecta la información generada por estos estudios. Esto ayudará a generar herramientas para optimizar los índices de procreo del ganado bovino, colaborando en la superación de este problema crónico del sector.

En el futuro, y en la medida en que existan recursos disponibles, este estudio podrá ser complementado con el estudio funcional de la microbiota utilizando las muestras tomadas en el presente proyecto.

Metodología/Diseño del estudio

Muestreo

El muestreo debió ser replanificado al inicio del proyecto debido a problemas logísticos. El mismo se realizó en ganado lechero del tambo experimental de INIA La Estanzuela, con la participación del Dr. Gustavo Gastal, director del área de Reproducción de INIA La Estanzuela, y su equipo.

El ensayo comenzó con 48 animales que ingresaron al mismo en distintos momentos del año.

Los individuos se muestrearon en distintos momentos del ciclo reproductivo. Todos los animales se muestrearon al momento de la inseminación. Las vaquillonas que repitieron el celo (n= 20) no fueron muestreadas nuevamente. El resto fue muestreado

al día 30, en simultáneo con el diagnóstico de preñez. Aquellos animales que resultaron preñados fueron muestreados entre dos y cuatro veces más a lo largo del ciclo.

El muestreo fue realizado mediante hisopado del cérvix utilizando hisopos estériles con doble cánula "Uterus culture swab" (Minitüb GMBH).

Puesta a punto de técnicas

Procesamiento de las muestras y extracción de ADN

Se probaron tres protocolos de procesamiento de la muestra a partir de hisopados vaginales, realizando distintos procedimientos luego de hisopar (homogeneización en PBS, homogeneización en PBS con posterior concentración, congelado directo del hisopo). En base a los resultados de la extracción de ADN utilizando un kit comercial, se determinó que el congelado directo del hisopo permite extraer una mayor cantidad y calidad de ADN. A partir de esta determinación, se continuaron procesando las muestras con este protocolo. Las extracciones de ADN se realizaron utilizando el kit Qiamp DNA Mini Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante para la extracción a partir de hisopados.

Amplificación

Utilizando una comunidad artificial comercial, cuya composición es conocida, se realizó una puesta a punto de la PCR para la amplificación de la región V4 del gen del ARNr 16S. Se probaron varias enzimas, mixes de reacción y primers, se varió la concentración de los reactivos y las condiciones de ciclado hasta lograr la estandarización. Para la PCR de unión de adaptadores (indexado), se varió la concentración de reactivos y condiciones de ciclado hasta lograr amplicones adecuados para la secuenciación. Se probaron dos métodos de purificación de amplicones de ambas PCRs, utilizando varios reactivos alternativos hasta lograr obtener un purificado con una adecuada concentración de ADN.

Una vez obtenidos datos de secuenciación, se comprobó que una alta proporción de reads correspondían a secuencias mitocondriales del hospedero, por lo que se decidió comenzar a utilizar los primers 27F y 338R que amplifican la región V1-V2 y que dan mejores resultados en este sentido (Walker et al. 2020). Una vez corroborado esto, se utilizó este juego de primers para todas las muestras.

Generación de librerías y secuenciación

A partir de las extracciones de ADN, se realizó una PCR utilizando una Taq polimerasa de alta fidelidad (Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase, NEB). Se amplificó la región V1-V2 del gen ribosomal 16S con los cebadores 27F y 338R (Walker et al. 2020) modificados, que tienen las secuencias específicas y un overhang con la secuencia de los adaptadores que permiten agregar los index para multiplexar las muestras. Las librerías fueron cuantificadas en un fluorómetro Qubit 3.0 (Thermo Scientific) y su calidad fue evaluada mediante el análisis por electroforesis capilar en un equipo Fragment Analyzer (Advanced Analytical) utilizando el kit Standard Sensitivity NGS Fragment Analysis kit.

Se agregaron index de multiplexado utilizando el kit Nextera XT Index Kit v2 Set A. Las librerías se normalizaron y se generaron pooles que se secuenciaron en un equipo Illumina MiniSeq utilizando un kit de reactivos MiniSeq Mid OutPut Kit (300 cycles).

Análisis de datos

Los datos de secuencias crudas (reads en formato Fastq) son filtrados por calidad, se cortan los primers y las zonas de baja calidad (trimming), se remueven las quimeras y se buscan los ASVs utilizando el paquete de R DADA2 (Callahan et al. 2016).

Se realizan comparaciones de la diversidad taxonómica presente en cada muestra. Se utiliza un análisis discriminante para identificar bacterias de diferentes niveles taxonómicos asociadas con posibles enfermedades de los animales y zoonosis utilizando el paquete de R vegan (Oksanen et al. 2022).

Resultados, análisis y discusión

En un análisis preliminar de los datos, se comparó la composición de la microbiota de todos los animales para cada momento del ciclo. Se encontraron grandes diferencias interindividuales (Figuras 1-3).

La composición de la microbiota al momento de la inseminación entre las vacas que resultan preñadas y las que no, es significativamente diferente (Figura 1 y 4). En un test de ANOVA comparando estos grupos el valor p es de 0.023.

La composición de la microbiota de cada individuo varía a lo largo del ciclo (Figuras 1-3).

Los resultados indican que las variaciones individuales en la microbiota son muy amplias, encontrándose una correlación estadística entre la composición de la microbiota al momento de la inseminación y el éxito de la misma. Resta analizar los

cambios de la microbiota a lo largo del ciclo y establecer parámetros para clasificar a los animales, observando más en profundidad los taxa con abundancias diferenciales.

Conclusiones y recomendaciones

El proyecto resultó exitoso ya que los resultados obtenidos son valiosos para analizar el comportamiento de la microbiota a lo largo del ciclo.

Además, podemos extraer conclusiones preliminares en cuanto a la relación de la microbiota y la preñez obtenida en la primera inseminación para las vaquillonas que formaron parte del experimento.

El análisis de los taxa implicados en la diferenciación entre los animales permitirá elaborar hipótesis sobre la posible relación funcional que existe entre la microbiota y el comportamiento reproductivo, que deberán ser contrastadas en futuros proyectos.

Referencias bibliográficas

- Bicalho et al. 2017a. *Journal of Dairy Science* 100:1-16.
- Bicalho et al. 2017b. *Journal of Dairy Science* 100:1-13.
- Bicalho et al. 2017c. *Journal of Dairy Science* 100:1-12.
- Callahan et al. 2016. *Nat Methods*. Jul;13(7):581-3.
- Diskin et al. 2016. *Reproduction, Fertility and Development*, 28:83–93.
- Easton et al. 2003. *Vet (Mdeo)*, 38:25–30.
- Gábor et al. 2016. *Open Journal of Animal Sciences*, 6:75–84.
- Goltsman et al. 2018. *BioRxiv*, 266700.
- Laguardia-Nascimento et al. 2015. *PlosOne*, 10(11):e0143294.
- Li et al. 2017. *Microbiol. Res.* 199:1-9
- Noyes et al. 2016. *eLife*, 5: 1–21.
- Ma et al. 2013. *Annu Rev Microbiol*, 66:371–389.
- Mahalingam et al. 2019. *Symbiosis* <https://doi.org/10.1007/s13199-018-00595-y>
- Miller et al. 2017. *Microbiome* 5(8): 1–14. Quintans, G. 2013. *Revista INIA* 34:7–9.
- Miranda-Casoluengo et al. 2018. *BioRxiv*, 1–23.
- Oksanen J et al. 2022. <<https://CRAN.R-project.org/package=vegan>>.
- Otero et al. 2000. *Letters in Applied Microbiology*, 31(3): 251–254.
- Repiso et al. 2005. *Veterinaria*. 40: 1-28.
- Ross et al. 2013. *PLoS ONE*, 8(9).
- Saraswat y Purohit. 2016. *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(2): 87–95.
- Swartz et al. 2014. *Frontiers in Veterinary Science*, 1(19):1–10.
- Walker et al. 2020. *Scientific Reports* 1–7.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)