

Informe final publicable de proyecto

Análisis metagenómico de la microbiota vaginal bovina y su rol en la preñez

Código de proyecto ANII: FCE_3_2022_1_172440

Fecha de cierre de proyecto: 01/03/2025

BARCELLOS COITIÑO, Maila Sabrina (Responsable Técnico - Científico)

ANTUNES GASTAL, Gustavo Desire (Investigador)

CALLEROS BASILIO, Lucía (Investigador)

GRECCO PATIÑO, Sofía (Investigador)

PÉREZ CROSSA, Ruben Gustavo (Investigador)

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

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA \\\ UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA. FACULTAD DE CIENCIAS

Resumen del proyecto

La salud reproductiva bovina es un tema clave de investigación actual, siendo un rasgo multifactorial que puede verse afectado por factores no infecciosos e infecciosos. El estudio de la microbiota del tracto reproductor bovino ha sido tema de investigación en los últimos años debido a su potencial relación con el estado reproductivo. En el marco del proyecto ANII-FCE (FCE_1_2019_1_155852) nuestro grupo realizó la amplificación por PCR y secuenciación del fragmento V1-V2 del gen 16S de bacterias y arqueas de la región cérvico-vaginal de vaquillonas sanas, al momento de la inseminación artificial. Se encontró que si bien los animales estudiados no presentaban síntomas de enfermedades reproductivas, no todos respondieron de igual manera a la inseminación artificial. No se observaron cambios en la diversidad de la microbiota entre los grupos de vaquillonas preñadas y no preñadas pero sí cambios en la abundancia diferencial debido a los taxones menos abundantes. Basándonos en estos resultados, en el presente proyecto, nuestro objetivo fue realizar un análisis más profundo de la microbiota, con un enfoque de secuenciación por shotgun, y de su posible correlación estadística con el posterior éxito de la inseminación artificial. Las bibliotecas obtenidas se secuenciaron en un equipo Illumina Miseq. Se obtuvieron los datos de secuenciación de 24 muestras, 11 del grupo preñadas y 13 del grupo de no preñadas, con una media de lecturas de 14.070.680 reads por muestra. Se realizó un análisis preliminar de 6 muestras con el programa Genome Detective. Se observaron diferencias interindividuales pero no se encontró un patrón claro de diferenciación entre los dos grupos de vaquillonas. Se continuará con el análisis para realizar la clasificación taxonómica y funcional. Los resultados serán comparados con los obtenidos en el proyecto anterior para tratar de encontrar biomarcadores de preñez aportando información relevante en el contexto de Una Salud.

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

Palabras clave: Metagenómica / Microbioma / Salud reproductiva bovina /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

La salud reproductiva bovina es un rasgo multifactorial que puede verse afectado tanto por factores no infecciosos como infecciosos. Dentro de las causas no infecciosas se incluyen a los factores nutricionales y de manejo (Quintans et al. 2013), causas genéticas diversas (Diskin et al. 2016), factores ambientales (Mwansa et al. 2002) y las malformaciones o disfunciones hormonales (Saraswat y Purohit 2016). Los factores infecciosos están relacionados principalmente con la colonización de microbios persistentes que pueden provocar inflamación y distorsionar el ciclo reproductivo, bajar las tasas de concepción, aumentar el riesgo tanto de abortos como de muerte fetal y prolongar las temporadas de parto (Ong et al. 2021). Existen múltiples estudios que muestran que la composición de la microbiota vaginal y sus variaciones tienen grandes implicancias en la salud, tanto en bovinos (Quereda et al. 2020), como en diversas especies de mamíferos (Miller et al. 2017, Yang et al. 2017; Mahalingam et al. 2019). En este sentido, en humanos, las investigaciones son numerosas, y muestran que la microbiota vaginal de mujeres sanas es dinámica y sufre cambios en la composición a lo largo del tiempo. Además, está asociada a varios factores y juega un papel importante en la salud de la madre y del neonato (Aagaard et al. 2012; Brotman, 2011; Cho y Blaser, 2012; Liu et al. 2013; Ma et al. 2012; MacIntyre et al. 2015; Ravel et al. 2011). En bovinos, estudios basados en métodos de cultivo han logrado identificar que la microbiota vaginal de animales sanos está conformada principalmente por enterobacterias (Dohmen et al. 1995; Otero et al. 2000), al contrario de lo que ocurre en humanos donde predominan los lactobacilos (MacIntyre et al. 2015). En los últimos años se han aumentado los esfuerzos en desarrollar estudios independientes de cultivo basados en técnicas de metagenómica (Ong

et al. 2021). La metagenómica es una herramienta que ha ganado un creciente interés, con diversidad de enfoques ecológicos, biotecnológicos y sanitarios. El análisis de la diversidad de una comunidad bacteriana a nivel taxonómico puede brindar información de su capacidad funcional, basadas en los conocimientos de la fisiología de microorganismos cultivables cercanamente emparentados, ya que ambas características están estrechamente relacionadas (Langille et al. 2013). Mediante la secuenciación masiva de amplicones del gen ribosomal 16S presente en bacterias y arqueas y su posterior análisis con herramientas informáticas desarrolladas recientemente es posible obtener este tipo de información (Breitwieser y Salzberg 2016; Luo et al. 2015). Este enfoque ha sido utilizado para caracterizar la diversidad de la microbiota en tracto reproductor de bovinos sanos (Machado et al. 2012) y ha revelado una baja concentración de lactobacilos (Swartz et al. 2014). Más recientemente se han observado grandes similitudes en la microbiota vaginal bovina entre diferentes razas (Laguardia-Nascimento et al. 2015; Giannattasio-Ferraz et al. 2019) y diferencias significativas en la diversidad de la microbiota entre las distintas etapas de gestación (Deng et al. 2019; Calleros et al. 2024). Si bien ésta es una herramienta útil para obtener datos de la riqueza y abundancia de la microbiota, las herramientas metagenómicas basadas en la secuenciación masiva del ADN total (del inglés Whole-Metagenome Shotgun Sequencing) de la muestra, proporcionan, además, información sobre perfiles funcionales del microbioma, su capacidad metabólica y sus posibles relaciones con el hospedero. Estos abordajes están siendo utilizados con mayor frecuencia en los últimos años debido al avance de los métodos de secuenciación y al desarrollo de estrategias y protocolos (pipelines) que han permitido el análisis de microbiomas complejos (Quince et al. 2017; Feehily et al. 2020; Marotz et al. 2018; Delgado et al. 2019). Estos enfoques metagenómicos en el tracto reproductivo de bovinos están en sus comienzos (Bicalho et al. 2017a; Bicalho et al. 2017b; Ong et al. 2021). Los resultados recientes muestran un aumento en la abundancia de Fusobacteria y Bacteroidetes en vacas con metritis y descarga vaginal purulenta en comparación con animales sanos, confirmando el potencial patológico de estos dos géneros, además de diferencias significativas en la expresión de genes involucrados en la invasión bacteriana (Bicalho et al. 2017a; Bicalho et al. 2017b). Esto concuerda con otro estudio más reciente en el cual se afirma que un desequilibrio de la composición de la microbiota en el tracto reproductor de bovinos sanos puede estar relacionada a enfermedades y problemas reproductivos (Quereda et al. 2020). Estos autores aseguran que realizar estudios para conocer la diversidad taxonómica y funcional de la microbiota vaginal en vacas sanas, durante el ciclo estral, es importante para comparar luego estos resultados con los de animales no sanos revelando posibles biomarcadores de enfermedades. Además es importante para revelar si existe una relación entre la composición microbiana vaginal de animales sanos y las tasas de fertilidad, descubriéndose posibles biomarcadores de reproducción (Quereda et al. 2020). En el estudio longitudinal llevado a cabo por nuestro grupo de investigación, se encontró que la microbiota cervico-vaginal de vaquillonas sanas permanece estable durante la preñez, con cambios temporales exhibidos por los taxones menos abundantes (Calleros et al. 2024). El objetivo del presente trabajo fue realizar un análisis metagenómico por secuenciación del ADN total (shotgun) de la microbiota de la región cervical del tracto reproductor de bovinos sin síntomas de problemas reproductivos, al momento del estro, en la inseminación artificial, en casos de preñez y no preñez y de su posible correlación estadística con el posterior éxito de la inseminación artificial. Este trabajo representó el primer estudio de este tipo en nuestro país, centrado en el tema de la reproducción bovina. La información generada complementa la obtenida en nuestro proyecto anterior (FCE_1_2019_1_155852) para aportar mayores detalles sobre la variabilidad taxonómica y funcional de la microbiota cervico-vaginal de vacas en el contexto de Una Salud.

Metodología/Diseño del estudio

Muestras obtenidas en el marco del proyecto anterior y selección de muestras a analizar

En el marco del proyecto anterior (FCE_1_2019_1_155852), se tomaron muestras de hisopado de la región cervical de la vagina en el tambo de la estación experimental INIA-La Estanzuela, de 48 vaquillonas menores de 2 años de la raza Holando que no manifestaban síntomas de enfermedades del tracto reproductivo. La región cervical de la vagina está en contacto con el cérvix uterino, que sufre cambios durante el ciclo estral de la vaca ya que durante el diestro el cérvix permanece cerrado y durante el estro se abre, secretando moco. Los animales fueron muestreados por veterinarios especializados, mediante hisopado en el momento de la inseminación durante el estro, y a lo largo del ciclo reproductivo. Se realizaron extracciones de ADN que fueron conservadas a -80 °C en el stock de nuestro laboratorio. Mediante la amplificación por PCR y secuenciación del fragmento V1-V2 del gen 16S de bacterias y arqueas presentes en las muestras se llevó a cabo un estudio longitudinal de la microbiota de 13 vaquillonas a lo largo de la preñez hasta el posparto (Calleros et al. 2024) y un estudio de la microbiota de 42 vaquillonas al momento de la inseminación artificial, durante el estro (Barcellos et al. 2025, artículo en revisión). Basándonos en estos trabajos, nuestro próximo desafío fue realizar un estudio más profundo en las muestras obtenidas con un enfoque de secuenciación por shotgun. En base a la bibliografía consultada en cuanto a la cantidad muestral (Bicalho et al. 2017a; Bicalho et al. 2017b; Ong et al. 2021) y al presupuesto asignado, se seleccionaron 26 de 42 extracciones de ADN realizadas al momento de la inseminación artificial, de las cuales 13 pertenecían a vaquillonas que luego resultaron preñadas y 13 del grupo que no se preñaron. Para ello se contó con los datos del manejo reproductivo de los individuos muestreados así como los controles de patógenos asociados a enfermedades reproductivas y otros manejos que se realizan en el tambo experimental registrados en software DairyPlan C21 (GEA Herd Management Software, GEA Farm Technologies, Bönen, Germany).

Generación de bibliotecas y secuenciación del ADN total por shotgun

Las extracciones ya cuantificadas fueron normalizadas a una concentración similar y se prepararon y multiplexaron las bibliotecas utilizando los kits Illumina DNA Prep y Nextera DNA CD Indexes según las indicaciones del fabricante (Illumina, USA). Las bibliotecas se cuantificaron en un fluorómetro Qubit 3.0 utilizando el kit Qubit DNA High-Sensitivity kit (Invitrogen, USA). El control de calidad y el largo de las mismas fueron evaluados por electroforesis capilar en el equipo Fragment Analyzer 5200 (Agilent Technologies, USA) utilizando el kit High Sensitivity NGS Fragment Analysis kit. Se normalizaron las bibliotecas y la secuenciación se realizó en el equipo Illumina MiSeq ubicado en la Plataforma Genómica de la Facultad de Ciencias utilizando un kit de reactivos MiSeq Reagent Kit v2 (300-cycles).

Análisis informáticos y estadísticos

Se realizó un análisis preliminar de los datos con el programa Genome Detective (Vilsker et al. 2019), un pipeline bioinformático web que permite la rápida identificación, ensamblaje y clasificación de bacterias o virus, según la opción elegida. Mediante este programa los archivos en formato Fastq (Cock et al. 2010) se filtran por calidad en base al reporte de FastQC (Andrews, 2010), se cortan los primers (trimming) con Trimmomatic (Bolger et al. 2014) y luego se continúa con la comparación con base de datos para identificar y clasificar bacterias. En este estudio preliminar se realizó el análisis de la microbiota bacteriana presente en 6 de las muestras. Luego se utilizó la herramienta compare para comparar la composición de las muestras entre sí obteniéndose un gráfico de burbujas.

Resultados, análisis y discusión

Se obtuvieron los datos de secuenciación de 24 muestras, 13 de vaquillonas que se preñaron y 11 de

vaquillonas que no se preñaron (Tabla 1). El número total de lecturas (reads) por muestras fue de 8.839.976 - 32.877.190, con una media de 14.070.680 reads por muestra.

Mediante el programa Genome detective (Vilsker et al. 2019), el porcentaje de reads obtenidos en cada muestra luego del filtrado de calidad fue de 98,8 a 99,5%. El porcentaje de reads mapeados a contigs en cada muestra fue de 22,3 a 34,1%. Se identificaron y clasificaron en total 29 especies de bacterias a nivel de especie. Se obtuvo una tabla (Tabla 2) y un gráfico de burbujas (Figura 1) con el conteo de reads por especie por muestra. Se observan diferencias interindividuales, algunos grupos bacterianos están representados en todas muestras analizadas mientras que otros se encuentran en 1 a 5 de las muestras. Ya se habían observado diferencias de este tipo en nuestros trabajos anteriores realizados mediante la secuenciación del fragmento V1-V2 del gen 16S (Calleros et al. 2024; Barcellos et al. 2025, artículo en revisión). Al comparar las muestras pertenecientes al grupo de vaquillonas que se preñaron y las que no se preñaron, no se observa un patrón de diferenciación claro. Este resultado si bien es preliminar, no es llamativo, ya que se observó que la microbiota cérvico-vaginal de las vaquillonas permanecieron constante a lo largo de la preñez con cambios temporales debidos a los taxones menos abundantes (Calleros et al. 2024). Los taxones menos abundantes también fueron responsables de cambios observados en la abundancia diferencial entre los grupos de vaquillonas preñadas y no preñadas al momento de la inseminación artificial (Barcellos et al. 2025, artículo en revisión). Los datos de secuenciación obtenidos en este trabajo deben ser analizados en profundidad para lograr la clasificación taxonómica y funcional de la microbiota. Para lograr este objetivo se pretende llevar a cabo al correr de este año, en el marco de mi doctorado, la realización de una pasantía en el laboratorio del Grupo de Biología de Sistemas Dalmolin, (UFRN), en Natal, Brasil. La finalidad de la pasantía es el entrenamiento en el programa Euryale (Cavalcante et al. 2024), desarrollado por el grupo y con el cual pretendemos seguir analizando los datos. Los datos obtenidos serán valiosos para realizar la clasificación taxonómica y funcional de la microbiota de la región cervico-vaginal de vaquillonas sanas. Será posible luego, realizar la comparación entre los dos grupos de vaquillonas. Igualmente se podrá comparar los resultados con los obtenidos en el proyecto anterior para tratar de encontrar biomarcadores de preñez que aporten información relevante de la salud reproductiva bovina en el contexto de Una Salud.

Conclusiones y recomendaciones

El proyecto fue desarrollado en tiempo y forma y fue exitoso. Se obtuvo una buena profundidad de secuenciación en cada muestra. En el análisis preliminar se observó grandes diferencias interindividuales en cuanto a la composición de la microbiota pero no se encontró un patrón claro de diferenciación entre el grupo de vaquillonas preñadas y no preñadas. Se continuará con el análisis de los datos obtenidos para realizar la clasificación taxonómica y funcional de la microbiota de la región cervico-vaginal de vaquillonas sanas. Los resultados serán comparados con los obtenidos en el proyecto anterior para tratar de encontrar biomarcadores de preñez que aporten información relevante en el contexto de Una Salud.

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Tesis de doctorado	Análisis de la microbiota cérvico-vaginal bovina y su relación con el ciclo reproductivo y la preñez	Maila Barcellos			En proceso

Referencias bibliográficas

Aagaard et al. 2012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036466>.

Andrews, S. 2010. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.

Bicalho et al. 2017a. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12058>.

Bicalho et al. 2017b. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-12061>.

Bolger,A.M. et al. 2014. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.

Breitwieser y Salzberg, 2016. <https://doi.org/10.1101/084715>.

Brotman, RM. 2011. <https://doi.org/10.1172/jci57172>.

Cavalcante et al. 2024. <http://dx.doi.org/10.1109/CIBCB58642.2024.10702116>.

Calleros et al. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2024.105657>.

Cho y Blaser. 2012. <https://doi.org/10.1038/nrg3182>.

Cock et al. 2010. <https://doi.org/10.1093/nar/gkp1137>.

Delgado et al. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36673-w>.

Deng et al. 2019. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0401-2>.

Diskin et al. 2016. <https://doi.org/10.1071/RD15366>.

Dohmen et al. 1995. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00123-P](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00123-P).

Feehily et al. 2020. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00162-8>.

Giannattasio-Ferraz et al. 2019. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00120-3>.

Laguardia-Nascimento et al. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143294>.

Langille et al. 2013. <https://doi.org/10.1038/nbt.2676>.

Liu et al. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079812>.

Luo et al. 2015. <https://doi.org/10.1038/nbt.3319>.

Ma et al. 2012. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092611-150157>.

Machado et al. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.04.033>.

MacIntyre et al. 2015. <https://doi.org/10.1038/srep08988>.

Mahalingam et al. 2019. <https://doi.org/10.1007/s13199-018-00595-y>.

Marotz et al. 2018. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0426-3>.

Miller et al. 2017. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0228-z>.

Mwansa et al. 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0388.2002.00363.x>.

Ong et al. 2021. <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00106-3>.

Otero et al. 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00809.x>.

Quereda et al. 2020. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00371>.

Quince et al. 2017. <https://doi.org/10.1038/nbt.3935>.

Quintans, G. 2013. <https://ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/4849/1/revista-INIA-34.pdf>.

Ravel et al. 2011. <https://doi.org/10.1073/pnas.1002611107>.

Saraswat y Purohit. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.apjr.2016.01.001>.

Swartz et al. 2014. <https://doi.org/10.3389/fvets.2014.00019>.

Vilsker et al. 2019. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty695>.

Yang et al. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.01.003>.

Licenciamiento

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