



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS**

**ESCUELA DE POSGRADO**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR  
EN CIENCIAS PARA EL DESARROLLO SUSTENTABLE CON  
MENCIÓN EN PRODUCCIÓN Y BIENESTAR ANIMAL**

**“CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA UTERINO Y  
TASA DE IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA EN  
BOVINOS”**

**Autor: M.Sc. Nilton Luis Murga Valderrama**

**Asesor: Dr. Rainer Marco López Lapa**

**CHACHAPOYAS – PERÚ**

**2022**

# AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS DE DOCTORADO EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM



# UNTRM

REGLAMENTO GENERAL  
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE  
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

## ANEXO 6-H

### AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS DE MAESTRÍA ( ) / DOCTORADO (X) EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL DE LA UNTRM

#### 1. Datos de autor 1

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): Murga Valderrama Wilton Luis  
DNI N°: 33430926  
Correo electrónico: nmurga.fizab@gmail.com  
Nombre de la Maestría ( ) / Doctorado (X): Ciencias para el Desarrollo Sustentable

#### Datos de autor 2

Apellidos y nombres (tener en cuenta las tildes): \_\_\_\_\_  
DNI N°: \_\_\_\_\_  
Correo electrónico: \_\_\_\_\_  
Nombre de la Maestría ( ) / Doctorado ( ): \_\_\_\_\_

#### 2. Título de la tesis para obtener el grado académico de Maestro ( ) / Doctor (X)

Caracterización del microbioma uterino y tasa de implantación embrionaria en bovinos

#### 3. Datos de asesor 1

Apellidos y nombres: Lopez Lapa Rainer Marco  
DNI, Pasaporte, C.E N°: \_\_\_\_\_  
Open Research and Contributor-ORCID ( <https://orcid.org/0000-0002-2379-5138>)

#### Datos de asesor 2

Apellidos y nombres: \_\_\_\_\_  
DNI, Pasaporte, C.E N°: \_\_\_\_\_  
Open Research and Contributor-ORCID \_\_\_\_\_

#### 4. Campo del conocimiento según Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos- OCDE (ejemplo: Ciencias médicas, Ciencias de la Salud-Medicina básica-Immunología)

Ciencias Agrícolas - Ciencias Veterinarias - Ciencias Veterinarias

#### 5. Originalidad del Trabajo

Con la presentación de esta ficha, el( la) autor(a) o autores(as) señalan expresamente que la obra es original, ya que sus contenidos son producto de su directa contribución intelectual. Se reconoce también que todos los datos y las referencias a materiales ya publicados están debidamente identificados con su respectivo crédito e incluidos en las notas bibliográficas y en las citas que se destacan como tal.

#### 6. Autorización de publicación

El(los) titular(es) de los derechos de autor otorga a la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de A mazonas (UNTRM), la autorización para la publicación del documento indicado en el punto 2, bajo la *Licencia creative commons* de tipo BY-NC: Licencia que permite distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial por lo que la Universidad deberá publicar la obra poniéndola en acceso libre en el repositorio institucional de la UNTRM y a su vez en el Registro Nacional de Trabajos de Investigación -RENATI, dejando constancia que el archivo digital que se está entregando, contiene la versión final del documento sustentado y aprobado por el Jurado Evaluador.

Chachapoyas, 21 / diciembre / 2022

  
Firma del autor 1

\_\_\_\_\_  
Firma del autor 2

  
Firma del Asesor 1

\_\_\_\_\_  
Firma del Asesor 2

## **DEDICATORIA**

A mis padres, por su cariño y apoyo en cada decisión que he tomado en la vida.

A Karina, Fabian y Gudy por ser mi fuerza y mi motivo de superación personal y profesional.

Nilton Luis Murga Valderrama

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas, a mis colegas y amigos de la Facultad de Ingeniería Zootecnista, Agronegocios y Biotecnología, Instituto de Investigación en Ganadería y Biotecnología, e Instituto de Investigación en Negocios Agropecuarios.

Nilton Luis Murga Valderrama

**AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ  
DE MENDOZA DE AMAZONAS**

Jorge Luis Maicelo Quintana, Ph.D.

**Rector**

Dr. Oscar Andrés Gamarra Torres

**Vicerrector académico**

Dra. María Nelly Luján Espinoza

**Vicerrectora de investigación**

Dr. Efraín Manuelito Castro Alayo

**Director de la escuela de posgrado**

## VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS



# UNTRM

REGLAMENTO GENERAL  
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE  
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

### ANEXO 6-L

#### VISTO BUENO DEL ASESOR DE TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO ( ) / DOCTOR (X)

El que suscribe el presente, docente de la UNTRM (X)/Profesional externo ( ), hace constar que ha asesorado la realización de la Tesis titulada CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA UTERINO Y TASA DE IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA EN BOVINOS

cuyo autor M.Sc. NILTON LUIS MURGA VALDERRAMA es estudiante del \_\_\_\_\_ ciclo/egresado (X) de la Escuela de Posgrado, Maestría ( ) / Doctorado (X) en CIENCIAS PARA EL DESARROLLO SOSTENTABLE con correo electrónico institucional nmurga.fizab@untrm.edu.pe

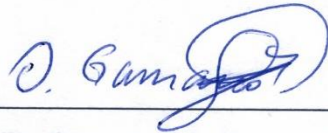


El suscrito da el Visto Bueno a la Tesis mencionada, dándole pase para que sea sometida a la revisión por el Jurado Evaluador, comprometiéndose a supervisar el levantamiento de observaciones que formulen en Acta en conjunto, y estar presente en la sustentación.

Chachapoyas, 25 de noviembre de 2022

Firma y nombre completo del Asesor  
Ph.D. Rainer Marco López Lapa

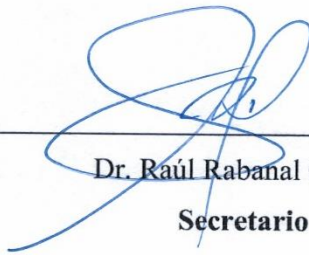
## JURADO EVALUADOR



---

Dr. Oscar Andrés Gamarra Torres

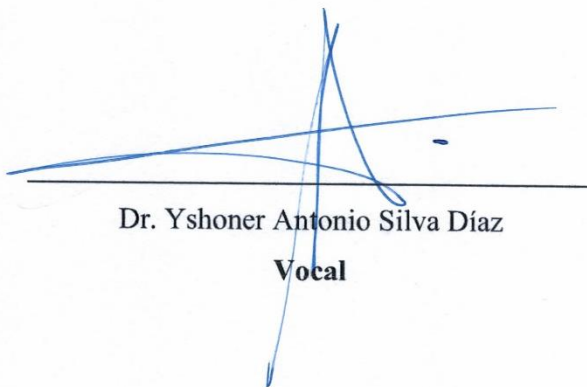
**Presidente**



---

Dr. Raúl Rabanal Oyarce

**Secretario**



---

Dr. Yshoner Antonio Silva Díaz

**Vocal**

# CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS



## ANEXO 6-Q

### CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO ( ) / DOCTOR ( )

Los suscritos, miembros del Jurado Evaluador de la Tesis titulada:

CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA UTERINO Y SU RELACIÓN CON LA TASA DE IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA EN BOVINOS

presentada por el estudiante ( )/egresado (x) Nilton Luis Murga Valderrama de la Escuela de Posgrado, Maestría ( ) / Doctorado (x) en CIENCIAS PARA EL DESARROLLO SOSTENTABLE - MENCION EN PRODUCCIÓN Y BIENESTAR ANIMAL con correo electrónico institucional nmurga.fizab@untrm.edu.pe

después de revisar con el software Turnitin el contenido de la citada Tesis, acordamos:

- a) La citada Tesis tiene 8 % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es menor (x) / igual ( ) al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM.
- b) La citada Tesis tiene — % de similitud, según el reporte del software Turnitin que se adjunta a la presente, el que es mayor al 25% de similitud que es el máximo permitido en la UNTRM, por lo que el aspirante debe revisar su Tesis para corregir la redacción de acuerdo al Informe Turnitin que se adjunta a la presente. Debe presentar al Presidente del Jurado Evaluador su Tesis corregida para nueva revisión con el software Turnitin.



Chachapoyas, 15 de noviembre del 2022

[Signature]  
SECRETARIO

[Signature]  
VOCAL

[Signature]  
PRESIDENTE

OBSERVACIONES:

.....  
.....



# ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN



# UNTRM

REGLAMENTO GENERAL  
PARA EL OTORGAMIENTO DEL GRADO ACADÉMICO DE  
BACHILLER, MAESTRO O DOCTOR Y DEL TÍTULO PROFESIONAL

## ANEXO 6-S

### ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO ( ) / DOCTOR (X)

En la ciudad de Chachapoyas, el día 25 de noviembre del año 2022, siendo las 10:25 horas, el aspirante Nilton Luis Murga Valderrama, Asesorado por Dr. Rainer Marco López Lqpa defiende en sesión pública presencial (X) / a distancia ( ) la Tesis titulada: Caracterización del microbioma uterino y su relación con la tasa de implantación embrionaria en bovinos, para obtener el Grado Académico de Maestro ( ) / Doctor (X) en Ciencias para el desarrollo sustentable, a ser otorgado por la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza de Amazonas; ante el Jurado Evaluador, conformado por:

Presidente: Oscar Andrés Gamarra Torre

Secretario: Raúl Rabanal Dy arce

Vocal: Yshener Antonio Silva Diaz

Procedió el aspirante a hacer la exposición de la Introducción, Material y método, Resultados, Discusión y Conclusiones, haciendo especial mención de sus aportaciones originales. Terminada la defensa de la Tesis presentada, los miembros del Jurado Evaluador pasaron a exponer su opinión sobre la misma, formulando cuantas cuestiones y objeciones consideraron oportunas, las cuales fueron contestadas por el aspirante.

Tras la intervención de los miembros del Jurado Evaluador y las oportunas respuestas del aspirante, el Presidente abre un turno de intervenciones para los presentes en el acto de sustentación, para que formulen las cuestiones u objeciones que consideren pertinentes.

Seguidamente, a puerta cerrada, el Jurado Evaluador determinó la calificación global concedida a la sustentación de la Tesis de Maestría ( ) / Doctorado (X), en términos de:

A probado (X) por Unanimidad (X) / Mayoría ( ) Desaprobado ( )

Otorgada la calificación, el Secretario del Jurado Evaluador lee la presente Acta en esta misma sesión pública. A continuación se levanta la sesión.

Siendo las 12:03 horas del mismo día y fecha, el Jurado Evaluador concluye el acto de sustentación de la Tesis para obtener el Grado Académico de Maestro ( ) / Doctor (X).

SECRETARIO

PRESIDENTE

VOCAL

OBSERVACIONES:

Previo al análisis y en función al informe y sustentación se sugiere mejorar el título: Caracterización del microbioma uterino y tasa de implantación embrionaria en bovinos.

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO .....	iv
AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL TORIBIO RODRÍGUEZ DE MENDOZA DE AMAZONAS .....	v
VISTO BUENO DEL ASESOR DE LA TESIS .....	vi
JURADO EVALUADOR .....	vii
CONSTANCIA DE ORIGINALIDAD DE LA TESIS .....	viii
ACTA DE EVALUACIÓN DE SUSTENTACIÓN.....	ix
ÍNDICE GENERAL .....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT .....	xv
I. INTRODUCCIÓN .....	16
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
2.1. Selección de animales.....	32
2.2. Método de extracción de microbioma (CITOBUSH).....	35
2.3. Extracción de ADN genómico de las muestras de mucosa uterina bovina .....	39
2.4. Cuantificación de ADN genómico.....	41
2.5. Amplificación por PCR convencional del gen 16S .....	42
2.6. Electroforesis de ADN en gel de agarosa .....	43
2.7. Purificación de ADN genómico de mucosa uterina bovina .....	44
2.8. Secado de ADN genómico de mucosa uterina bovina .....	45
2.9. Diagnóstico de preñez .....	46
2.10. Análisis de datos bioinformáticos .....	46
III. RESULTADOS.....	47
IV. DISCUSIÓN .....	56
V. CONCLUSIONES.....	58
VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	59
VII. ANEXOS.....	75

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información sobre el lugar de muestreo, raza, número de partos, códigos de muestras realizadas, tipo de embrión transferido y estado de preñez de los individuos incorporados al análisis molecular.....	33
Tabla 2 Reactivos utilizados en la elaboración del Master Mix. ....	42
Tabla 3 Parámetros considerados en una corrida de PCR. ....	43
Tabla 4 Orden de Siembra en Gel de Agarosa.....	44
Tabla 5 Parámetros de cuantificación de ADN extraído de mucosa de dos segmentos uterinos.....	47
Tabla 6 Eficiencia de extracción de ADN (20 ng/ul) respecto a la concentración y parámetros de pureza (A260/268 entre 1.8 y 2.0) de muestras de microbioma de dos segmentos uterinos.....	48
Tabla 7 Información sobre el lugar de muestreo, raza, número de partos, códigos de muestras realizadas, tipo de embrión transferido y estado de preñez de los individuos incorporados al análisis molecular.....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flujograma de trabajo de las actividades desarrolladas para el cumplimiento de los objetivos de la tesis. ....	34
Figura 2 Brete de inmovilización.....	36
Figura 3 Aplicación de endovenosa (E.V./ yugular) .....	36
Figura 4 Limpieza externa de la vulva del animal.....	37
Figura 5 Recolección de muestra de mucosa uterina con citocepillo .....	37
Figura 6 Ingreso del citocepillo hacia el útero.....	38
Figura 7 Guardado y transporte de las muestras de mucosa.....	38
Figura 8 Composición bacteriana por phylums de muestras de mucosa uterina a partir del secuenciamiento de la región V3-V4 del gen 16S rARN evidenciados a partir de Qiime2.com.....	49
Figura 9 Abundancia relativa total de la composición bacteriana por phylum de muestras de mucosa uterina a partir del secuenciamiento de la región V3-V4 del gen 16s ARNr. ....	50
Figura 10 Abundancia relativa de la composición bacteriana por Phylums de muestras de mucosa uterina. Agrupación según segmento de colecta (mucosa del cuerpo uterino: “U” y mitad craneal del cuerno uterino: “C”), Firmicutes, con 2.5% y 1.0% de abundancia de CU.....	51
Figura 11 Abundancia relativa de la composición bacteriana por phylums de muestras de mucosa uterina. Agrupación según estado de preñez (no preñada: “N”, preñada: “Y” y control “C”).....	51
Figura 12 Composición bacteriana por géneros de muestras de mucosa uterina a partir del secuenciamiento de la región V3-V4 del gen 16S rARN evidenciados a partir de Qiime2.com.....	53
Figura 13 Abundancia relativa de la composición bacteriana por género de muestras de mucosa uterina. Agrupación según segmento de colecta (mucosa del cuerpo uterino: “U” y mitad craneal del cuerno uterino: “C”). ....	54
Figura 14 Abundancia relativa de la composición bacteriana por género de muestras de mucosa uterina. Agrupación según estado de preñez (no preñada: “N”, preñada: “Y” y control “C”).....	54

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ET: Transferencia de embriones

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

ITS: Espaciador transcrito interno

ARN: Ácido ribonucleico

ADN: Ácido desoxirribonucleico

NGS: Secuenciación de nueva generación

IA: Inseminación Artificial

PBS: Solución Buffer Fosfatada

## RESUMEN

El útero es una estructura que por mucho tiempo se ha pensado que era libre de microorganismos esto debido a los pocos estudios que existían de este órgano. Actualmente se han desarrollado metodologías para la obtención de la mucosa uterina y secuenciamiento genómico que permitan conocer la población de microbiota existente y su relación con la fertilidad (preñez, aborto, infecciones y enfermedades). En este estudio se evaluó la caracterización del microbioma uterino y su relación con la tasa de implantación embrionaria en bovinos. Se seleccionó mediante evaluación ginecológica, corporal y sanitaria a 53 bovinos posibles receptoras de embrión, a los que 20 días antes de iniciar el protocolo de sincronización se les realizó un raspado uterino en dos segmentos específicos (cuerpo uterino y mitad craneal del cuerno uterino), posteriormente se extrajo ADN genómico de las muestras obtenidas y se realizó la amplificación por PCR convencional del gen 16S. Iniciado el protocolo de sincronización de celo se transfirió los embriones solo a las bovinos con cuerpo lúteo >16mm para realizar el diagnóstico de gestación a los 28 a 30 días. Se logró obtener ADN de buena calidad y pureza de 24 animales donde el mayor porcentaje pertenece a bovinos con mayor número de partos, al evaluar la composición de microbiota se evidenció diferencias entre individuos y agrupamientos realizados (razas, segmento, número de partos e individuo), encontrando dominancia del phylum Proteobacteria y Bacteroidetes. En conclusión, existe relación entre la presencia de los géneros Chryseobacterium, Pedobacter, Pseudomonas y Sphingobacterium en el cuerpo uterino; y Chryseobacterium, Pedobacter, Psychrobacter y Paeniglutamicibacter en mitad craneal del cuerno uterino con el éxito de preñez en bovinos sincronizadas.

**Palabras clave:** cuerpo uterino, ganado bovino, cuerno uterino, phylum, géneros.

## **ABSTRACT**

The uterus is a structure that has long been thought to be free of microorganisms due to the few studies that existed of this organ. Currently, methodologies have been developed to obtain the uterine mucosa and genomic sequencing that allow knowing the existing microbiota population and its relationship with fertility (pregnancy, abortion, infections, diseases). In this study, the characterization of the uterine microbiome and its relationship with the embryo implantation rate in cattle were evaluated. Fifty-three possible embryo recipient cows were selected by gynecological, body and health evaluation, and 20 days before starting the synchronization protocol, a uterine curettage was performed in two specific segments (uterine body and cranial half of the uterine horn). Subsequently, genomic DNA was extracted from the samples obtained and conventional PCR amplification of the 16S gene was performed. Once the estrus synchronization protocol was started, the embryos were transferred only to the cows with a corpus luteum >16mm to perform the pregnancy diagnosis at 28 to 30 days. It was possible to obtain DNA of good quality and purity from 24 animals where the highest percentage belongs to cows with a higher number of births. When evaluating the composition of the microbiota, differences between individuals and groupings (breeds, segment, number of births and individual) were evidenced, finding dominance of the phylum Proteobacteria and Bacteroidetes. In conclusion, there is a relationship between the presence of the genera *Chryseobacterium*, *Pedobacter*, *Pseudomonas* and *Sphingobacterium* in the uterine body; and *Chryseobacterium*, *Pedobacter*, *Psychrobacter* and *Paeniglutamicibacter* in the cranial half of the uterine horn with successful pregnancy in synchronized cows.

**Keywords:** uterine body, cattle, uterine horn, phylum, genera.

## I. INTRODUCCIÓN

### **Transferencia de embriones**

La primera especie en la cual se pudo transferir un embrión en una hembra cíclica fue en los conejos en el año 1891; sin embargo, la inducción y eficiencia para su uso en bovinos recién pudo observarse en el año 1970 (Betteridge, 2003). La técnica de transferencia de embriones (ET) ha permitido conocer a fondo las bases científicas de la biología reproductiva como herramienta para el mejoramiento genético mediante biotecnologías reproductivas, específicamente en la producción de embriones *in vivo* e *in vitro*, clonación, transgénesis, etc (Hansen, 2020).

La transferencia de embriones ha permitido a nivel mundial aumentar el número de crías nacidas de alto valor genético, mejorando la productividad de pequeños, medianos y grandes ganaderos; por lo que estas madres receptoras cumplen un papel fundamental en los programas de mejoramiento genético siendo responsables de recepcionar un embrión y mantener una preñez a término (Martínez et al, 2021).

### **¿Qué es el microbioma?**

Las comunidades microbianas tienen la característica de prosperar en diversos ambientes, incluyendo dentro y sobre las superficies corporales, destacando así la importancia de la relación hospedero-microbioma en la modulación del desarrollo, digestión, contribución de la inmunidad del hospedero, entre otros (Parfrey et al., 2018). Las comunidades microbianas poseen diversas características como diversidad, complejidad, cooperación, competencia, interacción entre otras (Costello et al., 2009). Se denomina comunidad microbioma a los microorganismos que habitan en un microbioma específico; mientras que el contenido genético de los microorganismos en conjunto se denomina microbioma (Janssens et al., 2018). Se considera que el microbioma se refiere a una variedad de microorganismos que habitan pacíficamente, y que las perturbaciones de estas poblaciones naturales pueden conducir a un efecto perjudicial de la salud del hospedero (Knight et al., 2017).

La caracterización de la diversidad del microbioma se asocia a un amplio rango de hospederos, esto permite dilucidar las funciones esenciales desarrolladas por los microbios en los hospederos (Neckovic et al., 2019), desentrañando su influencia en la



salud, fisiología, desarrollo y comportamiento del propio hospedero (Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2016). Kolodny & Schulenburg (2020) describieron que el microbioma puede considerarse como una fuente de plasticidad fenotípica adaptativa, es decir, que los hospederos tienen la capacidad de adaptarse y modificar su microbioma ante cualquier desafío ambiental. La composición del microbioma tiende a estar influenciado por diversos factores como la alimentación, antibióticos, entre otros (Martí et al., 2017), y es conocido que los estados de salud o enfermedad están directamente relacionados al microbioma.

Caporaso et al., (2011) describieron factores como la genética, epigenética, e incluso condiciones geográficas afecta de manera directa o indirecta al desarrollo y diversidad de la población microbiana (Lee et al., 2014). Moeller & Sanders (2020) señalan cómo los efectos del microbioma han dado forma, y siguen modulando la evolución de los mamíferos.

Debido a los avances en las tecnologías de secuenciación y los métodos analíticos, se han obtenido resultados sustanciales en la identificación de taxones microbianos, así como una mejor comprensión de la relación entre la composición del microbioma y el fenotipo del huésped (Kolodny et al., 2020). Los avances de estas nuevas estrategias de identificación del microbioma están conduciendo a novedosas técnicas para mejorar la salud humana y animal, mejorar el rendimiento de los cultivos y la calidad nutricional, y el control de diversas plagas y agentes de enfermedades (Appiah et al., 2020).

El microbioma tiene mayor ubicación en el intestino, dónde el número y la complejidad aumentan desde el estómago hasta el colon (Caporaso et al., 2011). También se reportó la presencia de microbioma en otros sitios anatómicos, como los pulmones, piel, ojos, placenta, oído, cavidad oral entre otros, además varía entre individuos e incluso a lo largo del tiempo (Janssens et al., 2018).

Debido a la importancia del conocimiento sobre la evolución y adaptación del microbioma en la naturaleza de los hospederos, se ha descrito y desarrollado técnicas de caracterización con bastante énfasis para describir aquellas presentes en la piel (Ross et al., 2019; Boxberger et al., 2021), boca (Davis, 2016), ciegos (Turner, 2018), entre otros

que explican el dinamismo de las comunidades microbianas como parte de los cambios en la salud de los hospederos. Sin embargo, existe poca literatura disponible sobre la caracterización del microbioma de los sistemas reproductores, pese a los esfuerzos actuales en la comprensión de los roles de los microorganismos y los dinanismos en los tejidos reproductivos, en particular del tracto reproductivo femenino (Chen et al., 2017a; Schoenmakers et al., 2019).

### **El desarrollo de la metagenómica en la caracterización de microbiomas.**

El desarrollo de métodos moleculares independientes de cultivo celular tales como la secuenciación de genomas completos o parciales permiten caracterizar aquellas especies bacterianas que no crecen con técnicas de cultivo clásico. De hecho, con el avance las técnicas de secuenciamiento de nueva generación (NGS) en la última década ha permitió estudiar los genomas microbianos constituyentes de diferentes fuentes (Liu et al., 2021).

La metagenómica es una herramienta molecular que nos permite investigar la composición de una comunidad microbiana y la identificación de taxones, ya sea mediante fragmentos específicos del genoma o por el genoma completo (Aguiar-Pulido et al., 2016). A diferencia de los estudios genómicos, dónde se estudia el material genético de un organismo específico, la metagenómica (“meta” que significa “más allá”) se refiere a los estudios del material genético de comunidades enteras de microorganismos provenientes de una sola muestra, proporcionando una vista más amplia en términos de taxonomía y funcionamiento potencial (Greninger, 2018). Este proceso implica la secuenciación después de que se extrae el ADN de muestras. El secuenciamiento genera un gran volumen de datos en forma de lecturas cortas, de las cuales se puede construir un perfil microbiano, como si se armara el cuadro completo con las piezas de un rompecabezas (Aguiar-Pulido et al., 2016).

El análisis de estos se puede hacer mediante la secuenciación completa del genoma de todos los microorganismos presentes en una muestra, por otro lado, como alternativa, se puede realizar inferencias mediante la secuenciación de fragmentos pequeños y/o amplicones de PCR, como el gen de ARN ribosomal 16S (restringido para bacterias y arqueas) (Jovel et al., 2016), o las regiones génicas ITS (espaciador transcrito interno)

(Greninger, 2018). Existe una discusión actual sobre el uso de terminologías, algunos investigadores argumentan la idea de hacer de una distinción “metagenómica”, utilizada para describir un enfoque genómico amplio e integral para el perfil de microbiomas, y “metataxonómica”, que usa amplicones de un gen marcador objetivo para hacer inferencias taxonómicas (Aguiar-Pulido et al., 2016).

Existen bases de datos especializados en genomas de referencia, los cuales se usan para construir perfiles taxonómicos e inferir las funcionalidades potenciales de una comunidad microbiana (Nelson et al., 2010); por otro lado, existe una gran cantidad de bases de datos para amplicones como el gen del 16S que ayudan en la clasificación y construcción de perfiles taxonómicos de un microbioma (Cole et al., 2014) y actualmente con un enfoque diagnóstico (Greninger, 2018).

### **Microbioma del tracto reproductor de la hembra**

Inicialmente, se creía que el tracto reproductivo de la hembra era un órgano libre de microorganismos (Schoenmakers et al., 2019). Utilizando tecnologías dependientes de cultivo demostraron la presencia de bacterias en los tejidos reproductivos, sin embargo estas solo limitan el crecimiento de ciertas especies bacterianas (Galvão et al., 2019). La relación ganado-microorganismo es de fundamental importancia para el control de enfermedades, uso sostenible y toma de decisiones. Los métodos de detección de comunidades microbianas basados en técnicas convencionales dependientes del cultivo han demostrado ser insuficientes para un análisis de mayor profundidad (Wani et al., 2022).

La metagenómica también conocida como “ecogenómica”, implica el estudio del material genético obtenido de muestras, brindando la opción de caracterizar los microorganismos previamente desconocidos que habitan diferentes entornos, incluido el entorno biológico de los animales domésticos (Berini et al., 2017). La metatranscriptómica, una técnica que estudia la expresión de genes de microorganismos en entornos naturales, proporciona más información sobre el papel funcional de los microorganismos dentro de los hospederos, a través de la caracterización de perfiles de expresión génica y sus cambios frente a variaciones en la salud del hospedero (Aguiar-Pulido et al., 2016).

Por lo tanto, el objetivo de la metagenómica es dilucidar el contenido genómico y la identificación de la microbioma completo de un microbioma particular, en cambio que la metatranscriptómica se enfoca en los genes activos presentes en dichas comunidades microbianas, los cuales pueden sentar las bases en el conocimiento sobre las interacciones microbioma-individuo, más aún, para descifrar el microbioma de aquellas regiones del cuerpo que no han sido descritas completamente hasta el momento, como el tracto reproductor femenino (Wani et al., 2022).

El microbioma del aparato reproductor es una red de comunidades interconectadas de constante intercambio (Schoenmakers et al., 2019), lo que significa que a los tejidos reproductores femeninos pueden ingresar otros microorganismos por vías anatómicas alternativas como el transporte desde la vagina, transferencia desde material fecal y piel hacia el tracto genital (Chen et al., 2017a; Moreno & Simon, 2019), y mediante vías hematógenas (Neckovic et al., 2019).

### **Microbioma de especies ganaderas caracterizado mediante metagenómica**

En los últimos años, fue creciendo el interés de conocer la interrelación del microbioma del tracto reproductivo con respecto a la salud y desarrollo de enfermedades en los hospederos. Este nuevo campo de estudio de evolución rápida busca desentrañar las influencias significativas a los cambios en las comunidades bacterianas en la biología del huésped, debido a que, se posee poca información sobre la composición del microbioma en especies ganaderas, tales como bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, etc. (Suttner et al., 2020). Actualmente, existe una atracción en la caracterización del microbioma en los diferentes tejidos reproductivos de especies ganaderas, con la finalidad de relacionar esta con enfermedades y fertilidad en especies de interés económico como el ganado lechero (Gilbert, 2019). La información dedicada a la evolución y adaptación del microbioma en el tracto reproductivo, particularmente de los aparatos reproductores femeninos, es escasa, principalmente por las limitaciones de las caracterizaciones basadas en técnicas de cultivo *in vitro* (Rosenberg & Zilber-Rosenberg, 2016). Aunque se reportaron avances de estudios de secuenciación de ADN que confirman la presencia de comunidades microbianas dinámicas en el tracto reproductivo en humanos, primates (Yildirim et al.,

2014) y especies ganaderas (Appiah et al., 2020), lo cual refuta la prístina idea de la esterilidad del tracto reproductor femenino, aún existe un óbice en la disponibilidad de información en especies veterinarias.

Se plantea que no existe un microbioma base entre especies, ya que en un intento por entender la evolución del microbioma en especies con similitudes fisiológicas (primates y humanos) se descubrió una gran diferencia en el microbioma presente en cada una de las especies analizadas, pues un microbioma normal presentes en algunas especies de primates, resulta ser un estado patológico en humanos (Deng et al., 2019). Un ejemplo claro, es la baja abundancia de *Lactobacillus* en especies como el chimpancé, el más cercano evolutivamente al humano, a diferencia de una alta abundancia de este género en las poblaciones microbianas de humanos (Yildirim et al., 2014).

En especies ovinas, Shallali et al. (2001) realizaron la identificación de especies bacterianas mediante cultivo en medios selectivos, entre estas especies se asoció a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. y *Listeria* spp. con casos de aborto y/o fallos al momento de la concepción; Zaid (2009) describió la abundancia relativa presente en ovejas en diferentes estados reproductivos, estas estaban distribuidas de la siguiente manera: 29,6% *Enterobacter* spp., 18,5% *Escherichia coli*, 14,8 % *Lactobacillus* spp, 11,1 % *Proteus mirabilis*, 7,4 % para *Klebsilla pneumoniae*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella dublin* y 3,8% *Estaphylumcoco aureus*, concluyendo que la abundancia de estas varía según estado reproductivo. Por otro lado, Yaseen et al. (2019) identificaron la flora bacteriana de ovejas sanas, *E. coli*, *Streptococcus* spp, *Klebsiella* spp y *Staphylococcus aureus* fueron los microorganismos más abundantes con 36%, 20%, 17,5% y 16,3% respectivamente. Mientras que *Bacillus* spp., *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. y *Salmonella* spp. fueron los géneros bacterianos con menor abundancia.

Sin embargo, la limitación en la identificación del microbioma mediante técnicas dependientes de cultivo incluye una desestimación en la diversidad de especies. Swartz et al. (2014), estipula que el microbioma vaginal de las ovejas está dominado por especies de *Aggregatibacter* spp., *Streptobacillus* spp., *Cronobacter* spp., *Phocoenobacter* spp. y *Psychrilyobacter* spp. La especie *Aggregatibacter* spp. ha sido asociada a enfermedades

peridontales, endocarditis infecciosa y abscesos cerebrales, y no reportado como miembro común de las comunidades bacterianas vaginales en humanos (Gonzales-Marin et al., 2011). Además, la baja abundancia de *Lactobacillus* spp. otorga un pH entre 7,0 a 7,6 en las vaginas de ovejas, los cuales se asemejan a cuadros de vaginosis bacteriana en mujeres humanas (Ravel et al., 2011; Swartz et al., 2014).

Serrano et al. (2020) describieron la influencia del microbioma del tracto reproductor femenino en el éxito de la inseminación artificial a través de secuenciación del gen 16S ARNr y análisis metagenómico. Sus resultados concluyeron que existen diferencias en la abundancia de microorganismos entre ovejas gestantes y no gestantes luego del proceso de inseminación. Además, la presencia de los géneros *Histophilus*, *Actinobacillus* y *Sneathia* se encontraron en menor medida (menos abundancia) en ovejas preñadas, lo cual se asocia la presencia de estos géneros con un mayor fracaso en la inseminación artificial y fertilidad.

En otras especies se reporta un patrón diferente. Por ejemplo, se describió que en caballos la abundancia de *Lactobacillus* fue menor al 2 %, esto detectado mediante cultivo y análisis metagenómico, lo cual indica que el microbioma vaginal equina no estuvo dominada por estas bacterias, sino por otras bacterias dominantes que incluyen los géneros *Pophyromonas*, *Campylobacter* entre otros, sin reportar cambio alguno durante todo el ciclo ovárico (Barba et al., 2020). En el caso de porcinos, se reportó que los géneros *Fusobacterium* y *Parvimonas* son los más dominantes en muestras de mucosa vaginal, seguido de *Streptococcus*, *Moraxella* y *Actinobacillus*, las cuales también son géneros dominantes en el microbioma bucal de porcinos. Además, se identificaron otros 16 géneros únicos en muestras de mucosa vaginal porcina en comparación con otras muestras como saliva y heces (Murase et al., 2019).

Microbioma del tracto reproductor en bovino caracterizado mediante metagenómica

En los últimos años, la investigación de microbiomas pasó de un enfoque individual *in vitro* a un punto de vista más ecológico, debido a la búsqueda del conocimiento de cómo estos organismos interactúan dentro y entre especies en los microbiomas definidos (Yeoman et al., 2018). Técnicas moleculares modernas de secuenciación de metagenómica están expandiendo la comprensión del microbioma en diferentes

microbiomas, tales como piel, ciego intestinal, boca, entre otros. Específicamente, la caracterización del microbioma del tracto reproductivo de especies ganaderas, tales como el ganado bovino lechero, permite describir la composición de bacterias causantes de alguna enfermedad (Piersanti & Bromfield, 2019). Se reporta que el sistema reproductivo bovino posee un complejo dinamismo del microbioma, el cual varía según el microbioma del tracto reproductivo, es decir, las comunidades microbianas difieren según la ubicación, tales como microflora vaginal, microflora cervical, microflora uterina, así como, difieren entre razas de ganados, ubicación geográfica, estadía del ciclo estral, estado de salud y entre otras características (Galvão et al., 2019). Comprender el rol funcional de las comunidades bacterianas y las variaciones a lo largo del tracto reproductivo del ganado bovino lechero resulta esencial para determinar cómo estos factores están relacionados con el éxito reproductivo, para poder enfocar acciones orientados hacia la mejora del estado de salud reproductivo, ya sea con tratamientos con probióticos, antibióticos y bacteriófagos (Appiah et al., 2020).

### ***Microbioma vaginal bovino***

Appiah et al. (2020) reconoce y describe a detalle las diferencias entre la microflora vaginal, cervical y uterina en bovinos. En general, una población microbiana residente en una vagina sana bovina, sin ningún tipo de trastorno reproductivo, se destaca por constituirse de bacterias principalmente de especies anaeróbicas, con un solo fragmento de otros microbios aeróbicos y/o anaerobias facultativas (Otero et al., 2000; Rodrigues et al., 2015). Una característica de este microbioma es el dinamismo de la flora bacteriana pese a las condiciones estables de un individuo sano, impidiendo así la proliferación de organismos patógenos (Otero et al. 2000). *Enterobacteriaceae*, *Victivalles* y *Bacteroides* están presentes en hembras bovinas sanas, estas tienen la capacidad de fermentación directa, los cuales producen compuestos ácidos resultando en un cambio de pH. Esto favorece la habitabilidad de algunas especies bacterianas de *Lactobacillus* y *Fibrobacter* que contribuyen a una microflora vaginal saludable (Rodrigues et al., 2015).

La microflora vaginal bovina se ha ido estimando en base a los efectos de las enfermedades utilizando técnicas dependientes de cultivo (Wang et al., 2016), sin embargo, la aplicación de la metagenómica reveló grupos bacterianos comunes en

diferentes razas, como el ganado Nellore, Hosltein y Fleckvieh. Las especies bacterianas colonizadoras del microbioma vaginal difieren entre estudios, esto debido a que existe una relación entre la variación de las comunidades microbianas y el tipo de dieta, ubicación geográfica, incluso razas. Swartz et al. (2014) describe que el microbioma vaginal de bovinos está dominado por *Aggregatibacter* spp., *Streptobacillus* spp., *Phocoenobacter* spp., *Sediminicola* spp. y *Sporobacter* spp. Entre estas especies, algunas tienen propiedades particulares de adherirse al colágeno presente en el tejido vaginal, lo que explicaría la prevalencia, más aún durante el periodo de gestación (Swartz et al., 2014; Tang et al., 2008).

Gonzalez-Moreno et al., (2016) también caracteriza en bovinos sanas bacterias del phylum *Firmicutes* y *Bacteroides* como *Ruminococcus* spp., *Dialister* spp., *Aeribacillus* spp. Y *Porphyromonas* spp. Las cuales asociadas con vaginitis bacteriana e infertilidad en humanos (Franasiak & Scott, 2015). Por otro lado, se detalla que existe una baja abundancia relativa de lactobacilos, esto similar al microbioma vaginal de ovejas (Otero et al., 2000; Swartz et al., 2014), lo cual difiere significativamente del microbioma vaginal de mujeres sanas (Yildirim et al., 2014). La diferencia de los taxones dominantes como *Lactobacillus* spp. está íntimamente relacionado a las características de la vagina, tales como pH; sin embargo, pese a que en el ganado bovino la abundancia relativa de lactobacilos es baja, esta aumenta a lo largo del ciclo estral con el fin de estimular función inmunológica (Otero et al., 2000). En cambio, la disminución de la abundancia relativa de *Lactobacillus* spp. está asociado con signos de infección o variaciones en la composición de las comunidades microbianas que podrían ser perjudiciales para la salud vaginal y la reproducción (StykovÃ et al., 2014).

Laguardia-Nascimento et al. (2015) y Nesengani et al. (2017) reportan que las principales Phylum encontrados en muestras de mucosa vaginal son Firmicutes (~40–50%), Bacteroides (~15–25%) y Proteobacteria (~5–25%). Además, se reportan entre 10%-20% de bacterias no clasificadas; los principales taxones que representan la composición de las comunidades microbianas en la vagina bovina son *Aeribacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Rikenella*, *Alistipes*, *Bacillus*, *Eubacterium* y *Prevotella* (Laguardia-Nascimento et al., 2015). Giannattasio-Ferraz et al. (2019) revela una similitud existente en el microbioma vaginal entre las razas Nellore y Gyr, siendo las



principales especies bacterianas *Aeribacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Bacteroides* y *Ruminococcus*. Además, también se enfoca un panorama más amplio al caracterizar otros taxones como *Mycosphaerella* (el hongo más dominante) y *Methanobrevibacter* (la arquea más dominante) en el microbioma vaginal. También, se señalaron algunos géneros como posibles biomarcadores para el embarazo mediante el modelo Random Forest, se describieron géneros como *Histophilus*, *Clostridiaceae* y *Campylobacter* en la vagina, así como *Bacteroidales* y *Dorea* en las heces; sin embargo, este tipo de estudios necesitan de mayores experimentaciones para validar el papel funcional de estos biomarcadores en el embarazo (Deng et al., 2019). La descripción de las funciones fisiológicas, la importancia del microbioma vaginal en bovinos es cruciales para comprender los efectos en los mantenimientos de la salud, esto basado en que no todo cambio conduce a un impacto negativo en la salud del ganado, sino que el cambio en la diversidad y las relaciones filogenéticas también pueden conducir a una buena preñez (Ault et al., 2019; Serrano et al., 2019).

Pese a que las contribuciones del conocimiento del microbioma vaginal permiten entender algunos aspectos de la reproducción, son pocos los análisis de las variaciones de la diversidad microbiana durante diferentes fases del ciclo estral (Appiah et al., 2020). Mahalingam et al. (2019) indicaron que la microbioma vaginal de búfalas está predominado por *Corynebacterium*, *Porphyromonas*, *Helcococcus*, *Anaerococcus* y *Fastidiosipila*, estas con un gran nivel de relación filogenética, destacando que el phylum *Firmicutes* fue significativamente el de mayor dominancia durante la fase de celo, porque se infiere que la identificación de las comunidades bacterianas durante diferentes fases del ciclo estral puede iniciar nuevos enfoques terapéuticos que mejore la eficiencia reproductiva. Wang et al. (2016) reveló la variación de las comunidades microbianas entre las etapas lúteas y folicular en poblaciones de ganado bovino, aunque la microflora vaginal estuvo predominada por *E. coli*, *Aerococcus vaginalis*, *Aerococcus viridans*, *Haemophilus somnus*, *Streptococcus pluranimalium*, *Sphingomonas roseiflava*, *Psychrobacter marincola* y *Lactobacillus*, se destacó notablemente que *Streptococcus spp.* tuvo una mayor dominancia en la fase lútea que en la fase folicular, mientras que *Lactobacillus spp.* Tuvo mayor preponderancia en la fase folicular que en la fase lútea. Entender qué roles funcionales diferencia la microflora dominante de la fase lútea de la folicular podría desentrañarse mediante un análisis detallado del genoma de las bacterias

utilizando el secuenciamiento metagenómico shotgun (Fettweis et al., 2019; Goltsman et al., 2018)

Muchos autores afirman que la variación del microbioma vaginal bovino podría afectar la capacidad de la hembra para establecer un embarazo e influir en la salud de la cría durante la gestación (McClure, 2018). Esta relación mutualista establece la primera línea de defensa contra la colonización patógena en la mucosa vaginal (Smith & Ravel, 2017). Los procesos reproductivos como el crecimiento, la maduración, el transporte y la supervivencia de embriones y gametos dependen del moco presente en el ecosistema vaginal constituido por el microbioma vaginal (Rutllant et al., 2005). Las biopelículas que forman estas especies tienen la capacidad de estabilizar el microambiente, jugando un papel importante como barreras inmunológicas y base de crecimiento para los microorganismos involucrados en la distribución de gametos (Rutllant et al., 2002).

### ***Microbioma cervical bovino***

El cuello uterino está compuesto por varios anillos de colágeno revestidos de moco, lo cual constituye una de las barreras anatómicas (biológica y física) más importantes que impide el ascenso de patógenos hacia zonas interiores del tracto reproductivo (Azawi, 2008; Sheldon & Dobson, 2004). Sin embargo, la ubicación de esta zona la hace susceptible a la exposición de patógenos acarreados por desechos luminales y por las contracciones uterinas (Sharma et al., 2017). Por ello, el cuello uterino es una parte del tracto reproductor que debe evaluarse individualmente, tanto antes y después del parto, a fin de evaluar y predecir los éxitos reproductivos (Deguillaume et al., 2012). La caracterización mediante metagenómica del microbioma del cuello uterino resultó mucho más detallada de aquellos realizados solo mediante técnicas de cultivo celular (Singer et al., 2016).

Wang et al. (2018) encontraron que las comunidades bacterianas del cuello uterino en diferentes fases (formación, gestación y posparto clínico) constituyen predominantemente *Proteobacteria*, *Bacteroides* y *Firmicutes*, similar a lo reportado en el microbioma vaginal; sin embargo, la comunidad bacteriana en el microbioma cervical de bovinos afectadas por metritis consistió principalmente en una mayor abundancia de

*Bacteroidetes* y *Fusobacteria*. Por otro lado, se reportó una alta frecuencia de *S. aureus* en muestras de hisopados cervicales en bovinos que han abortado con respecto a animales sin ningún registro de aborto (Galvão, 2012). Así mismo, Chen et al. (2017) sugiere que el microbioma cervical y/o vaginal puede ser útil para detectar enfermedades comunes en el tracto reproductor.

Actualmente, no hay mayor información disponible sobre el microbioma de especie bovinas, no obstante, conocer que mecanismos vinculan la inflamación endocervical relacionado con la variación del microbioma, son de alto interés para enfoques terapéuticos (Appiah et al., 2020).

### **Microbioma uterino bovino**

Inicialmente, se creía que la cavidad uterina era un segmento estéril, este paradigma cambia luego de que se reporta que existe ciertos microorganismos que se adaptan al endometrio y también pueden influir en las células uterinas (Baker et al., 2018; Moreno & Franasiak, 2017; Pelzer et al., 2017). Galvão et al. (2019) describe la microflora en el tracto reproductivo, manifestando la importancia de caracterizar el microbioma uterino y relacionar su papel en las enfermedades. Aunque exista un microbioma escaso en el útero, incluso durante el embarazo (Karstrup et al., 2017; Moore et al., 2017), una pequeña fracción de las bacterias se clasifican como patógenos endometriales, tales como *T. pyogenes*, entre otras especies de *Fusobacteria* y *Prevotella* spp.

Por otro lado, se reportó una mayor diversidad en el microbioma uterino, cuyos principales representantes a nivel de phylum son Proteobacteria, Tenericutes, Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria, Actinobacteria y taxones no asignados (Santos & Bicalho, 2012); estas bacterias por lo general se dispersan hacia la luz uterina en situaciones post-parto, debido a la pérdida de la compartimentalización (Miranda-CasoLuengo et al., 2019).

*T. pyogenes*, *E. coli*, *Peptostreptococcus*, *Propionibacterium* y entre otras bacterias anaerobias son consideradas como los principales reguladores de enfermedades uterinas (Sheldon et al., 2019). Aunque reportes aseguran que las bacterias en el tracto reproductivo del ganado no siempre causan infecciones y enfermedades (Appiah et al.,

2020). Autores sugieren que la flora uterina y el sistema inmunitario local tienen un efecto de regulación cruzada (Agostinis et al., 2019)

Enfermedades asociadas con el microbioma del tracto reproductor en bovinos

Definir un microbioma “saludable” como tal aún no está estandarizado; sin embargo, la “*disbiosis*”, es decir, el desequilibrio y/o variaciones en la composición de las comunidades microbianas, está relacionado a cambios en la salud de los hospederos, por lo que se relaciona como los posibles agentes etiológicos de enfermedades infecciosas, trastornos debilitantes y problemas de infertilidad (Mor et al., 2015). El ecosistema saludable del tracto reproductivo en humanos posee predominancia de especies de *Lactobacillus* (White et al., 2011), las cuales son un rasgo crítico debido a la actividad productora de ácido láctico y la prevención del establecimiento de bacterias patógenas (Boskey et al., 1999).

Sin embargo, este paradigma no se ajusta a los patrones de diversidad entre otras especies, pues se estipula que cada especie posee singularidades en la diversidad microbiana presente que pueden estar en relación con algunas características como receptividad sexual, fertilidad, entre otras (Yildirim et al., 2014) y a menudo, se atribuye que las enfermedades del tracto reproductivo depende de los cambios en la composición de las poblaciones microbianas, según sea el microbioma dónde la enfermedad está aconteciendo (Ott et al., 2004; Seksik et al., 2003; Turnbaugh & Gordon, 2009).

Debido a la estrecha interconexión de microbioma en el tracto reproductor, existe un intercambio constante entre el microbioma vaginal con el microbioma presente en tejidos reproductores internos, ya sea por vías de colonización como la colonización externa (Appiah et al., 2020), vía sanguínea (Klibs N. Galvão et al., 2019; Jeon et al., 2017) y/o vía ambiental (Laguardia-Nascimento et al., 2015). Esta ruta de ascensión de microbioma por la cavidad vaginal hacia otros microbiomas, tienen la capacidad de repercutir en el eje reproductivo y la gametogénesis, pues, se demostró que la acción de bacterias patógenas induce la inhibición de la respuesta de las gonadotropinas y afecta negativamente el desarrollo folicular (Franasiak & Scott, 2015).

En el caso de las bovinas lecheras y ganado con potencial comercial, la mayoría experimentan la contaminación bacteriana, o precisamente dicho, aumenta el flujo ascendente de microbioma en el tracto reproductor, momentos después del parto, esto debido a la pérdida de la compartimentalización en el tracto reproductivo (Miranda-CasoLuengo et al., 2019); sin embargo, la fracción de microorganismos que desarrollan una enfermedad clínica o subclínica es pequeña (Appiah et al., 2020) las cuales pueden clasificarse según el potencial patogénico, siendo estas bacterias contaminantes oportunistas, patógenos potenciales y patógenos uterinos (Williams et al., 2005)

Las funciones hasta ahora reportadas del microbioma asociadas al aparato reproductor hacen una contribución significativa al estado fértil del individuo, ya sea mediante la comprensión en la adaptación del endometrio o la influencia que tenga en las células uterinas (Jeon et al., 2015; Knudsen et al., 2015). En estudios actuales, algunos de los microorganismos fueron validados como biomarcadores para una buena gestación (Wang et al., 2019). Sin embargo, un fragmento llamado bacterias patogénicas, que contaminan el útero después del parto, pueden desarrollar enfermedades subclínicas y clínicas (como la metritis y endometritis), que, en largos periodos de tiempo, afectan dicha fertilidad mediante el daño a los ovocitos (Baker et al., 2018)

La metritis es una inflamación del útero causado por infección bacteriana, cuyo signo clínico u grado de inflamación parece tener una conexión significativa con la posibilidad de desarrollo de endometritis inmediatamente después del parto (Sheldon et al., 2009). Por otro lado, la endometritis es una enfermedad multifactorial debido a que posee diferentes agentes de riesgo, siendo la inflamación del endometrio por el componente bacteriano uno de ellos (Adnane et al., 2017). Galvão et al. (2019) señalan una asociación entre la metritis y una disbiosis del microbioma uterino, está caracterizada por la disminución en la diversidad de especies y un aumento de los géneros *Bacteroides*, *Porphyromonas* y *Fusobacterium*. Cunha et al. (2019) en estudios de metritis de bovinas lecheras *Holstein*, revela que *Helcococcus ovisse* es un patógeno que está relacionado con un alto grado de patogenicidad y resistencia antimicrobiana. Se describió la alta incidencia de ciertos géneros que son poco abundantes en el microbioma “sana”, tales como *Sneathia* y *Peptostreptococcus* (Peng et al., 2013; Sicsic et al., 2018). Sin embargo, Jean et al. (2015) señala que el género *Sneathia* está vinculada con la buena salud del útero. Estos resultados

contradictorios pueden deberse a que en cada estudio las bacterias ambientales tienen contribución en la aparición de las poblaciones de microflora en el útero de las bovinos posparto. Más aún, la prevalencia relativa de estos géneros puede desenvolver un rol más importante en la frecuencia de metritis (Appiah et al., 2020). Por otro lado, para el estudio de las fallas reproductivas asociadas a la endometritis, se diseñaron modelos in vivo con el uso de *E. coli* y *S. pyogenes* patógenas en razas Holstein a fin de estudiar los mecanismos y los efectos de la enfermedad uterina (Piersanti & Bromfield, 2019).

Además, otros estudios confirman a *E. coli* como agente causal de endometritis clínica y subclínica en los ganados bovinos lechero y de producción de carne (Bicudo et al., 2019; Ricci et al., 2015; Salah & Yimer, 2017). Además, nuevas especies como *T. pyogenes* (Werner et al., 2012) y *Corynebacterium endometrii* (Mogheiseh et al., 2020) fueron aisladas de muestras de útero de bovinos con endometritis; mientras que Miranda-CasoLuengo et al. (2019) y Wang et al. (2018) confirma la abundancia relativamente alta de *Bacteroides* y *Fusobacterium* en endometritis clínica avanzada, sin embargo, es apremiante una mejor caracterización de este microbioma en enfermedades mediante técnicas independientes de cultivo.

La literatura revisada coincide en que los trastornos reproductivos y las enfermedades genitales tienen una correlación con el aumento de la abundancia relativa y el número de taxones bacterianos con respecto al microbioma central presentes en los tejidos del tracto reproductivo. En el caso general del ganado bovino, se demostró que los géneros *Histophilus* (Corbeil, 2007), *Mycoplasma* (Pfützner & Sachse, 1996), *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella* y entre otras (LeBlanc, 2008) están involucradas en el desarrollo de desórdenes en los genitales, así mismo, se describió que las sobrepoblaciones de especies como *Escherichia coli* y *Streptococcus* están involucradas en los procesos de infección de la zona vaginal y/o uterina, según el microbioma dónde la enfermedad esté presente (Rodrigues et al., 2015). Existe la hipótesis que las enfermedades de los tractos no solo serían causadas por las interacciones de las variantes del ecosistema bacteriano del genital, sino también por la interferencia humana, la cual sería un factor que afectaría directamente a los componentes del microbioma (Gilbert, 2019).

Rodrigues et al. (2015) en su trabajo comparativo entre bovinos sanas y bovinos con algún trastorno reproductivo, señala que la abundancia relativa de bacterias del género *Bacteoides* y *Enterobacteriaceae* aumentó en un 35,83% y 18,62%, respectivamente, en comparación con la abundancia del microbioma central en individuos sanos; además, reportaron el aumento de 53 taxones adicionales que no detectados en los individuos sanos. Por otro lado, la detección del género *Histophilus* en los grupos con trastornos reproductivos, permitiría determinar ciertos biomarcadores para la detección de este tipo de afecciones, debido a que esta bacteria es descrita por otros autores como un patógeno oportunista en el tracto reproductivo bovino asociado con enfermedades reproductivas que influyen significativamente en la fertilidad (Corbeil, 2007; Van Der Burget et al., 2007).

Aparentemente, existe una diferencia en la dominancia de especies que componen el microbioma entre el ganado sano y enfermo. En individuos sanos, el microbioma se caracteriza por tener dominancia de especies anaeróbicas; en cambio, especies bacterianas aeróbicas y/o anaeróbicas facultativas son dominantes en hembras con algún estado de enfermedad (Rodrigues et al., 2015). Más interesante, ciertas especies con la capacidad de sintetizar metabolitos que pueden servir como nutrientes para las bacterias patogénicas, como el caso de *Histophilus*, que utiliza los compuestos ricos en metano, nitrógeno y azufre producidos en el ecosistema vaginal (Corbeil, 2007).

Por otro lado, pese a la similaridad en la microflora en diferentes razas de ganado, se ha reportado la presencia de hongos patógeno, principalmente especies de levaduras y *Penicillium* sp., como colonizadores de los fluidos cérvico-vaginales en el ganado Holstein (Saini et al., 2019). La función específica de estos fúngicos patógenos oportunistas, pese a su conocido papel en diversos procesos teriogenológicos, aún requiere más investigación, pues recientemente se reveló que puede obtener un papel importante como biomarcadores del éxito y fracaso reproductivo en ganados bovinos (Deng et al., 2019).

Los cambios de las comunidades microbianas en los tractos reproductivos de los huéspedes es un parámetro importante para comprender la patogénesis, la progresión de la enfermedad y las fallas reproductivas, siendo esta variación tanto de la supresión de

especímenes comensales hasta colonización excesiva de bacterias potencialmente patógenas (Rodrigues et al., 2015). Más aun, el entendimiento de las enfermedades uterinas al postparto, tales como la metritis puerperal, endometritis clínica y endometritis subclínica, tiene importantes razones económicas y de bienestar, ya que contribuyen al confort de la bovino, la eliminación del rodeo, y contraresta los efecto negativo profundos en la performance reproductiva (Deng et al., 2019). Por lo que el estudio del microbioma del tracto reproductor bovino, el entendimiento entre las interacciones entre el microbioma y el huésped proporcionaría data que permita explicar el éxito y el fracaso reproductivo (Gilbert, 2019) y organizar mejores decisiones a fin de mejorar la calidad y estilo de vida del ganado (Jeon et al., 2015)

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Selección de animales

Para el experimento se utilizó un total de 53 bovinos pertenecientes a ganaderos de la cuenca Alto Imaza, las cuales fueron examinadas según los siguientes criterios:

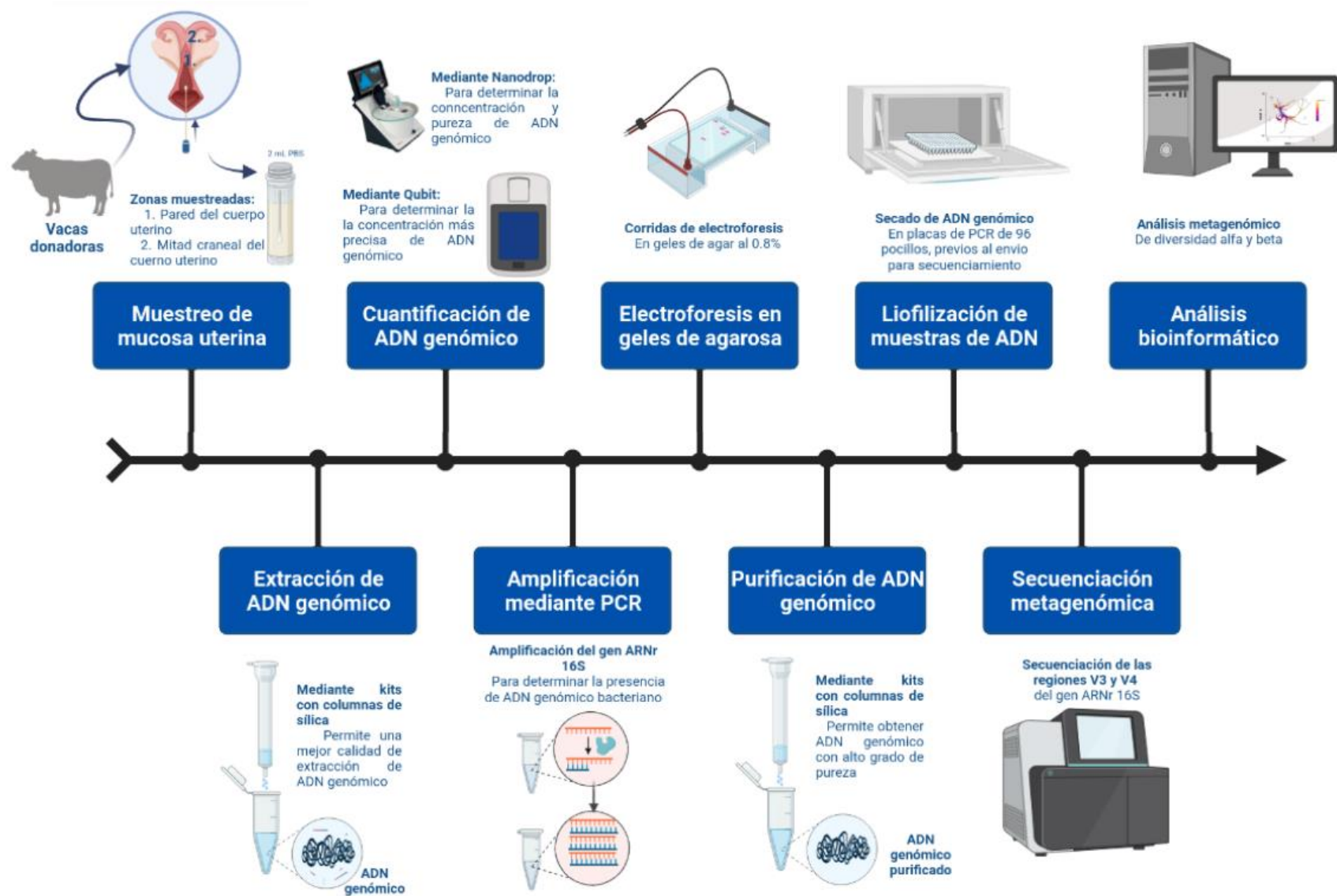
- Estado reproductivo vacía/cíclica
- Libres de patologías en el tracto genital
- Libre de tratamiento con antibiótico (45 días)
- Edad (2 – 60 meses)
- Número de partos (2 – 4)
- Condición corporal (2.75 – 4) (Martínez et al., 1998)
- Alimentación (pastoreo)

Las características de cada individuo están representadas (**Tabla 1**).



Tabla 1. Información sobre el lugar de muestreo, raza, número de partos, códigos de muestras realizadas, tipo de embrión transferido y estado de preñez de los individuos incorporados al análisis molecular.

N°	DISTRITO	CRUCES	N° PARTOS	CÓDIGO DE MUCOSA DE PARED UTERINA	CÓDIGO DE MUCOSA DE CUERNO UTERINO	TIPPO DE EMBRION TRANSFERIDO	PREÑEZ
2	OLLEROS	BROW SWISS	3	U-2	C-2**	MOET FRESCO	NO
5	OLLEROS	BROW SWISS CRUZADA*	2	U-5	C-5**	MOET CONG.	NO
7	OLLEROS	BROW SWISS	1	U-7	C-7**	MOET FRESCO	NO
10	OLLEROS	BROW SWISS	4	U-10	C-10	MOET FRESCO	NO
12	OLLEROS	BROW SWISS	1	U-12	C-12	MOET CONG.	NO
13	OLLEROS	SIMENTAL CRUZADO*	4	U-13	C-13**	MOET FRESCO	SÍ***
14	OLLEROS	BROW SWISS	7	U-14	C-14**	MOET FRESCO	SÍ***
15	OLLEROS	BROW SWISS CRUZADA*	7	U-15**	C-15	MOET FRESCO	SÍ***
17	OLLEROS	BROW SWISS CRUZADA*	6	U-17**	C-17	MOET CONG.	SÍ***
18	OLLEROS	BROW SWISS CRUZADA*	3	U-18	C-18	MOET CONG.	NO
22	YAMBRASBAMBA	SIMMENTAL	2	U-22**	C-22	---	---
23	YAMBRASBAMBA	SIMMENTAL	3	U-23	C-23	MOET FRESCO	NO
36	OLLEROS	BROWN SWISS	2	U-36	C-36**	MOET CONG.	NO
37	OLLEROS	HOLSTEIN-F1*	5	U-37	C-37**	MOET CONG.	SI***
38	OLLEROS	BROWN SWISS	4	U-38	C-38	---	---
39	OLLEROS	HOLSTEIN CRUZADO*	1	U-39**	C-39	---	---
42	OLLEROS	BROWN SWISS	1	U-42	C-42**	---	---
43	OLLEROS	HOLSTEIN CRUZADO*	1	U-43	C-43	MOET FRESCO	NO
45	OLLEROS	HOLSTEIN CRUZADO*	1	U-45**	C-45	MOET CONG.	SI***
47	CUISPES	SIMMENTAL	5	U-47	C-47**	---	---
49	CUISPES	SIMMENTAL	4	U-49	C-49**	MOET FRESCO	NO
50	CUISPES	SIMMENTAL	2	U-50	C-50**	---	---
52	CUISPES	SIMMENTAL	0	U-52**	C-52	MOET FRESCO	SI***
53	CUISPES	CRUCE B/S*	3	U-53**	C-53	MOET FRESCO	NO



**Figura 1.** Flujograma de trabajo de las actividades desarrolladas para el cumplimiento de los objetivos de la tesis.

## 2.2. Método de extracción de microbioma (CITOBUSH)

Las muestras fueron extraídas de los bovinos receptoras 20 días antes de iniciar el protocolo de sincronización de celo, mediante un nuevo modelo de pistola de acero inoxidable que permite utilizar cepillos ginecológicos cérvico-uterinos descartables (Papanicolaou) y vainas sanitarias descartables tipo Cassou de IA. Esta modificación permite utilizar una sola pistola para realizar el muestreo de varios bovinos con solo realizar el cambio de los cepillos y vainas descartables entre cada muestra. (Madoz, 2013).

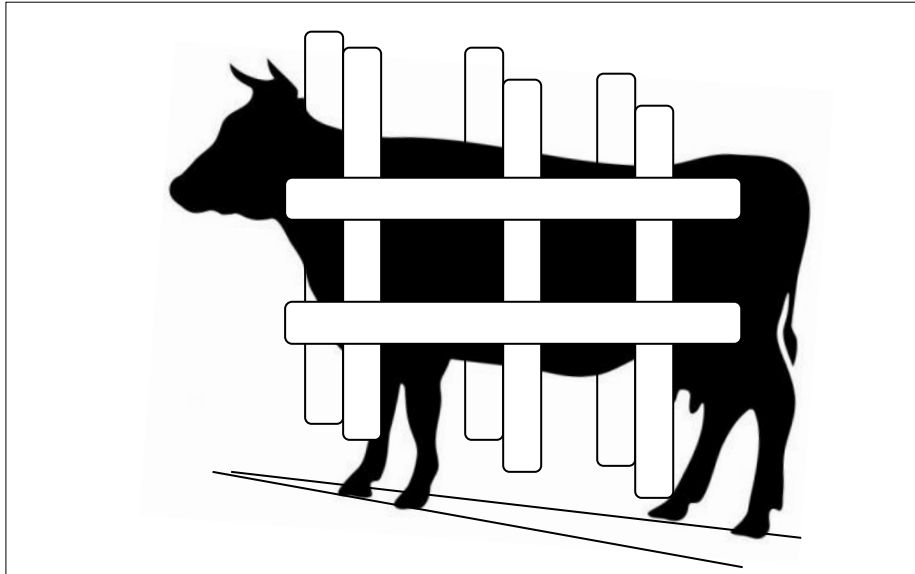
Además, permite realizar la toma de muestras en un tiempo mucho más corto y a menor costo, debido a que ambos descartables se fabrican en el país.

Descripción de las partes de la pistola fabricada, la cual consta básicamente de cinco partes:

- Pieza tubular de acero inoxidable hueco en todo su largo de 43,5 cm de longitud, con la parte posterior ranurada y terminada en forma de cono; con un tope interno de 5 cm en la parte anterior de la pieza.
- Pieza tipo émbolo alargada de acero inoxidable de 45,5 cm de longitud, con 1 cm de rosca en la parte anterior, y con un disco terminal a modo de tope posterior de la pieza.
- Cepillo de cerdas plásticas suaves insertas en un eje de alambre de 2 cm de longitud, cabo plástico de 5 cm de largo. Son de uso común en ginecología humana y se adquieren estériles (Medibrush, Argentina).
- Anillo plástico.
- Vaina plástica transparente de IA de 43,8 cm de largo y 0,5 cm de diámetro (IMV, Francia).

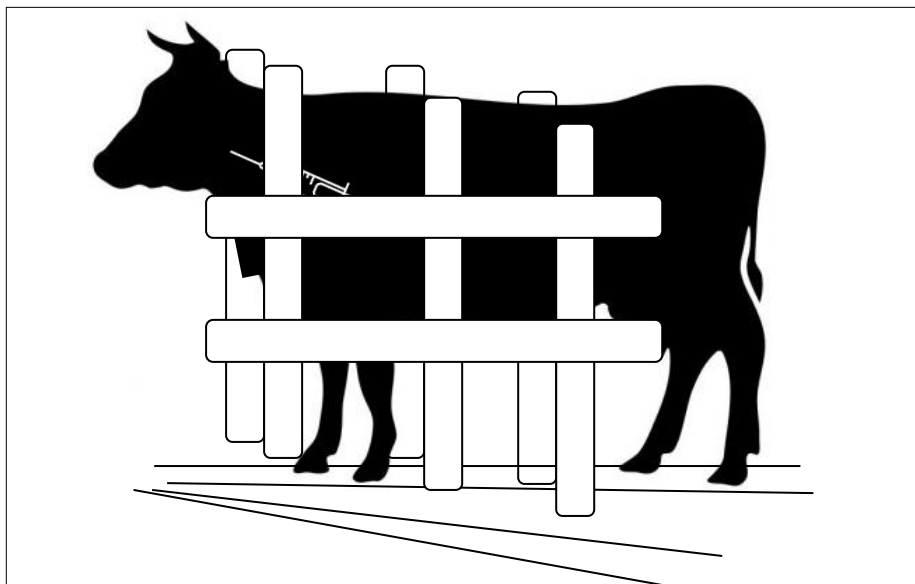
Descripción del proceso de recolección de la muestra de microbioma:

- Se colocó al animal en un brete de inmovilización, con el objetivo de darle un mejor manejo y evitar cualquier movimiento brusco que pueda lastimarlo (**Figura 2**).



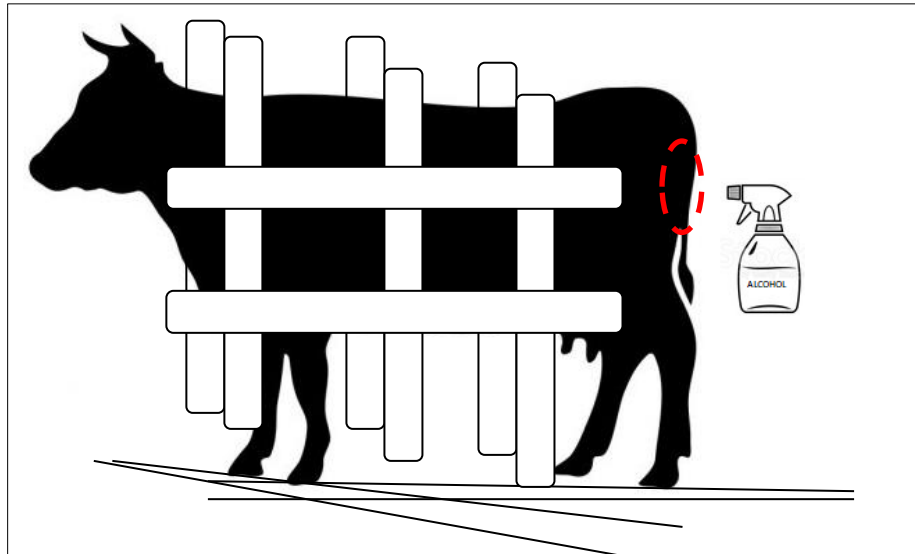
**Figura 2** Brete de inmovilización

- En el caso de animales con temperamento agresivo y difícil de manejar, se utilizó xilacina para relajar al animal (0,3-1 mg/Kg, E.V.)( **Figura 3**).



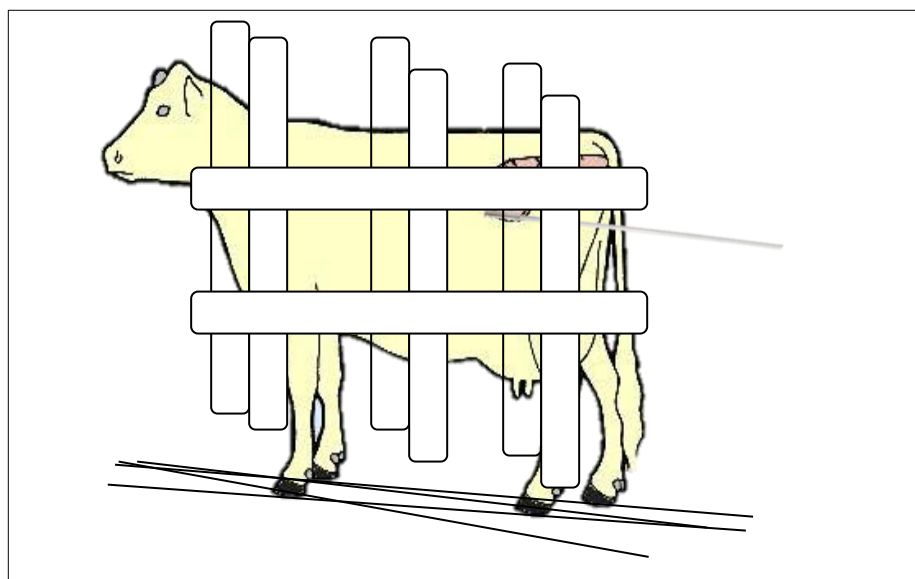
**Figura 3** Aplicación de endovenosa (E.V./ yugular)

- Luego de que el animal estuvo tranquilo y debidamente sujetado se procedió a realizar la limpieza y desinfección con alcohol al 70% de la zona perineal y vulvar de cada animal. (**Figura 4**).



**Figura 4** Limpieza externa de la vulva del animal.

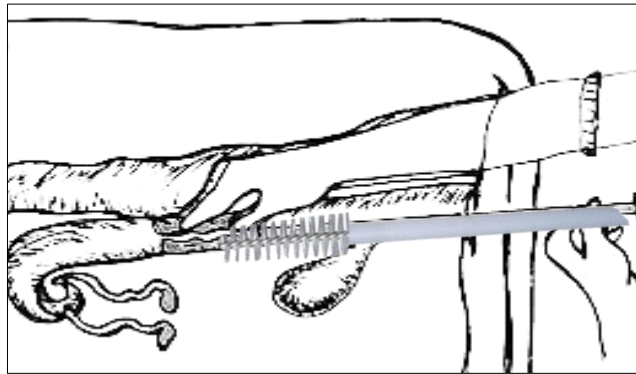
- Luego mediante la ayuda de un *cytobrush* adosado a un mango de longitud apropiada, se ingresó por la vulva del animal muy suavemente pasando el cérvix y llegando al cuerpo uterino, donde con la pistola se realizó la recolección de la muestra proveniente de la superficie mucosa endometrial con la ayuda de un cepillo raspando suavemente de la pared del cuerpo uterino y la mitad craneal del cuerno uterino para los estudios bacteriológicos (**Figura 5**).



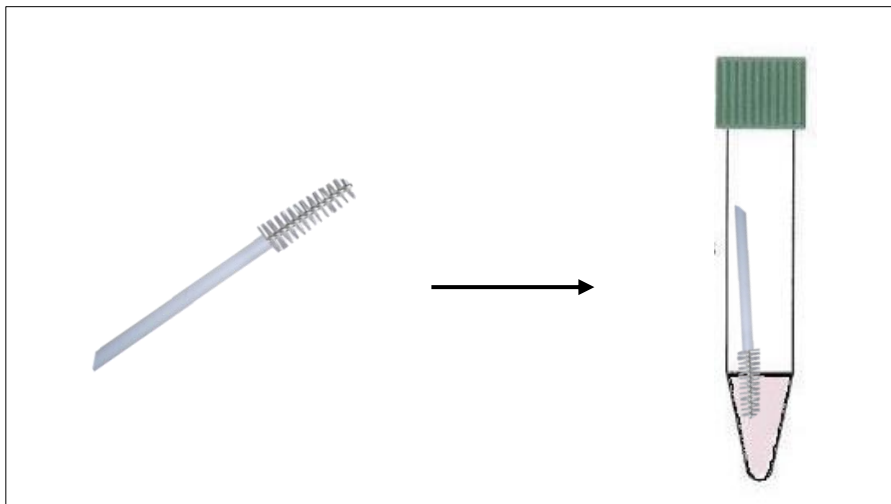
**Figura 5** Recolección de muestra de mucosa uterina con citocepillo

- Una vez fijado el cérvix vía rectal, se procedió al cateterismo del mismo, mediante una maniobra similar a la utilizada en la IA. En el cuerpo uterino, la pistola se dirigió a la mitad craneal del cuerno uterino, en ese momento el cepillo fue expuesto a la superficie de la mucosa endometrial donde se giró dos vueltas completas en sentido horario; luego el cepillo se retrajo dentro de la vaina sanitaria y posteriormente la muestra fue almacenada, este mismo proceso se realizó para la extracción de mucosa del cuerpo uterino (**Figura 6**).

La mucosa extraída se depositó en un criotubo de 4ml de capacidad con 2ml de Solución Buffer Fosfatada (PBS) para su transporte al Laboratorio de Fisiología Molecular, donde fue realizada la extracción y purificación del ADN genómico de las muestras (**Figura 7**).



**Figura 6** Ingreso del citocepillo hacia el útero



**Figura 7** Guardado y transporte de las muestras de mucosa

### 2.3. Extracción de ADN genómico de las muestras de mucosa uterina bovina

La extracción de ADN de muestras de mucosa uterina fue realizada con la aplicación del protocolo del Kit “*PURELINK® KIT DE ADN GENÓMICO*” (Invitrogen), con algunas modificaciones del protocolo de extracción en la etapa inicial, descrita por Azawi et al (2008). Para ello se efectuaron los siguientes pasos a nivel de laboratorio:

#### 2.3.1. Preparación de reactivos, materiales y equipos:

- Se preparó los buffers de lavado “*PureLink® Genomic Wash Buffer I*”, completando el volumen con 75 ml de etanol de (96-100%) y el “*PureLink® Genomic Wash Buffer I*”, completando el volumen con 87.5 ml de etanol de (96-100%).
- Dentro del protocolo se observa previamente si la solución de digestión y lisis tiene precipitación de sales. Si esto ocurre se disuelve los precipitados calentando a 37°C, posteriormente se enfría a 25°C antes del uso.
- Se enciende el baño “*Accu Block Digital Dry bath*”, calibrado a 55°C.
- Se etiqueta previamente los tubos de microcentrífuga de 1,5ml según el nombre de muestra biológica que corresponda.
- Se esteriliza todos los materiales en la en la cámara de extracción de ácidos nucleicos con luz UV durante 40 min.

#### 2.3.2. Procesamiento de las muestras de mucosa uterina bovina:

- Las muestras de mucosa congeladas a –80 °C fueron descongeladas a temperatura ambiente.
- Las muestras biológicas suspendidas en PBS fueron centrifugadas a 20,000 RPM por 10 minutos.
- El sobrenadante fue descartado y se utilizó el pellet celular para la extracción de ADN total.

#### 2.3.3. Digestión y lisis celular:

- En cada tubo se adiciono 180 µL de *PureLink® Genomic Digestion Buffer* y 20 µL de Proteinasas K y luego fue homogenizado mediante un vórtex. El pellet de mucosa fue resuspendido en tampón. Para procesar todas las muestras fue

preparado un master mix de buffer de digestión mezclando 180 µL de *PureLink® Genomic Digestion Buffer* y 20 µL de Proteinasa K para cada muestra.

- Los tubos conteniendo las muestras disueltas en tampón de solución fueron incubadas a 55 ° C, con agitación ocasional hasta que se complete la lisis celular, aproximadamente por 4 horas.

#### 2.3.4. Proceso de extracción celular

- Para eliminar cualquier material particulado, se centrifugó el lisado a 20,000 RPM durante 3 minutos a temperatura ambiente. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga de 1.5mL nuevo y estéril.
- Para eliminar contenido de ARN, se añadió 20 µL de RNAsa A (suministrado en el kit) al lisado, la homogenización fue garantizada con un vórtex breve y fue incubado a temperatura ambiente durante 2 minutos (es importante cumplir el tiempo especificado antes del siguiente proceso).
- Fue adicionado 200 µL de *PureLink® Genomic Lysis/Binding Buffer*, breve vórtex. Luego se añade 200 µL de etanol al 96-100% al lisado. Fue homogenizado bien agitando en vórtex durante 5 segundos. Para el procesado de varias muestras en simultáneo, se preparó una mezcla maestra de buffer / etanol mezclando con 200 µl de *Lysis/Binding Buffer* y 200 µl de etanol al 96–100% por muestra.
- Fue transferido cada muestra a una columna de purificación *PureLink®* insertado un tubo de colecta. Posteriormente fue centrifugada a 10,000 RPM durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- Fue descartado el tubo de recolección y se colocó la columna de centrifugado en un nuevo tubo de colecta *PureLink®* limpio suministrado en el kit.
- Fue añadido 500 µl de *Wash Buffer 1* a cada columna de sílica. Luego fue centrifugada la columna a temperatura ambiente a 10,000 RPM durante 1 minuto, desechando el tubo de colecta y adicionando uno nuevo.
- Fue añadido 500 µl de *Wash Buffer 2* a cada columna de sílica. Fue centrifugada la columna a 20,000 RPM durante 3 minutos a temperatura ambiente. Luego se desechó el tubo de colecta.
- las columnas de centrifugado fueron colocadas en nuevos tubos de microcentrífuga estéril de 1,5 ml.



- Fue adicionado 100  $\mu$ L de *PureLink*® *Buffer* de elución genómica a la columna (en este paso se asegura de agregar el volumen al centro de la columna y no por las paredes).
- La incubación fue a temperatura ambiente durante 1 minuto. Luego centrifugada a 20,000 RPM durante 1 minuto a temperatura ambiente.
- El tubo contiene ADN genómico fue retirado. Fue alicuotado 20  $\mu$ L de ADN y almacenada a -20° C, el resto de la alícuota fue almacenado a -80° C para almacenamiento a largo plazo y evitar la degradación de la muestra.

## 2.4. Cuantificación de ADN genómico

### 2.4.1. Cuantificación mediante NanoDrop One

Se siguieron los siguientes pasos:

- Se descongeló las muestras de ADN genómico por al menos 2 minutos (para evitar sesgo en la cuantificación, las muestras tienen que estar en temperatura ambiente).
- Se enciende el equipo Nanodrop One y se seleccionó la opción de cuantificación de ADN bicatenario.
- Se cargó 2 $\mu$ L de la solución blanco (buffer de elución *PureLink*®) en el pedestal inferior, se cierra el pedestal delicadamente. Luego se marca la opción de blanqueamiento.
- Luego, se cargó 2 $\mu$ L de las muestras de ADN en el pedestal, en seguida se marcó la opción de cuantificar.
- Se registra cada una de las lecturas de concentración y parámetros A280/260 y A260/230. Después de cada registro y antes de la carga de las siguientes muestras, se limpia el pedestal con paños desechables Kimwipes.

### 2.4.2. Cuantificación mediante *Qubit 3.0*

Para la cuantificación fue utilizado el reactivo *Qubit*® *dsDNA BR Assay Kit* (Invitrogen), desarrollando los siguientes pasos:

- Las soluciones de trabajo fueron preparados, el *Qubit*® solución de trabajo diluyendo *Qubit*® *dsDNA BR Reagent (Component A)* 1:200 en *Qubit*® *dsDNA BR Buffer (Component B)*, utilizando un tubo de plástico limpio cada vez que

prepare suficiente *Qubit*® solución de trabajo. El volumen final en cada microtubo de 0.5 ml debe ser de 200ul.

- La adición de 190 ul de *Qubit*® solución de trabajo a cada uno de los tubos utilizados para los estándares, dos en total.
- La adición de 10 ul de cada *Qubit*® *dsDNA BR Standard* al tubo apropiado, luego se homogenizó mediante pipeteo.
- La adición 198 ul de *Qubit*® solución de trabajo a cada uno de los tubos utilizados para cuantificar las muestras de ADN provenientes de mucosa uterina bovina.
- La adición final de 2 ul de muestra de ADN a los 198 ul de *Qubit*® solución de trabajo a cada uno de los tubos utilizados para las muestras, seguidamente homogenizado mediante un vórtex de 2-3 segundos (El volumen de cada tubo debe de ser de 200 ul), posteriormente los tubos fueron incubados durante 2 minutos.
- Finalmente fue realizada la lectura, en la Pantalla de *Qubit*® *Fluorometro* se presionó “DNA” luego “dsDNA”, “*Broad Range*”. Primero se calibró la corrida con la lectura de los dos estándares. Luego se procedió con la lectura registro de la concentración de ADN de las muestras.

## 2.5. Amplificación por PCR convencional del gen 16S

### 2.5.1. Elaboración de *Master Mix*

Volúmenes de cada reactivo procedente del kit *Tag MasterMix (BIORON)* para la amplificación del gen RNA16s, por cada reacción (**Tabla 2**)

**Tabla 2** Reactivos utilizados en la elaboración del Master Mix.

Reactivos	Reacción 1X-22 µL
	<i>16S</i>
Master Mix	11 µL
MgCl <sub>2</sub>	0.5 µL
Agua	7.5 µL
Primer F (27_F) 10 µM	1 µL conc. Final (0,45 µM)
Primer R (1492_R) 10 µM	1 µL conc. Final (0,45 µM)
<b>Total</b>	<b>21 µL</b>
Templado (ADN)	1 µL

- En etapa fueron preparados los volúmenes de reacción de PCR en la cabina de PCR, desinfectando y exponiendo a UV antes y después del uso de la cabina.

### 2.5.2. Corrida de PCR

Establecimiento de los parámetros para cada corrida de PCR, todas las condiciones de perfil térmico fueron aplicados en todas las corridas (**Tabla 3**).

**Tabla 3** Parámetros considerados en una corrida de PCR.

1	2			3	
95 °C 0:06:00 min	95 °C 0:00:30 min	55°C 0:01:00 min	72 °C 0:01:00 min	72 °C 0:10:00 min	4 °C ∞
1x	40x				1xd

Los amplificadores fueron guardados en refrigeración hasta antes de realizar el proceso electroforético

## 2.6. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

Para la ejecución de electroforesis se tuvo en cuenta los siguientes pasos:

### 2.6.1. Preparación TAE 1X

- Se midió 12.5 ml de TAE 40X y se mezcló con 487.5 ml de agua destilada
- Se homogeniza bien y se conserva a temperatura ambiente.

### 2.6.2. Preparación de Gel de Agarosa al 0.8%

- Para la preparación del gel de 11 pocillos, fue adicionado 0.6 g de Agarosa en 75 ml de TAE 1X.
- Para la preparación del gel de 18 pocillos, fue adicionado 1.0 g de Agarosa en 125 ml de TAE 1X
- Para la preparación del gel de 11 pocillos, fue adicionado 2.4 g de Agarosa en 300 ml de TAE 1X
- Cada componente fue calentado en microondas por 1:30 min o más hasta que se disuelva el agar sin que este haga ebullición. Seguidamente fue adicionado 10 ul Colorante *Orange* por cada 100 ml de solución. Finalmente, la solución fue colocado en la bandeja de electroforesis, asegurándose de que no existan burbujas.

### 2.6.3. Siembra en Gel de Agarosa

- Se sembró 2ul de loading blue diluidos en 10 ul de muestra de ADN
- Se sembró 10 ul del ladder GeneRuler 1kb (Invitrogen)

#### 2.6.4. Orden de Siembra en Gel de Agarosa

**Tabla 4** Orden de Siembra en Gel de Agarosa

1k	M	M	M	M	...		C+		C-	CR
b	1	2	3	4						

1Kb=Lader  
M1...4= Muestras  
C+=Control Positivo  
C-=Control Negativo  
CR=Control Reactivo

#### 2.6.5. Corrida electroforética

- Para la corrida electroforética se corrieron bajo los parámetros de 75 voltios por 1 hora. Luego del tiempo delimitado, se procedió a la lectura en fotodocumentador

### 2.7. Purificación de ADN genómico de mucosa uterina bovina

La purificación de ADN de muestras de mucosa uterina extraídas se desarrolló con la aplicación del protocolo del Kit “*Dna Clean & Concentrator®-5*”.

#### 2.7.1. Preparación Previa del Kit *Dna Clean & Concentrator®-5*

- Preparación del buffer: Se añadió 96 ml etanol 100% al concentrado de 24ml de *DNA Wash Buffer*, solo cuando se abre un kit nuevo.

#### 2.7.2. Procedimiento de purificación

- En un microtubo de 1.5ml, fue añadido 2 veces el volumen de *DNA Binding Buffer* al volumen de la muestra de DNA. Seguido de una mezcla breve mediante vórtex. (\*aplicación para plásmidos o DNA genómico > 2kb.)
- Se transfirió la mezcla a la columna *Zymo-Spin™* en un tubo colector. Seguidamente, fue centrifugado a 16 000 RPM por 30 segundos, luego se descartó el sobrenadante del tubo colector.
- Se añadió 200ul de *DNA Wash Buffer* a la columna, luego se centrifugó a 16 000 RPM por 30 segundos, repitiendo el paso de lavado por segunda vez.
- En cada tubo fue añadido 20 ul *DNA Elution Buffer* directamente a la matriz de la columna, incubada a temperatura ambiente por un minuto. Se transfirió la

columna a un microtubo de 1.5 ml y se centrifugó a 16 000 RPM por 30 segundos para la elución de DNA. Finalmente, la muestra de DNA está ultrapura, volviendo a cuantificar por el *nanodrop*.

## **2.8. Secado de ADN genómico de mucosa uterina bovina**

### **2.8.1. Procedimiento de secado de ADN genómico previo a secuenciar**

Después de la cuantificación y verificación de la calidad, las muestras se sometieron a secado mediante baño seco a 37 ° C durante 24-48 horas en placas de PCR de 96 pocillos, cada uno previamente etiquetadas.

- El baño seco se colocó en una campana extractora previamente desinfectada con hipoclorito al 1% y alcohol al 70%, para evitar la contaminación.
- Luego, se encendió la campana y se colocó las placas de PCR de 96 pocillos que contienen las muestras para evitar el contacto entre los tubos, en el baño seco. Estos deben tener la tapa abierta para facilitar el proceso de secado. Para evitar la contaminación entre muestras, cada muestra está por separado por al menos un pocillo, asegurándose de que no estén demasiado juntos y se cubrieron con parafilm con 3 orificios delgados en cada apertura del pocillo con muestra. Las muestras se secaron en un total de 12 horas.
- Luego del proceso, se selló con film de placa de PCR y se recubrió con parafilm; se guardó a 20° C hasta el momento del envío para secuenciamiento.

### **2.8.2. Transferencia de embriones**

Posterior a la extracción de la muestra, los embriones fueron transferidos y evaluados los ovarios de la receptora, por vía rectal donde se determinó si existe cuerpo lúteo (CL > 16mm), indicando si el bovino se encuentra apta para recibir el embrión; así mismo se determinó que la transferencia sea depositada, donde se encuentre el CL, de manera similar a lo anterior mencionado el bovino receptor será limpiada y anestesiada.

Teniendo los embriones ya identificados según su estadio y calidad, así como la respectiva identificación de padre, madre y raza, fue realizada las transferencias utilizando una pistola de transferencia de embriones (21”) con fundas con punta de

acero y camisetas, donde la pistola fue dirigida al cuerno lipso lateral del CL funcional, para que el embrión sea depositado en el tercio craneal del cuerno uterino.

## **2.9. Diagnóstico de preñez**

Se realizó después de 28 a 30 días de transferido el embrión, mediante ultrasonografía (Ecógrafo Portátil *Tringa Linear Easote Europe - Piemedical*), con frecuencia de 7.5 Gz.

## **2.10. Análisis de datos bioinformáticos**

Para el análisis del microbioma del gen 16S rRNA se utilizó QIIME2 versión 2022.2 (Bolyen et al., 2019) a través del lenguaje de programación Python en el servidor de bioinformática del Laboratorio de Fisiología Molecular de la Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza (UNTRM). Se siguió el flujo de trabajo del programa QIIME2 para analizar los archivos fastq.gz forward y reverse a fin de verificar la calidad de las lecturas. Se demultiplexó las secuencias acordes, con las secuencias de código de barras que se adquirieron en el proceso de secuenciación. Luego, se construyó una metadata con información referente a las variables a analizar con respecto a las muestras de mucosa uterina bovina, segmento uterino (mitad craneal del cuerno uterino, "C" y cuerpo uterino, "U") y estado de preñez (control, "C"; No preñado, "N" y preñado, "Y"). Posterior a ello, se realizó el proceso de recorte de los adaptadores de secuencia y la eliminación de ruido, secuencias ambiguas, duplicadas, de baja calidad, quimeras y otras, a través del método denoise-paired mediante el plugin DADA2, para continuar con el análisis solo hasta las posiciones 226 y 208 de las lecturas forward y reverse, respectivamente. Con las secuencias representativas y de alta calidad se aplicó la clasificación taxonómica con la base de datos Greengenes y el clasificador sklearn, obteniendo las tablas de taxonomía y Unidades Taxonómicas Operativas (OTU) en formato ".qza". Además, se usó la rarefacción alfa para excluir secuencias con un conteo insuficiente de lecturas por muestra.

Para analizar la diversidad bacteriana, se calcularon los índices de diversidad alfa y beta a partir de la tabla completa de OTUs. La diversidad alfa por segmento uterino muestreado, y estado de preñez se realizó mediante índices de Shannon ( $p < 0.05$ ). La diversidad beta se realizó con el Análisis de coordenadas principales (PCoA), basado en el índice de Bray-Curtis por raza, y la distancia UniFrac no ponderada por estado de preñez y segmento uterino.

### III. RESULTADOS

#### 3.1.Eficiencia de extracción de muestra de ADN de dos segmentos uterinos (útero cuerno uterino)

Se trabajó con 53 animales pertenecientes a los distritos de olleros, Yambrasbamba y Cuispes los cuales fueron evaluados y seleccionados para la transferencia de embriones, solo se obtuvo una muestra aceptable en base a la calidad, rendimiento y pureza de ADNg de 24 animales; estos superaban la concentración mínima de ADN (20 ng/ul) y parámetros de pureza ( $A_{260}/A_{280}$  entre 1.8 y 2.0) requeridos para secuenciamiento de nueva generación (NGS) (Tabla 5).

**Tabla 5** Parámetros de cuantificación de ADN extraído de mucosa de dos segmentos uterinos.

N° INDIVIDUO	CÓDIGO DE MUESTRA (NGS)	CONCENTRACIÓN DE ADN (ng/ul)	$A_{260}/A_{280}$ *
2	U2	129,8	1,87
5	U5	116,7	1,8
7	U7	48,6	1,75
10	U10	39,2	1,81
	C10	31	1,81
12	U12	39,2	1,82
	C12	37,6	1,84
13	U13	66,7	1,88
14	U14	174,7	1,86
15	C15	122,1	1,8
	U15	44,5	1,82
17	C17	92,5	1,85
18	U18	66,3	1,84
	C18	44,3	1,73
22	C22	27,9	1,84
23	U23	90,1	1,8
	C23	62,5	1,82
36	U36	54,4	1,86
	C36	24,2	1,85
37	U37	34,7	1,68
38	U38	40,9	1,72
	C38	80,6	1,81
39	C39	64,5	1,8
42	U42	57,2	1,9
43	U43	44,2	1,87
	C43	75,1	1,86
45	C45	64	1,79
47	U47	36,2	1,86
49	U49	182,8	1,87
50	U50	22,2	1,88
52	C52	31,7	1,88
53	C53	29	1,91

Mediante prueba Tukey se determinó que del total de microbioma encontrado en el útero, no se encontraron diferencias en cuanto a calidad, pero al comparar número de partos si se obtuvo diferencia significativa para la concentración de ADN ( $p > 0.005$ ) (Tabla 6).

**Tabla 6** Eficiencia de extracción de ADN (20 ng/ul) respecto a la concentración y parámetros de pureza (A260/268 entre 1.8 y 2.0) de muestras de microbioma de dos segmentos uterinos.

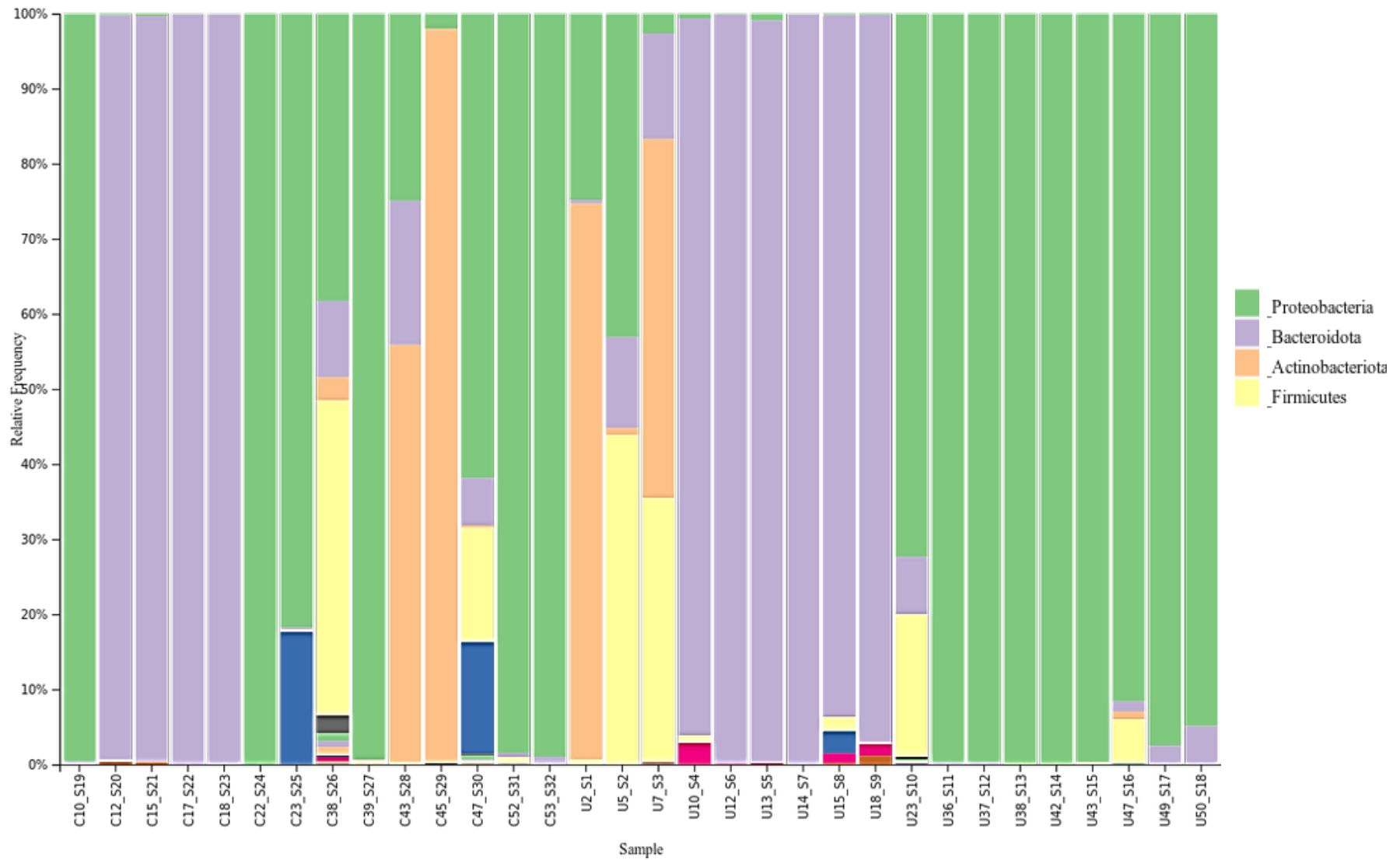
<b>Id</b>	<b>[] ADN (ng/ul)</b>	<b>A<sub>260/268</sub></b>
<b>Número de partos(a)</b>		
0 a 2 partos (14)	50.54±24.29b	1.84±0.04a
3 a 5 partos (14)	66.72±43.67b	1.82±0.07a
6 a 7 partos (4)	108.45±54.52a	1.83±0.03a
<i>p-valor</i>	<i>0.039</i>	<i>0.500</i>

Letras diferentes en columnas indican diferencias significativas al nivel de  $p < 0.05$ , (a) comparación múltiple con la prueba de tukey y (b) comparación con la prueba T para muestras independientes.

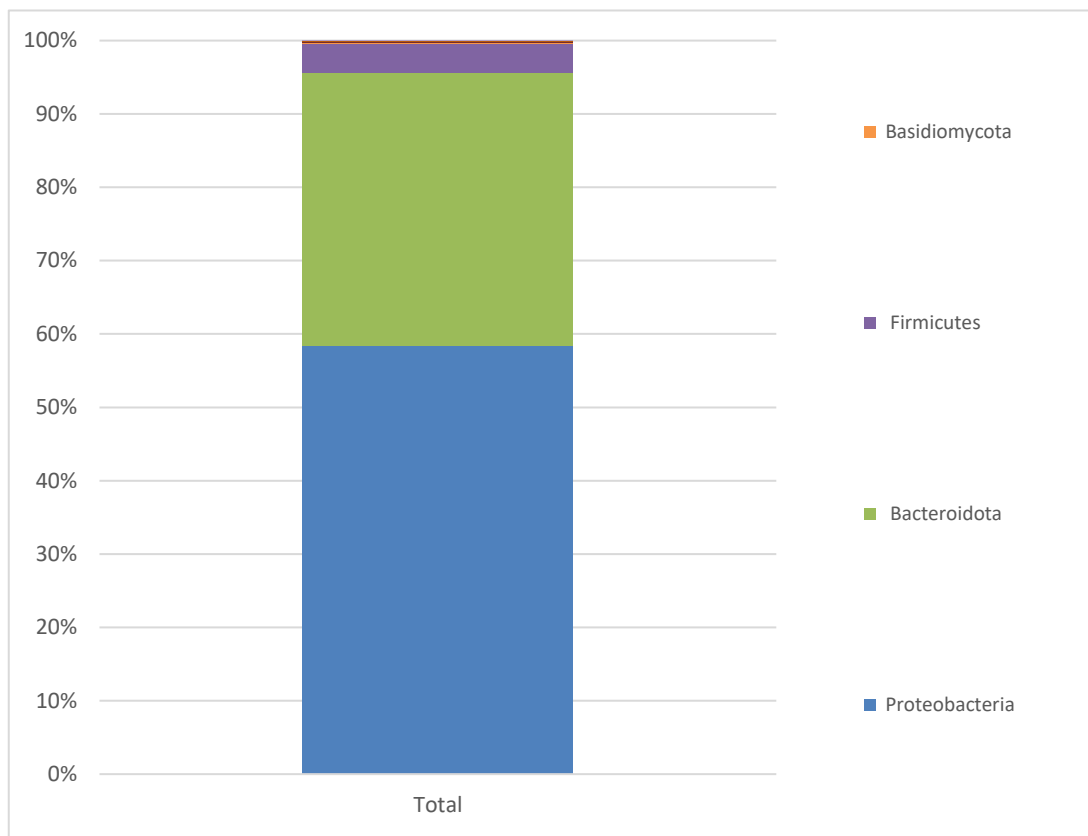
### **1.1.Composición bacteriana en muestras de mucosa procedente de dos segmentos uterinos (Cuerpo útero y cuerno del útero)**

Se realizó la evaluación de la abundancia relativa de las 32 muestras obtenidas para determinar su composición bacteriana por phylums de muestras de mucosa uterina, donde el secuenciamiento de las regiones hipervariables V3-V4 del gen 16S rARN generó un total de 4.4 millones de lecturas en las 32 muestras secuenciadas, con una media de 124 mil lecturas por muestra, de las cuales se validaron el 99.98% de las secuencias. La abundancia relativa de los componentes bacterianos varía en los diferentes individuos y agrupamientos realizados (**Figura 8**). Sin embargo, en la totalidad de muestras evaluadas existe en mayor abundancia el phylum Proteobacteria del 52.54%, seguido del phylum Bacteroidetes con un 33.44%; también se reportó la presencia del phylum Actinobacteriota (8.62%), Firmicutes (3.58%), Basidiomycota (0.16%) entre otros en menor presencia (**Figura 9**).



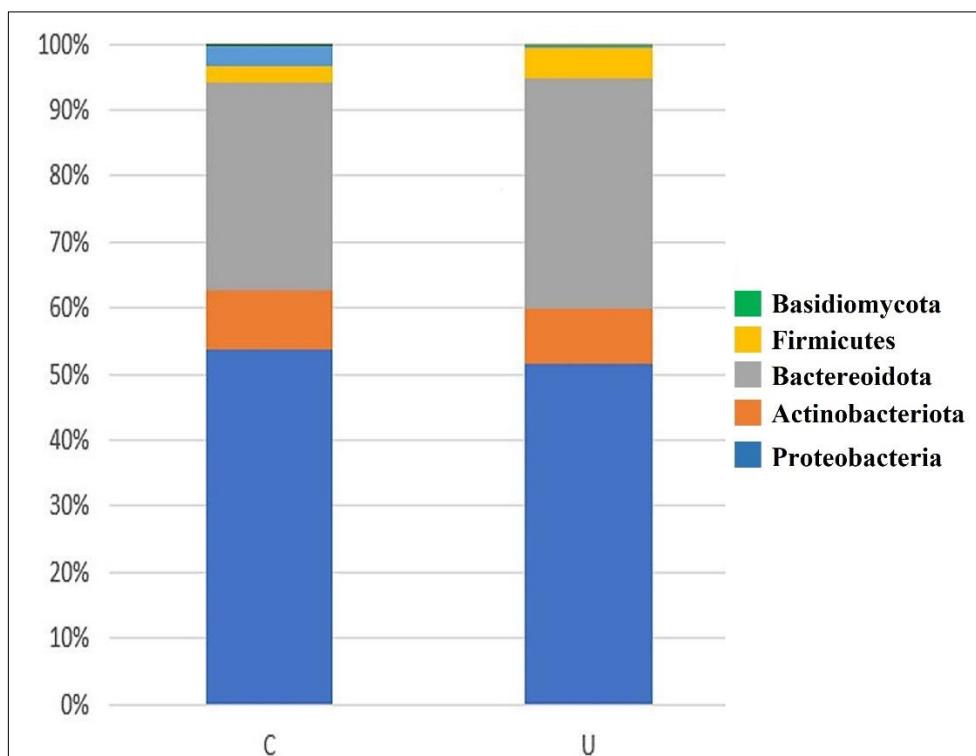


**Figura 8** Composición bacteriana por phylums de muestras de mucosa uterina a partir del secuenciamiento de la región V3-V4 del gen 16S rARN evidenciados a partir de Qiime2.com

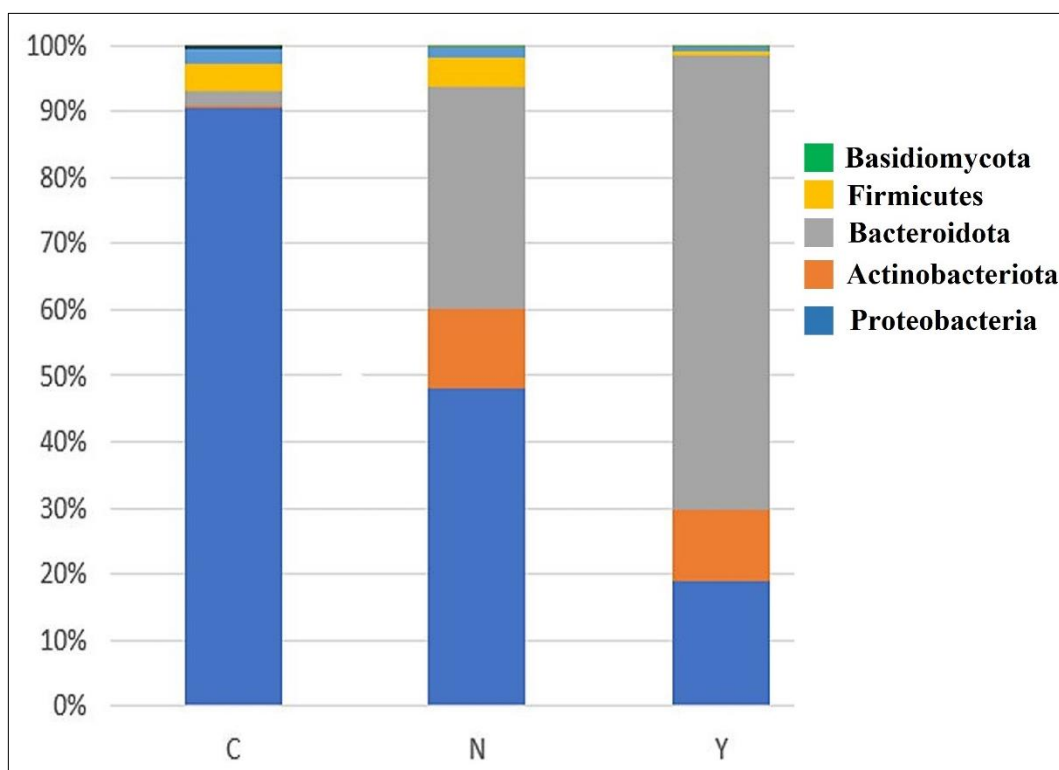


**Figura 9** Abundancia relativa total de la composición bacteriana por phylum de muestras de mucosa uterina a partir del secuenciamiento de la región V3-V4 del gen 16s ARNr.

El análisis de la composición del microbioma según los individuos mostró similitud en la distribución de porcentajes de presencia en individuos. La composición según segmento uterino muestreado difiere principalmente en los porcentajes del phylum Firmicutes, con 2.5% y 1.0% de abundancia presente en mucosa de cuerpo uterino y cuerno uterino, respectivamente (**Figura 10**). Para el agrupamiento según estado de preñez, se tomó como control a individuos que no se transfirieron embriones, esto para comparar con aquellos que hubo un éxito en la implantación de embriones con respecto a los que no la hubo; así, se encontró que hay una alta abundancia de *Bacteroidetes* (70%) y presencia representativa de proteobacteria (19%) en los individuos dónde hubo implantación embrionaria, es decir, bovinos preñadas; por otro lado, la predominancia de casi el 50% de proteobacteria es característico en los individuos en que no hubo éxito en la implantación (**Figura 11**).

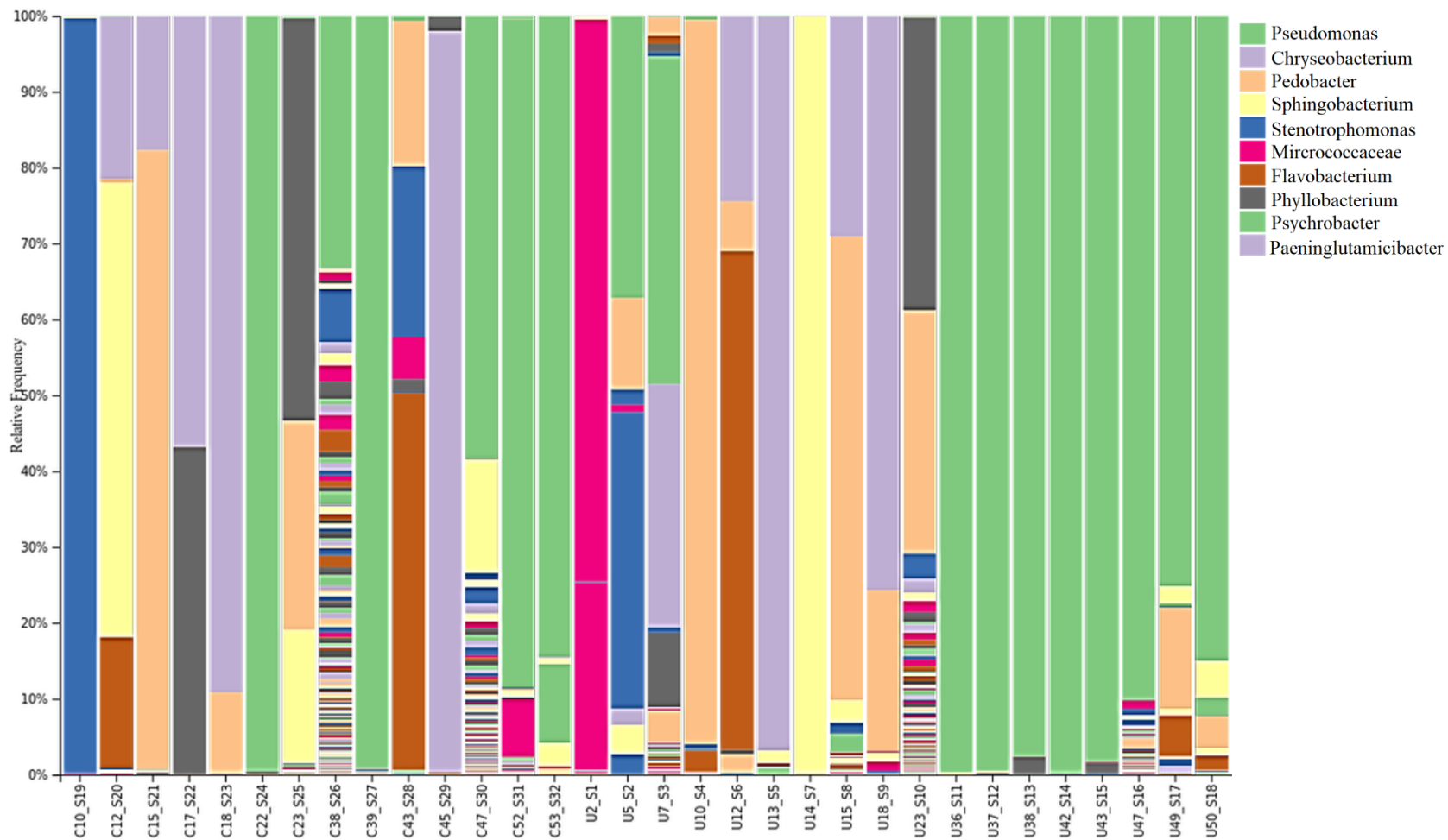


**Figura 10** Abundancia relativa de la composición bacteriana por Phylums de muestras de mucosa uterina. Agrupación según segmento de colecta (mucosa del cuerpo uterino: “U” y mitad craneal del cuerno uterino: “C”), Firmicutes, con 2.5% y 1.0% de abundancia de CU

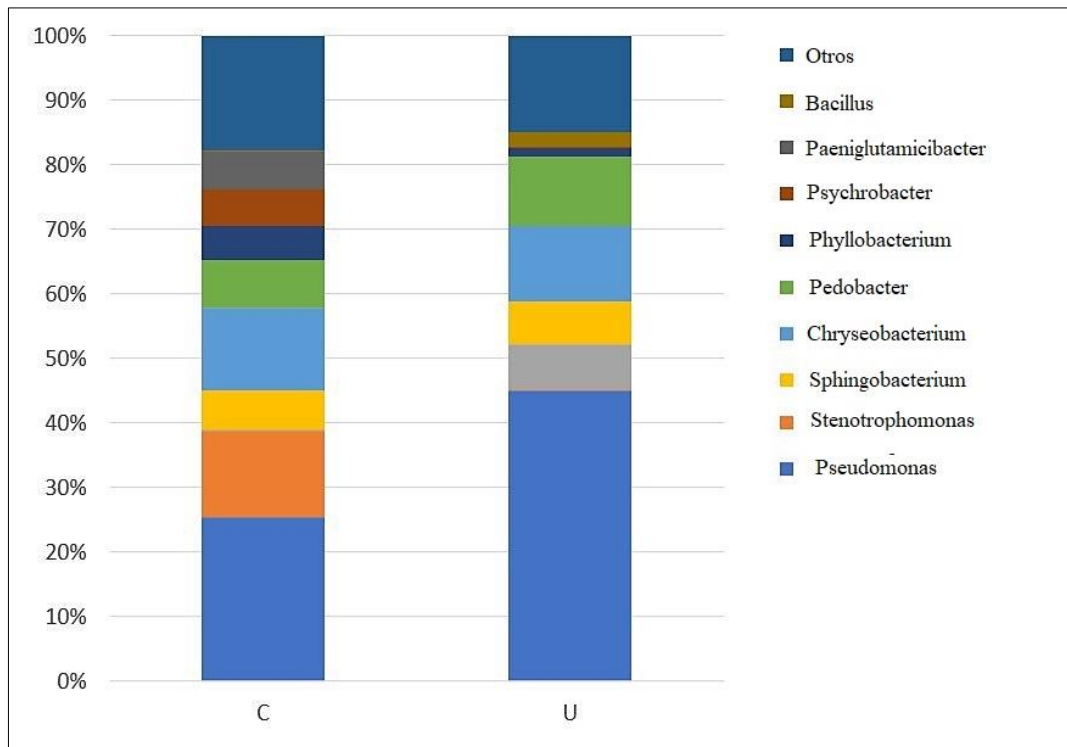


**Figura 11** Abundancia relativa de la composición bacteriana por phylums de muestras de mucosa uterina. Agrupación según estado de preñez (no preñada: “N”, preñada: “Y” y control “C”).

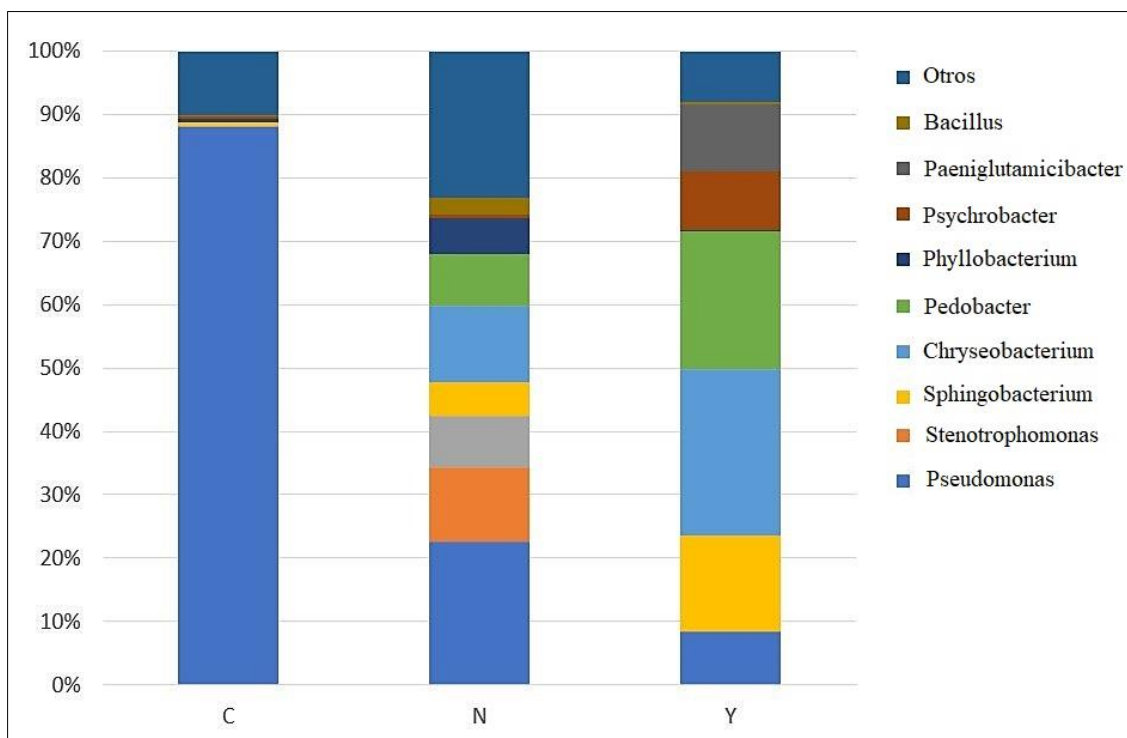
En el análisis por género de la totalidad de muestras evaluadas se puede evidenciar que existen consorcios bacterianos muy predominantes en ciertos individuos, resultando en una baja diversidad de presencia de géneros en estos, así mismo, se observó individuos con una alta diversidad de géneros presentes en su composición bacteriana (**Figura 12**). Los análisis de género por grupo revelaron diferencias en cada categoría. Los géneros *Stenotrophomonas*, *Psychrobacter*, *Phyllobacterium* y *Paeniglutamicibacter* son representativos en las muestras de mucosa de la mitad craneal del cuerno uterino, en cambio en las muestras de mucosa de pared uterina predomina la presencia de *Pseudomonas*, *Bacillus* y el género no catalogado de la familia (**Figura 13**). Se observó, la alta prevalencia de *Pseudomonas* (aproximadamente el 90%) en el grupo donde no se realizaron transferencias embrionarias, no obstante, géneros como *Sphingobacterium*, *Chryseobacterium*, *Pedobacter*, *Psychrobacter* y *Paeniglutamicibacter* son más abundantes en aquellos donde si hubo una exitosa implantación embrionaria a comparación con el grupo que no hubo preñez (**Figura 14**). Al realizar la comparación entre composición del microbioma en segmento de colecta de bovinos preñadas se observa que en el cuerpo uterino, la similitud de predominancia con la composición general de todos los animales muestreados es de los géneros *Chryseobacterium*, *Pedobacter*, *Psychrobacter* y *Paeniglutamicibacter* en comparación con la composición de la mitad craneal del cuerpo uterino, donde repite la presencia de los géneros *Chryseobacterium* y *Pedobacter*, sin embargo, existe la presencia de dos géneros adicionales uno presente en todas las bovinos muestreadas (*Sphingobacterium*) y otro que su presencia es más notoria en bovinos que no preñaron (*Stenotrophomonas*) (**Figura 15**).



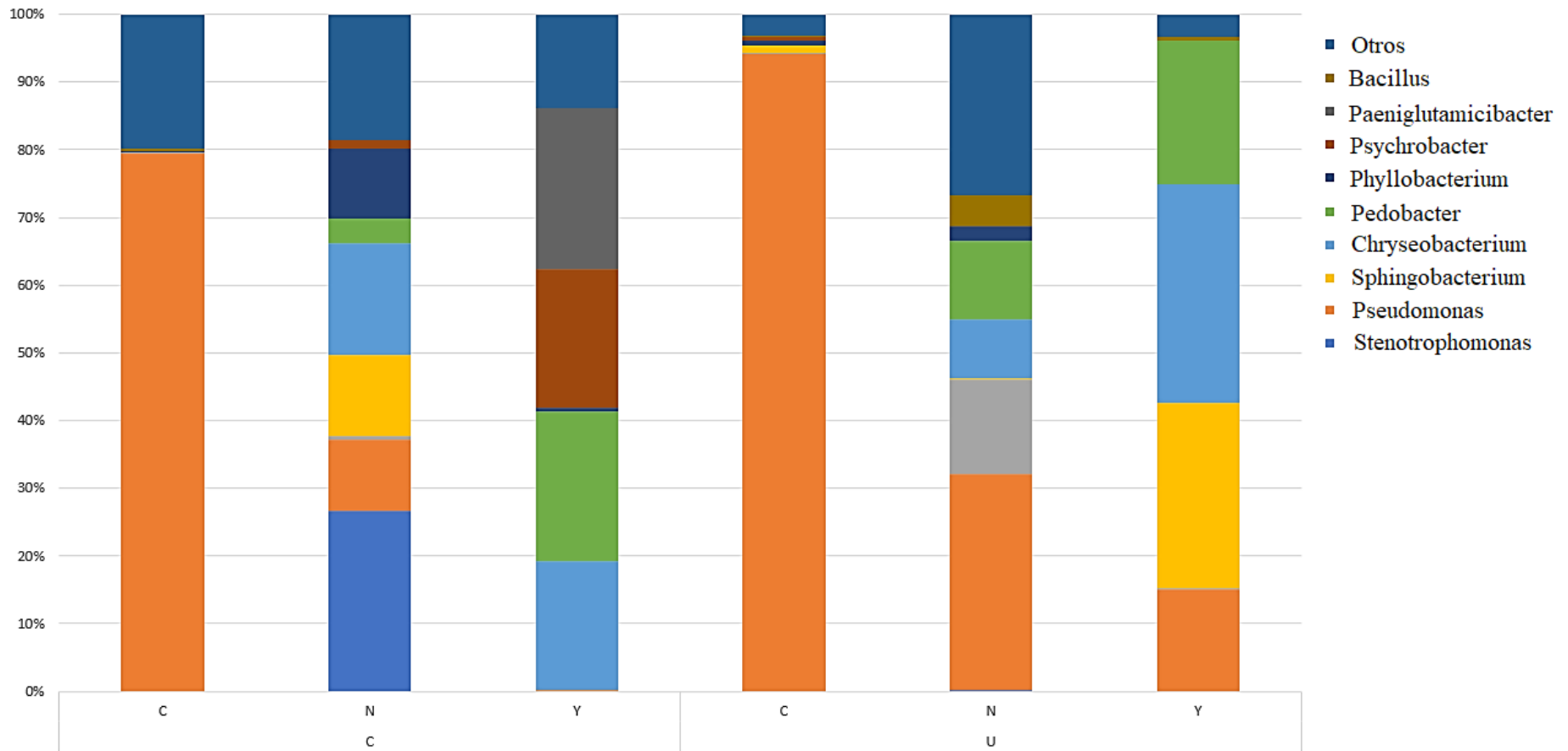
**Figura 12** Composición bacteriana por géneros de muestras de mucosa uterina a partir del secuenciamiento de la región V3-V4 del gen 16S rARN evidenciados a partir de Qiime2.com.



**Figura 13** Abundancia relativa de la composición bacteriana por género de muestras de mucosa uterina. Agrupación según segmento de colecta (mucosa del cuerpo uterino: “U” y mitad craneal del cuerno uterino: “C”).



**Figura 14** Abundancia relativa de la composición bacteriana por género de muestras de mucosa uterina. Agrupación según estado de preñez (no preñada: “N”, preñada: “Y” y control “C”).



**Figura 15.** Abundancia relativa de la composición bacteriana por género de muestras de mucosa uterina. Agrupación según estado de preñez (no preñada: “N”, preñada: “Y” y control “C”) y segmento de colecta (mucosa del cuerpo uterino: “U” y mitad craneal del cuerno uterino: “C”) de las bovinos preñadas.

#### IV. DISCUSIÓN

Santos y Bicalho et al (2012), mencionan que muy aparte de que un bovino se encuentre sana o enferma las principales bacterias que se encuentra en el ambiente uterino contiene los phylum Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria, Actinobacteria y otros taxones no asignados. Estas bacterias también están presentes en el microbioma intrauterino en seres humanos, pero la dominancia de algunas solo es en mujeres sanas, donde está compuesto principalmente por bacterias de los phylum Firmicutes y Proteobacteria (Fang et al 2016); conjuntamente Franasiak et al (2016), corroboraron la misma existencia en la evaluación del microbioma en mujeres sanas. Estos resultados son similares a los encontrados en los bovinos seleccionados para receptoras de embriones, donde la población de microbioma prevalente encontrada fue de los phylum Proteobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes, sin embargo, es importante mencionar que los géneros pertenecientes a estos phylum no son los mismo en humanos (*Lactobacillus*) que en bovinos (*Bacillus*, *Chryseobacterium*, *Pedobacter*, etc ) que tendrían funciones similares y que las variaciones encontradas entre animales también podrían estar influenciadas por la edad, asimismo, Aagaard et al. (2012) mencionan que en mujeres si existe una disminución respecto a riqueza y diversidad del microbioma uterino; esto sería importante porque permitiría determinar si en bovinos existe estas variaciones según la edad y número de partos. Similar a lo encontrado en el presente estudio al encontrarse diferencias significativas en concentración mas no en calidad.

Nguyen et al (2019), realizaron la caracterización del microbioma uterino en bovino post parto, logrando identificar la presencia en mayor abundancia del phylum Firmicutes, seguido de Proteobacterias y Bacteroidetes en bovinos sanos; mientras que para Swartz et al (2014) la comunidad bacteriana uterina tanto en ovinos como bovinos en diferentes estados gestacionales, estuvo dominada principalmente por los phylum Proteobacteria, Fusobacteria y Bacteroidetes. En nuestro estudio se realizó la evaluación del microbioma uterino en bovinos sanos antes de la transferencia embrionaria, donde también se observó la presencia de estos phylum, sin embargo, el de mayor abundancia fue Proteobacterias, seguido de Bacteroidetes y en una menor proporción Firmicutes. En otro estudio, Gonzales (2019) evaluó el microbioma nativo existente en el tracto reproductivo de la hembra bovina dentro de un protocolo de sincronización de celo, confirmando nuevamente la presencia de bacterias



de los phylum Bacteroidetes, Proteobacteria y Firmicutes. Al comparar estos resultados con los obtenidos, teniendo en cuenta que la muestra de microbioma fue extraída 20 días antes de iniciar el protocolo de sincronización (IATF), se encontró que en la mayoría de los animales muestreados existía la presencia de Proteobacteria, Bacteroidetes y Firmicutes, sin dejar de lado la presencia significativa de Actinobacteria.

Moreno et al (2016), realizaron la evaluación del microbioma endometrial presente en mujeres que lograron quedar embarazadas, existía la presencia de los phylum Actinobacteria y Firmicutes, siendo las cuatro principales bacterias: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Gardnerella* y *Streptococcus*, asociando principalmente el género *Lactobacillus* con estos resultados reproductivos favorables, sin embargo, además se encuentra presente *Stenotrophomonas* en baja concentración perteneciente al phylum Proteobacteria. El microbioma analizado en los segmentos del útero en bovinos y su posterior respuesta a la preñez, logro confirmar la nulidad de la existencia de las bacterias *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Gardnerella* y *Streptococcus*, no obstante, si se encontró la presencia de *Stenotrophomonas* (Proteobacteria), pero principalmente en bovinos que no se preñaron. En cambio, en bovinos que lograron con éxito la preñez, se encontraron las bacterias *Chryseobacterium* y *Sphingobacterium* pertenecientes al phylum Bacteroidetes y *Pedobacter* perteneciente al phylum Proteobacteria. Al comparar estos resultados con la ubicación de estas bacterias en las dos zonas uterinas se corroboró que, en la mitad craneal del cuerno uterino, que es la zona donde se realiza la mayoría de las transferencias de embriones, existe la presencia de *Stenotrophomonas*. Sin embargo, su proporción estaba equilibrada a la presencia de *Phyllobacterium* y *Psychrobacter* (phylum Proteobacteria) y *Paeniglutamibacter* (phylum Actinobacteria), las cuales están asociadas al éxito de preñez. Estos resultados muestran una relación con los de Jeon et al 2018, quienes evaluaron a bovinos con metritis, y la variación del microbioma uterina respecto un tratamiento con uso de antibióticos. Esto confirma que mientras los animales se recuperan, hay una población creciente de las Bacteroidetes seguido por Proteobacteria, Firmicutes y Fusobacteria, las cuales se asocian al microbioma de animales reproductivamente sanos.

Las muestras de los dos segmentos uterinos muestreados, dieron como resultado la dominancia de los phylum Proteobacteria (53%), Bacteroidetes (35%), Actinobacteriota (8%) y Firmicutes (3%) en la mayoría de los animales, sin tener en cuenta su selección para

la transferencia embrionaria o preñez. Esto demuestra que existe una gran variabilidad en las proporciones de las bacterias presentes entre animales y estado fisiológico. Sin embargo, casi siempre los taxones son los mismo, esto se puede comprobar en el estudio realizado por Miranda-CasoLuengo et al (2019), quienes evaluaron el microbioma uterino en bovinos post parto, encontrando seis phylum (Firmicutes (64%), Bacteroidetes (27,7%), Fusobacteria (2,9%), Proteobacteria (1,8%), Tenericutes (1,3%) y Actinobacteria (1,1%)).

## V. CONCLUSIONES

- Respecto a la eficiencia de extracción en concentración y pureza del ADN extraído de las muestras de microbioma no existe diferencia entre segmentos uterinos, pero si en relación al número de partos, donde a mayor cantidad se pudo extraer mejor calidad muestra de ADN.
- El microbioma uterino presente en receptoras de embriones bovinos fueron de los phylum Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria y Firmicutes. Al dividir su presencia por segmento evaluado, solo se observó una pequeña diferencia representativa entre el phylum Firmicutes presente en el cuerpo uterino (5%), a comparación del presente en la mitad craneal del cuerno uterino (2%).
- Evaluando por género presente en cada segmento, fue notorio la diferencia entre la presencia dominante de *Pseudomonas* en el cuerpo uterino, y la presencia única de *Bacillus* y géneros no catalogados, seguido de una mínima concentración de *Phyllobacterium*. Sin embargo, en la mitad craneal del cuerno uterino se ve dominado por *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y presencia única de *Physobacter* y *Paeniglutamicibacter*.
- El phylum existente en el microbioma uterino en mayor proporción, y que puede estar asociado a los resultados de preñez, es Bacteroidetes y Proteobacteria, sin dejar de lado Actinobacterias y en una mínima proporción Firmicutes. No obstante, respecto a los géneros más abundantes en bovinos que lograron preñar son: *Psychrobacter*, *Pedobacter* y *Pseudomonas*; *Paeniglutamicibacter*; *Chryseobacterium* y *Sphingobacterium*.

- Los segmentos del cuerpo uterino y mitad craneal del cuerno uterino evaluados en todos los animales muestreados, poseen más del 40% del microbioma uterino con los mismos géneros (*Chryseobacterium* y *Pedobacter*), diferenciándose por la presencia única de los géneros *Pseudomonas* y *Sphingobacterium* en el cuerpo uterino y *Psychrobacter* y *Paeniglutamicibacter* en mitad craneal del cuerno uterino.

## VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aagaard, K., Riehle, K., Ma, J., Segata, N., Mistretta, T. A., Coarfa, C., Raza, S., Rosenbaum, S., Van den Veyver, I., Milosavljevic, A., Gevers, D., Huttenhower, C., Petrosino, J., & Versalovic, J. (2012). A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. *PloS one*, 7(6), e36466. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036466>
- Adnane, M., Kaidi, R., Hanzen, C., & England, G. C. W. (2017). Risk factors of clinical and subclinical endometritis in cattle: A review. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 41(1), 1–11. <https://doi.org/10.3906/vet-1603-63>
- Agostinis, C., Mangogna, A., Bossi, F., Ricci, G., Kishore, U., & Bulla, R. (2019). Uterine immunity and microbioma: A shifting paradigm. *Frontiers in Immunology*, 10(OCT), 2387. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.02387/BIBTEX>
- Aguiar-Pulido, V., Huang, W., Suarez-Ulloa, V., Cickovski, T., Mathee, K., & Narasimhan, G. (2016). Metagenomics, Metatranscriptomics, and Metabolomics Approaches for Microbiome Analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 12(Suppl 1), 5. <https://doi.org/10.4137/EBO.S36436>
- Appiah, M. O., Wang, J., & Lu, W. (2020). Microflora in the reproductive tract of cattle: A review (running title: The microflora and bovine reproductive tract). *Agriculture (Switzerland)*, 10(6), 1–27. <https://doi.org/10.3390/agriculture10060232>
- Ault, T. B., Clemmons, B. A., Reese, S. T., Dantas, F. G., Franco, G. A., Smith, T. P. L., Edwards, J. L., Myer, P. R., & Pohler, K. G. (2019). Uterine and vaginal bacterial community diversity prior to artificial insemination between pregnant and nonpregnant postpartum cows. *Journal of Animal Science*, 97(10), 4298–4304. <https://doi.org/10.1093/JAS/SKZ210>

- Azawi, O. I. (2008). Postpartum uterine infection in cattle. *Animal Reproduction Science*, 105(3–4), 187–208. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2008.01.010>
- Azawi, O. I., Omran, S. N., & Hadad, J. J. (2008). A Study of Endometritis Causing Repeat Breeding of Cycling Iraqi Buffalo Cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(6), 735–743. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00981.x>
- Baker, J. M., Chase, D. M., & Herbst-Kralovetz, M. M. (2018). Uterine microbioma: Residents, tourists, or invaders? *Frontiers in Immunology*, 9(MAR). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00208>
- Barba, M., Martínez-Boví, R., Quereda, J. J., Mocé, M. L., Plaza-Dávila, M., Jiménez-Trigos, E., Gómez-Martín, Á., González-Torres, P., Carbonetto, B., & García-Roselló, E. (2020). Vaginal Microbioma Is Stable throughout the Estrous Cycle in Arabian Mares. *Animals* 2020, Vol. 10, Page 2020, 10(11), 2020. <https://doi.org/10.3390/ANI10112020>
- Berini, F., Casciello, C., Marcone, G. L., & Marinelli, F. (2017). Metagenomics: novel enzymes from non-culturable microbes. *FEMS Microbiology Letters*, 364(21). <https://doi.org/10.1093/FEMSLE/FNX211>
- Betteridge KJ (2003). Una historia de la transferencia de embriones de animales de granja y algunas técnicas asociadas. *Ciencia de la reproducción animal*, 79 (3-4), 203–244. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(03\)00166-0](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(03)00166-0)
- Boskey, E. R., Telsch, K. M., Whaley, K. J., Moench, T. R., & Cone, R. A. (1999). Acid Production by Vaginal Flora In Vitro Is Consistent with the Rate and Extent of Vaginal Acidification. *Infection and Immunity*, 67(10), 5170. <https://doi.org/10.1128/iai.67.10.5170-5175.1999>
- Boxberger, M., Cenizo, V., Cassir, N., & La Scola, B. (2021). Challenges in exploring and manipulating the human skin microbiome. *Microbiome* 2021 9:1, 9(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S40168-021-01062-5>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Costello, E. K., Berg-Lyons, D., Gonzalez, A., Stombaugh, J., Knights, D., Gajer, P., Ravel, J., Fierer, N., Gordon, J. I., & Knight, R. (2011).

Moving pictures of the human microbiome. *Genome Biology*, 12(5), 1–8.  
<https://doi.org/10.1186/GB-2011-12-5-R50/FIGURES/3>

Chen, C., Song, X., Wei, W., Zhong, H., Dai, J., Lan, Z., Li, F., Yu, X., Feng, Q., Wang, Z., Xie, H., Chen, X., Zeng, C., Wen, B., Zeng, L., Du, H., Tang, H., Xu, C., Xia, Y., ... Jia, H. (2017b). The microbioma continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nature Communications* 2017 8:1, 8(1), 1–11.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-017-00901-0>

Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., Brown, C. T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C. R., & Tiedje, J. M. (2014). Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D633. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT1244>

Corbeil, L. B. (2007). *Histophilus somni* host-parasite relationships. *Animal Health Research Reviews*, 8(2), 151–160. <https://doi.org/10.1017/S1466252307001417>

Costello, E. K., Lauber, C. L., Hamady, M., Fierer, N., Gordon, J. I., & Knight, R. (2009). Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. *Science* (New York, N.Y.), 326(5960), 1694.  
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1177486>

Cunha, F., Jeon, S. J., Kutzer, P., Jeong, K. C., & Galvão, K. N. (2019). Draft Genome Sequences of *Helcococcus ovis* Strains Isolated at Time of Metritis Diagnosis from the Uterus of Holstein Dairy Cows. *Microbiology Resource Announcements*, 8(22), 43–44. <https://doi.org/10.1128/mra.00402-19>

Davis, E. M. (2016). Gene Sequence Analyses of the Healthy Oral Microbiome in Humans and Companion Animals. *Journal of Veterinary Dentistry*, 33(2), 97–107.  
<https://doi.org/10.1177/0898756416657239>

Deguillaume, L., Geffré, A., Desquilbet, L., Dizien, A., Thoumire, S., Vornière, C., Constant, F., Fournier, R., & Chastant-Maillard, S. (2012). Effect of endocervical inflammation on days to conception in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95(4), 1776–1783. <https://doi.org/10.3168/JDS.2011-4602>

- Deng, F., McClure, M., Rorie, R., Wang, X., Chai, J., Wei, X., Lai, S., & Zhao, J. (2019). The vaginal and fecal microbiomes are related to pregnancy status in beef heifers. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 10(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0401-2>
- Fang, R. L., Chen, L. X., Shu, W. S., Yao, S. Z., Wang, S. W., & Chen, Y. Q. (2016). Barcoded sequencing reveals diverse intrauterine microbiomes in patients suffering with endometrial polyps. *American journal of translational research*, 8(3), 1581–1592.
- Fettweis, J. M., Serrano, M. G., Brooks, J. P., Edwards, D. J., Girerd, P. H., Parikh, H. I., Huang, B., Arodz, T. J., Edupuganti, L., Glascock, A. L., Xu, J., Jimenez, N. R., Vivadelli, S. C., Fong, S. S., Sheth, N. U., Jean, S., Lee, V., Bokhari, Y. A., Lara, A. M., ... Buck, G. A. (2019). The vaginal microbiome and preterm birth. *Nature Medicine* 2019 25:6, 25(6), 1012–1021. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0450-2>
- Franasiak, J. M., & Scott, R. T. (2015). Reproductive tract microbiome in assisted reproductive technologies. *Fertility and Sterility*, 104(6), 1364–1371. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2015.10.012>
- Franasiak, J. M., Werner, M. D., Juneau, C. R., Tao, X., Landis, J., Zhan, Y., Treff, N. R., & Scott, R. T. (2016). Endometrial microbiome at the time of embryo transfer: next-generation sequencing of the 16S ribosomal subunit. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 33(1), 129–136. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0614-z>
- Galvão, K N. (2012). Postpartum uterine diseases in dairy cows. *Anim Reprod*, 9, 290–296.
- Galvão, Klíbs N., Bicalho, R. C., & Jeon, S. J. (2019). Symposium review: The uterine microbiome associated with the development of uterine disease in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102(12), 11786–11797. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17106>
- Giannattasio-Ferraz, S., Laguardia-Nascimento, M., Gasparini, M. R., Leite, L. R., Araujo, F. M. G., de Matos Salim, A. C., de Oliveira, A. P., Nicoli, J. R., de Oliveira, G. C., da Fonseca, F. G., & Barbosa-Stancioli, E. F. (2019). A common vaginal microbioma composition among breeds of *Bos taurus indicus* (Gyr and Nellore). *Brazilian Journal of Microbiology* 2019 50:4, 50(4), 1115–1124. <https://doi.org/10.1007/S42770-019-00120-3>

- Gilbert, R. O. (2019). Symposium review: Mechanisms of disruption of fertility by infectious diseases of the reproductive tract. *Journal of Dairy Science*, 102(4), 3754–3765. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15602>
- Goltsman, D. S. A., Sun, C. L., Proctor, D. M., DiGiulio, D. B., Robaczewska, A., Thomas, B. C., Shaw, G. M., Stevenson, D. K., Holmes, S. P., Banfield, J. F., & Relman, D. A. (2018). Metagenomic analysis with strain-level resolution reveals fine-scale variation in the human pregnancy microbiome. *Genome Research*, 28(10), 1467–1480. <https://doi.org/10.1101/GR.236000.118>
- Gonzales, C. (2019). Microbioma nativa del tracto reproductor bovino: caracterización de cepas de *Escherichia coli* patogénicas y sensibilidad frente a extractos vegetales naturales. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Tucuman Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/82832>
- Gonzales-Marin, C., Spratt, D. A., Millar, M. R., Simmonds, M., Kempsey, S. T., & Allaker, R. P. (2011). Levels of periodontal pathogens in neonatal gastric aspirates and possible maternal sites of origin. *Molecular Oral Microbiology*, 26(5), 277–290. <https://doi.org/10.1111/J.2041-1014.2011.00616.X>
- Gonzalez Moreno, C., Fontana, C., Cocconcelli, P. S., Callegari, M. L., & Otero, M. C. (2016). Vaginal microbial communities from synchronized heifers and cows with reproductive disorders. *Journal of Applied Microbiology*, 121(5), 1232–1241. <https://doi.org/10.1111/JAM.13239>
- Greninger, A. L. (2018). The challenge of diagnostic metagenomics. 18(7), 605–615. <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1487292>
- Hansen P. J. (2020). Prospects for gene introgression or gene editing as a strategy for reduction of the impact of heat stress on production and reproduction in cattle. *Theriogenology*, 154, 190–202. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.05.010>
- Janssens, Y., Nielandt, J., Bronselaer, A., Debunne, N., Verbeke, F., Wynendaele, E., Van Immerseel, F., Vandewynckel, Y. P., De Tré, G., & De Spiegeleer, B. (2018). Disbiome database: Linking the microbiome to disease. *BMC Microbiology*, 18(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/S12866-018-1197-5/TABLES/1>

- Jeon, S. J., Cunha, F., Vieira-neto, A., Bicalho, R. C., Lima, S., Bicalho, M. L., & Galvão, K. N. (2017). Blood as a route of transmission of uterine pathogens from the gut to the uterus in cows. 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0328-9>
- Jeon, S. J., Lima, F. S., Vieira-Neto, A., Machado, V. S., Lima, S. F., Bicalho, R. C., Santos, J., & Galvão, K. N. (2018). Shift of uterine microbioma associated with antibiotic treatment and cure of metritis in dairy cows. *Veterinary microbiology*, 214, 132–139. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.12.022>
- Jeon, S. J., Vieira-Neto, A., Gobikrushanth, M., Daetz, R., Mingoti, R. D., Parize, A. C. B., de Freitas, S. L., da Costa, A. N. L., Bicalho, R. C., Lima, S., Casey Jeong, K., & Galvão, K. N. (2015). Uterine microbioma progression from calving until establishment of metritis in dairy cows. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(18), 6324–6332. <https://doi.org/10.1128/AEM.01753-15>
- Jovel, J., Patterson, J., Wang, W., Hotte, N., O’Keefe, S., Mitchel, T., Perry, T., Kao, D., Mason, A. L., Madsen, K. L., & Wong, G. K. S. (2016). Characterization of the gut microbiome using 16S or shotgun metagenomics. *Frontiers in Microbiology*, 7(APR), 459. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.00459/BIBTEX>
- Karstrup, C. C., Klitgaard, K., Jensen, T. K., Agerholm, J. S., & Pedersen, H. G. (2017). Presence of bacteria in the endometrium and placentomes of pregnant cows. *Theriogenology*, 99, 41–47. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2017.05.013>
- Knight, R., Callewaert, C., Marotz, C., Hyde, E. R., Debelius, J. W., McDonald, D., & Sogin, M. L. (2017). The Microbiome and Human Biology. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Genom-083115-022438>, 18, 65–86. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-GENOM-083115-022438>
- Knudsen, L. R. V., Karstrup, C. C., Pedersen, H. G., Agerholm, J. S., Jensen, T. K., & Klitgaard, K. (2015). Revisiting bovine pyometra-New insights into the disease using a culture-independent deep sequencing approach. *Veterinary Microbiology*, 175(2–4), 319–324. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.12.006>



- Kolodny, O., Callahan, B. J., & Douglas, A. E. (2020). The role of the microbiome in host evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 375(1808), 20190588. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2019.0588>
- Kolodny, O., & Schulenburg, H. (2020). Microbiome-mediated plasticity directs host evolution along several distinct time scales. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 375(1808), 20190589. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2019.0589>
- Laguardia-nascimento, M., Moreira, K., Ribeiro, G., Gasparini, R., Giannattasio-ferraz, S., Leite, L. R., & Marcos, F. (2015). Vaginal Microbiome Characterization of Nellore Cattle Using Metagenomic Analysis. 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143294>
- LeBlanc, S. J. (2008). Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 176(1), 102–114. <https://doi.org/10.1016/J.TVJL.2007.12.019>
- Lee, S. A., Lim, J. Y., Kim, B. S., Cho, S. J., Kim, N. Y., Kim, O. Bin, & Kim, Y. (2014). Comparison of the gut microbioma profile in breast-fed and formula-fed Korean infants using pyrosequencing. *Nutrition Research and Practice*, 9(3), 242–248. <https://doi.org/10.4162/NRP.2015.9.3.242>
- Liu, Y. X., Qin, Y., Chen, T., Lu, M., Qian, X., Guo, X., & Bai, Y. (2021). A practical guide to amplicon and metagenomic analysis of microbiome data. *Protein and Cell*, 12(5), 315–330. <https://doi.org/10.1007/S13238-020-00724-8/TABLES/3>
- Madoz, L. V., Giuliadori, M. J., Jaureguiberry, M., Plöntzke, J., Drillich, M., & de la Sota, R. L. (2013). The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *Journal of dairy science*, 96(7), 4333–4339. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-6269>
- Mahalingam, S., Dharumadurai, D., & Archunan, G. (2019). Vaginal microbiome analysis of buffalo (*Bubalus bubalis*) during estrous cycle using high-throughput amplicon sequence of 16S rRNA gene. *Symbiosis* 2019 78:1, 78(1), 97–106. <https://doi.org/10.1007/S13199-018-00595-Y>

- Martí, J. M., Martínez-Martínez, D., Rubio, T., Gracia, C., Peña, M., Latorre, A., Moya, A., & P. Garay, C. (2017). Health and Disease Imprinted in the Time Variability of the Human Microbiome. *MSystems*, 2(2). [https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00144-16/SUPPL\\_FILE/SYS002172097SF5.EPS](https://doi.org/10.1128/MSYSTEMS.00144-16/SUPPL_FILE/SYS002172097SF5.EPS)
- Martínez N, Herrera P, Birbe B, Domínguez C. (1998). Relación entre la condición corporal y la respuesta reproductiva de hembras bovinas de doble propósito. En: Madrid N, Soto E (eds). *Mejora de la ganadería mestiza de doble propósito*. Maracaibo, Venezuela: Astro Data. p 398-412.
- Martínez, JF, Galina, CS, Ortiz, P., Maquivar, MG, & Romero-Zúñiga, JJ (2021). Efectos de la estación sobre el rendimiento de las bovinos y terneros donantes y receptores desde el nacimiento hasta el destete en los programas de transferencia de embriones en los trópicos. *Animales: una revista de acceso abierto de MDPI*, 11 (12), 3596. <https://doi.org/10.3390/ani11123596>
- Miranda-CasoLuengo, R., Lu, J., Williams, E. J., Miranda-CasoLuengo, A. A., Carrington, S. D., Evans, A. C. O., & Meijer, W. G. (2019). Delayed differentiation of vaginal and uterine microbiomes in dairy cows developing postpartum endometritis. *PLoS One*, 14(1), e0200974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200974>
- McClure, M. (2018). *The Vaginal Microbiome Related to Reproductive Traits in Beef Heifers*. Graduate Theses and Dissertations. <https://scholarworks.uark.edu/etd/2799>
- Moeller, A. H., & Sanders, J. G. (2020). Roles of the gut microbioma in the adaptive evolution of mammalian species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 375(1808), 20190597. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2019.0597>
- Mogheiseh, A., Ahmadi, M. R., Nazifi, S., Mirzaei, A., & Fallah, E. (2020). Destination of corpus luteum in postpartum clinical endometritis cows and factors affecting self-recovery. *Veterinary and Animal Science*, 9, 100067. <https://doi.org/10.1016/J.VAS.2019.100067>
- Moore, S. G., Ericsson, A. C., Poock, S. E., Melendez, P., & Lucy, M. C. (2017). Hot topic: 16S rRNA gene sequencing reveals the microbiome of the virgin and pregnant bovine uterus. *Journal of Dairy Science*, 100(6), 4953–4960.

<https://doi.org/10.3168/JDS.2017-12592/ATTACHMENT/81E59E79-28D2-41D2-B87A-70F53587010D/MMC3.PDF>

- Mor, A., Driggers, P. H., & Segars, J. H. (2015). Molecular characterization of the human microbiome from a reproductive perspective. *Fertility and Sterility*, 104(6), 1344–1350. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2015.10.008>
- Moreno, I., Codoñer, F. M., Vilella, F., Valbuena, D., Martinez-Blanch, J. F., Jimenez-Almazán, J., Alonso, R., Alamá, P., Remohí, J., Pellicer, A., Ramon, D., & Simon, C. (2016). Evidence that the endometrial microbioma has an effect on implantation success or failure. *American journal of obstetrics and gynecology*, 215(6), 684–703. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.09.075>
- Moreno, I., & Franasiak, J. M. (2017). Endometrial microbioma—new player in town. *Fertility and Sterility*, 108(1), 32–39. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2017.05.034>
- Moreno, I., & Simon, C. (2019). Deciphering the effect of reproductive tract microbioma on human reproduction. *Reproductive Medicine and Biology*, 18(1), 40–50. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12249>
- Murase, K., Watanabe, T., Arai, S., Kim, H., Tohya, M., Ishida-Kuroki, K., Vō, T. H., Nguy, T. P. B., Nakagawa, I., Osawa, R., Nguyn, N. H., & Sekizaki, T. (2019). Characterization of pig saliva as the major natural habitat of *Streptococcus suis* by analyzing oral, fecal, vaginal, and environmental microbioma. *PLOS ONE*, 14(4), e0215983. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0215983>
- Neckovic, A., van Oorschot, R. A. H., Szkuta, B., & Durdle, A. (2019). Investigation of direct and indirect transfer of microbiomes between individuals. *Forensic Science International: Genetics*, 45, 102212. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2019.102212>
- Nelson, K. E., Weinstock, G. M., Highlander, S. K., Worley, K. C., Creasy, H. H., Wortman, J. R., Rusch, D. B., Mitreva, M., Sodergren, E., Chinwalla, A. T., Feldgarden, M., Gevers, D., Haas, B. J., Madupu, R., Ward, D. V., Birren, B. W., Gibbs, R. A., Methe, B., Petrosino, J. F., ... Zhu, D. (2010). A Catalog of Reference Genomes from the

Human Microbiome. *Science* (New York, N.Y.), 328(5981), 994.  
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1183605>

Nesengani, L. T., Wang, J., Yang, Y., Yang, L., & Lu, W. (2017). Unravelling vaginal microbial genetic diversity and abundance between Holstein and Fleckvieh cattle. *RSC Advances*, 7(88), 56137–56143. <https://doi.org/10.1039/C7RA10553C>

Nguyen, T. T., Miyake, A., Tran, T., Tsuruta, T., & Nishino, N. (2019). The Relationship between Uterine, Fecal, Bedding, and Airborne Dust Microbioma from Dairy Cows and Their Environment: A Pilot Study. *Animals: an open access journal from MDPI*, 9(12), 1007. <https://doi.org/10.3390/ani9121007>

Otero, C., Saavedra, L., Silva De Ruiz, C., Wilde, O., Holgado, A. R., & Nader-Macías, M. E. (2000). Vaginal bacterial microflora modifications during the growth of healthy cows. *Letters in Applied Microbiology*, 31(3), 251–254. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2672.2000.00809.X>

Ott, S. J., Musfeldt, M., Wenderoth, D. F., Hampe, J., Brant, O., Fölsch, U. R., Timmis, K. N., & Schreiber, S. (2004). Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut*, 53(5), 685–693. <https://doi.org/10.1136/GUT.2003.025403>

Parfrey, L. W., Moreau, C. S., & Russell, J. A. (2018). Introduction: The host-associated microbiome: Pattern, process and function. *Molecular Ecology*, 27(8), 1749–1765. <https://doi.org/10.1111/mec.14706>

Pelzer, E., Gomez-Arango, L. F., Barrett, H. L., & Nitert, M. D. (2017). Review: Maternal health and the placental microbiome. *Placenta*, 54, 30–37. <https://doi.org/10.1016/J.PLACENTA.2016.12.003>

Peng, Y., Wang, Y. H., Hang, S. Q., & Zhu, W. Y. (2013). Microbial diversity in uterus of healthy and metritic postpartum Holstein dairy cows. *Folia Microbiologica* 2013 58:6, 58(6), 593–600. <https://doi.org/10.1007/S12223-013-0238-6>

Piersanti, R. L., & Bromfield, J. J. (2019). The Consequence of Postpartum Uterine Disease on Dairy Cow Fertility. *Edis*, 2019(2), 1–4. <https://doi.org/10.32473/edis-an354-2019>

- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S. K., McCulle, S. L., Karlebach, S., Gorle, R., Russell, J., Tacket, C. O., Brotman, R. M., Davis, C. C., Ault, K., Peralta, L., & Forney, L. J. (2011). Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(SUPPL. 1), 4680–4687. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1002611107/SUPPL\\_FILE/ST08.XLSX](https://doi.org/10.1073/PNAS.1002611107/SUPPL_FILE/ST08.XLSX)
- Rodrigues, N. F., Kästle, J., Coutinho, T. J. D., Amorim, A. T., & Campos, G. B. (2015). Qualitative analysis of the vaginal microbioma of healthy cattle and cattle with genital-tract disease. *14(2)*, 6518–6528.
- Rosenberg, E., & Zilber-Rosenberg, I. (2016). Microbes drive evolution of animals and plants: The hologenome concept. *MBio*, 7(2), e01395-15. <https://doi.org/10.1128/MBIO.01395-15>.
- Ross, A. A., Rodrigues Hoffmann, A., & Neufeld, J. D. (2019). The skin microbiome of vertebrates. *Microbiome* 2019 7:1, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S40168-019-0694-6>
- Rutlant, J., López-Béjar, M., & López-Gatius, F. (2005). Ultrastructural and rheological properties of bovine vaginal fluid and its relation to sperm motility and fertilization: a review. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 40(2), 79–86. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0531.2004.00510.X>
- Rutlant, J., López-Béjar, M., Santolaria, P., Yániz, J., & López-Gatius, F. (2002). Rheological and ultrastructural properties of bovine vaginal fluid obtained at oestrus. *Journal of Anatomy*, 201(1), 53–60. <https://doi.org/10.1046/J.1469-7580.2002.00069.X>
- Santos, T. M., & Bicalho, R. C. (2012). Diversity and succession of bacterial communities in the uterine fluid of postpartum metritic, endometritic and healthy dairy cows. *PloS one*, 7(12), e53048. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053048>
- Saini, P., Singh, M., & Kumar, P. (2019). Fungal endometritis in bovines. *Open Veterinary Journal*, 9(1), 94–98. <https://doi.org/10.4314/OVJ.V9I1.16>

- Schoenmakers, S., Steegers-Theunissen, R., & Faas, M. (2019). The matter of the reproductive microbiome. *Obstetric Medicine*, 12(3), 107–115. <https://doi.org/10.1177/1753495X18775899>
- Seksik, P., Rigottier-Gois, L., Gramet, G., Sutren, M., Pochart, P., Marteau, P., Jian, R., & Doré, J. (2003). Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut*, 52(2), 237. <https://doi.org/10.1136/GUT.52.2.237>
- Serrano, M., Climent, E., Freire, F., Martínez-Blanch, J. F., González, C., Reyes, L., Solaz-Fuster, M. C., Calvo, J. H., Jiménez, M. Á., & Codoñer, F. M. (2020). Influence of the Ovine Genital Tract Microbioma on the Species Artificial Insemination Outcome. A Pilot Study in Commercial Sheep Farms. *High-Throughput 2020*, Vol. 9, Page 16, 9(3), 16. <https://doi.org/10.3390/HT9030016>
- Serrano, M. G., Parikh, H. I., Brooks, J. P., Edwards, D. J., Arodz, T. J., Edupuganti, L., Huang, B., Girerd, P. H., Bokhari, Y. A., Bradley, S. P., Brooks, J. L., Dickinson, M. R., Drake, J. I., Duckworth, R. A., Fong, S. S., Glascock, A. L., Jean, S., Jimenez, N. R., Khoury, J., ... Buck, G. A. (2019). Racioethnic diversity in the dynamics of the vaginal microbiome during pregnancy. *Nature Medicine*, 25(6), 1001–1011. <https://doi.org/10.1038/S41591-019-0465-8>
- Shallali<sup>1</sup>, A. A., Hussein, Salih, A. M. ;, & Dafalla<sup>3</sup>, M. M. (2001). A Preliminary Report on Bacteria isolated from the Female Genital Tract of Sudanese Sheep and Goats. *The Sudan J. Vet. Res*, 17, 55–63. [www.sudanjvr.net](http://www.sudanjvr.net)
- Sharma, A., Singh, M., Kumar, P., Sharma, A., Majid Jan, A., & Sharma, P. (2017). Postpartum Uterine Infections in Cows and Factors Affecting it-A Review. Article in *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(9), 1020–1028. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.609.123>
- Sheldon, I. M., & Dobson, H. (2004). Postpartum uterine health in cattle. *Animal Reproduction Science*, 82–83, 295–306. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2004.04.006>
- Sheldon, I. Martin, Cronin, J. G., & Bromfield, J. J. (2019). Tolerance and Innate Immunity Shape the Development of Postpartum Uterine Disease and the Impact of Endometritis

in Dairy Cattle. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Animal-020518-115227>, 7, 361–384. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ANIMAL-020518-115227>

Sheldon, I. Martin, Cronin, J., Goetze, L., Donofrio, G., & Schuberth, H. J. (2009). Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biology of Reproduction*, 81(6), 1025–1032. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.109.077370>

Sicsic, R., Goshen, T., Dutta, R., Kedem-Vaanunu, N., Kaplan-Shabtai, V., Pasternak, Z., Gottlieb, Y., Shpigel, N. Y., & Raz, T. (2018). Microbial communities and inflammatory response in the endometrium differ between normal and metritic dairy cows at 5-10 days post-partum. *Veterinary Research*, 49(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/S13567-018-0570-6/FIGURES/5>

Singer, E., Bushnell, B., Coleman-Derr, D., Bowman, B., Bowers, R. M., Levy, A., Gies, E. A., Cheng, J. F., Copeland, A., Klenk, H. P., Hallam, S. J., Hugenholtz, P., Tringe, S. G., & Woyke, T. (2016). High-resolution phylogenetic microbial community profiling. *The ISME Journal* 2016 10:8, 10(8), 2020–2032. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.249>

Smith, S. B., & Ravel, J. (2017). The vaginal microbioma, host defence and reproductive physiology. *The Journal of Physiology*, 595(2), 451–463. <https://doi.org/10.1113/JP271694>

Styková\*, E., Nemcová, R., Gancaršová, S., Valocká, I., & Lauková, A. (2014). Bovine vaginal lactobacilli and their adherence to mucus in different phases of the estrous cycle. *African Journal of Microbiology Research*, 8(32), 3017–3024. <https://doi.org/10.5897/AJMR2014.6886>

Suttner, B., Johnston, E. R., Orellana, L. H., Rodriguez-R, L. M., Hatt, J. K., Carychao, D., Carter, M. Q., Cooley, M. B., & Konstantinidis, K. T. (2020). Metagenomics as a public health risk assessment tool in a study of natural creek sediments influenced by agricultural and livestock runoff: Potential and limitations. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(6). [https://doi.org/10.1128/AEM.02525-19/SUPPL\\_FILE/AEM.02525-19-SD002.XLSX](https://doi.org/10.1128/AEM.02525-19/SUPPL_FILE/AEM.02525-19-SD002.XLSX)

- Swartz, J. D., Lachman, M., Westveer, K., O'Neill, T., Geary, T., Kott, R. W., Berardinelli, J. G., Hatfield, P. G., Thomson, J. M., Roberts, A., & Yeoman, C. J. (2014). Characterization of the Vaginal Microbioma of Ewes and Cows Reveals a Unique Microbioma with Low Levels of Lactobacilli and Near-Neutral pH. *Frontiers in veterinary science*, 1, 19. <https://doi.org/10.3389/fvets.2014.00019>
- Tang, G., Kitten, T., Munro, C. L., Wellman, G. C., & Mintz, K. P. (2008). EmaA, a potential virulence determinant of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in infective endocarditis. *Infection and Immunity*, 76(6), 2316–2324. <https://doi.org/10.1128/IAI.00021-08>
- Turnbaugh, P. J., & Gordon, J. I. (2009). The core gut microbiome, energy balance and obesity. *The Journal of Physiology*, 587(Pt 17), 4153. <https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2009.174136>
- Turner, P. V. (2018). The role of the gut microbioma on animal model reproducibility. *Animal Models and Experimental Medicine*, 1(2), 109. <https://doi.org/10.1002/AME2.12022>
- Van Der Burget, G., Clark, W., & Knight, R. (2007). Cattle fertility problems and *Histophilus somni*. *The Veterinary Record*, 160(17), 600. <https://doi.org/10.1136/VR.160.17.600>
- Wang, J., Liu, C., Nesengani, L. T., Gong, Y., Yang, Y., Yang, L., & Lu, W. (2019). Comparison of vaginal microbial community structure of beef cattle between luteal phase and follicular phase. *Indian Journal of Animal Research*, 53(10), 1298–1303. <https://doi.org/10.18805/IJAR.B-949>
- Wang, J., Sun, C., Liu, C., Yang, Y., & Lu, W. (2016). Comparison of vaginal microbial community structure in healthy and endometritis dairy cows by PCR-DGGE and real-time PCR. *Anaerobe*, 38, 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.ANAEROBE.2015.11.004>
- Wang, M. L., Liu, M. C., Xu, J., An, L. G., Wang, J. F., & Zhu, Y. H. (2018). Uterine Microbioma of Dairy Cows With Clinical and Subclinical Endometritis. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.02691>



- Wang, Y., Wang, J., Li, H., Fu, K., Pang, B., Yang, Y., Liu, Y., Tian, W., & Cao, R. (2018). Characterization of the cervical bacterial community in dairy cows with metritis and during different physiological phases. *Theriogenology*, 108, 306–313. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2017.12.028>
- Wani, A. K., Hashem, N. M., Akhtar, N., Singh, R., Madkour, M., & Prakash, A. (2022). Understanding microbial networks of farm animals through genomics, metagenomics and other meta-omic approaches for livestock wellness and sustainability. *Annals of Animal Science*. <https://doi.org/10.2478/AOAS-2022-0002>
- Werner, A., Suthar, V., Plöntzke, J., & Heuwieser, W. (2012). Relationship between bacteriological findings in the second and fourth weeks postpartum and uterine infection in dairy cows considering bacteriological results. *Journal of Dairy Science*, 95(12), 7105–7114. <https://doi.org/10.3168/JDS.2012-5627>
- White, B. A., Creedon, D. J., Nelson, K. E., & Wilson, B. A. (2011). The vaginal microbiome in health and disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 22(10), 389. <https://doi.org/10.1016/J.TEM.2011.06.001>
- Williams, E. J., Fischer, D. P., Pfeiffer, D. U., England, G. C. W., Noakes, D. E., Dobson, H., & Sheldon, I. M. (2005). Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology*, 63(1), 102–117. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.03.017>
- Yaseen, S. A. S., Al-Maaly, N. M. H., & Al-Rubaie, E. M. M. (2019). Isolation and identification of pathogenic bacteria from vaginal cavity of sheep and goats in Iraq. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 13(4), 2295–2299. <https://doi.org/10.22207/JPAM.13.4.44>
- Yeoman, C. J., Ishaq, S. L., Bichi, E., Olivo, S. K., Lowe, J., & Aldridge, B. M. (2018). Biogeographical Differences in the Influence of Maternal Microbial Sources on the Early Successional Development of the Bovine Neonatal Gastrointestinal tract. *Scientific Reports* 2018 8:1, 8(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21440-8>
- Yildirim, S., Yeoman, C. J., Janga, S. C., Thomas, S. M., Ho, M., Leigh, S. R., Consortium, P. M., White, B. A., Wilson, B. A., & Stumpf, R. M. (2014). Primate vaginal

microbiomes exhibit species specificity without universal *Lactobacillus* dominance.  
The ISME Journal, 8(12), 2431–2444. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.90>

Zaid, N. W. (2009). Vaginal flora of Iraqi sheep and goats during different reproductive stages. *J. Vet. Sci*, 2(1).

## VII. ANEXOS

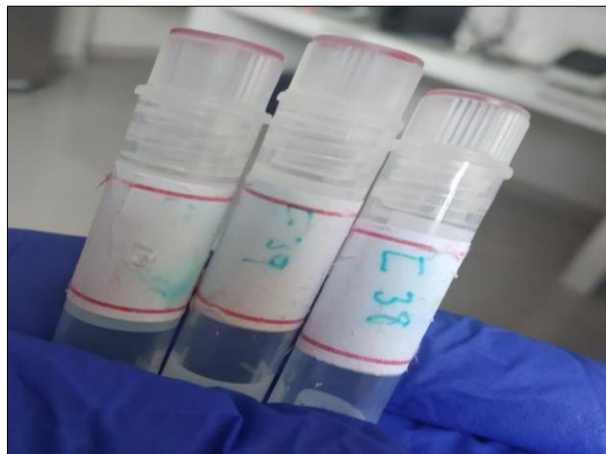
N°	DISTRITO	RAZA	N° PARTOS	CÓDIGO DE MUCOSA DE PARED UTERINA	CÓDIGO DE MUCOSA DE CUERNO UTERINO	TIPPO DE EMBRION TRANSFERIDO	PREÑEZ
2	OLLEROS	BROW SWISS	3	U-2	C-2**	MOET FRESCO	NO
5	OLLEROS	BROW SWISS CRUZADA*	2	U-5	C-5**	MOET CONG.	NO
7	OLLEROS	BROW SWISS	1	U-7	C-7**	MOET FRESCO	NO
10	OLLEROS	BROW SWISS	4	U-10	C-10	MOET FRESCO	NO
12	OLLEROS	BROW SWISS	1	U-12	C-12	MOET CONG.	NO
13	OLLEROS	SIMENTAL CRUZADO*	4	U-13	C-13**	MOET FRESCO	SÍ***
14	OLLEROS	BROW SWISS	7	U-14	C-14**	MOET FRESCO	SÍ***
15	OLLEROS	BROW SWISS CRUZADA*	7	U-15**	C-15	MOET FRESCO	SÍ***
17	OLLEROS	BROW SWISS CRUZADA*	6	U-17**	C-17	MOET CONG.	SÍ***
18	OLLEROS	BROW SWISS CRUZADA*	3	U-18	C-18	MOET CONG.	NO
22	YAMBRASBAMBA	SIMMENTAL	2	U-22**	C-22	---	---
23	YAMBRASBAMBA	SIMMENTAL	3	U-23	C-23	MOET FRESCO	NO
36	OLLEROS	BROWN SWISS	2	U-36	C-36**	MOET CONG.	NO
37	OLLEROS	HOLSTEIN-F1*	5	U-37	C-37**	MOET CONG.	SI***
38	OLLEROS	BROWN SWISS	4	U-38	C-38	---	---
39	OLLEROS	HOLSTEIN CRUZADO*	1	U-39**	C-39	---	---
42	OLLEROS	BROWN SWISS	1	U-42	C-42**	---	---
43	OLLEROS	HOLSTEIN CRUZADO*	1	U-43	C-43	MOET FRESCO	NO
45	OLLEROS	HOLSTEIN CRUZADO*	1	U-45**	C-45	MOET CONG.	SI***
47	CUISPES	SIMMENTAL	5	U-47	C-47**	---	---
49	CUISPES	SIMMENTAL	4	U-49	C-49**	MOET FRESCO	NO
50	CUISPES	SIMMENTAL	2	U-50	C-50**	---	---
52	CUISPES	SIMMENTAL	0	U-52**	C-52	MOET FRESCO	SI***
53	CUISPES	CRUCE B/S*	3	U-53**	C-53	MOET FRESCO	NO

**Tabla 7** Información sobre el lugar de muestreo, raza, número de partos, códigos de muestras realizadas, tipo de embrión transferido y estado de preñez de los individuos incorporados al análisis molecular.

## Panel fotográfico de las actividades realizadas en laboratorio



**Imagen A.** Preparación de reactivos del Kit de extracción PURELINK® MINI KIT



**Imagen B.** Muestras de mucosa intrauterina suspendidas en 2mL de PBS



**Imagen C.** Pellet de mucosa intrauterina luego de la centrifugación



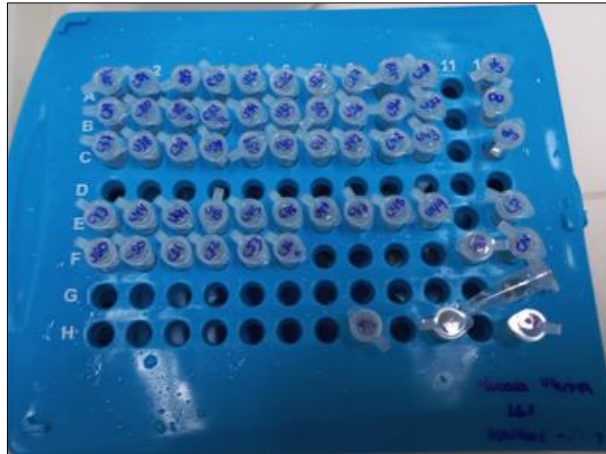
**Imagen D.** Proceso de digestión de las muestras. A. Incubación de las muestras en el “Mini Dry Bath”. B. Imagen de la muestra digerida.



**Imagen E.** Procedimiento de extracción y conservación de ADN.



**Imagen F.** Cuantificación de muestras de ADN mediante Nanodrop One.



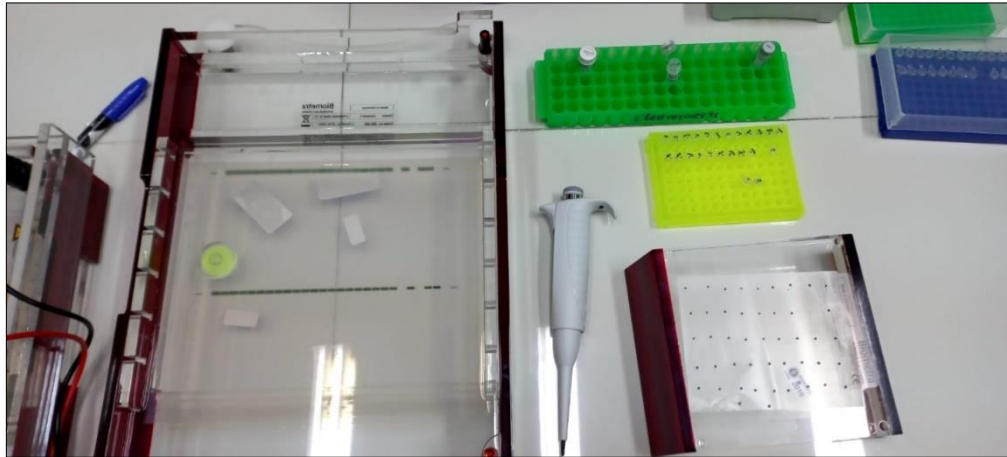
**Imagen H** *Amplificados de 16S de las muestras de ADN de mucosa uterina bovina*



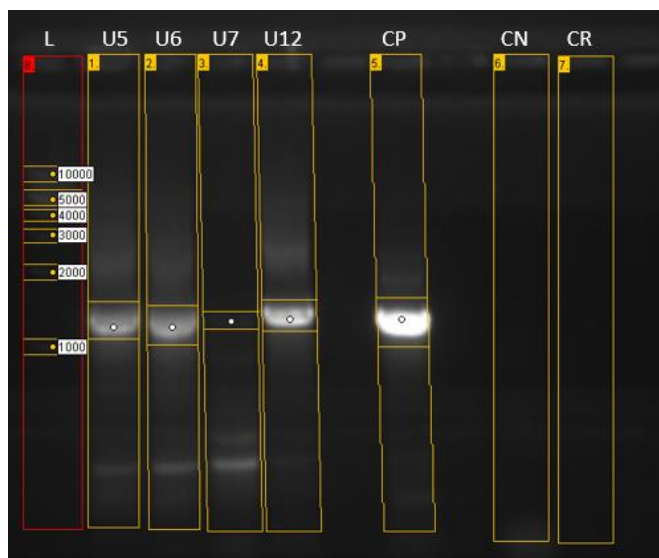
**Imagen I.** *Electroforesis y lectura de gel de Agarosa de 11 pocillos*



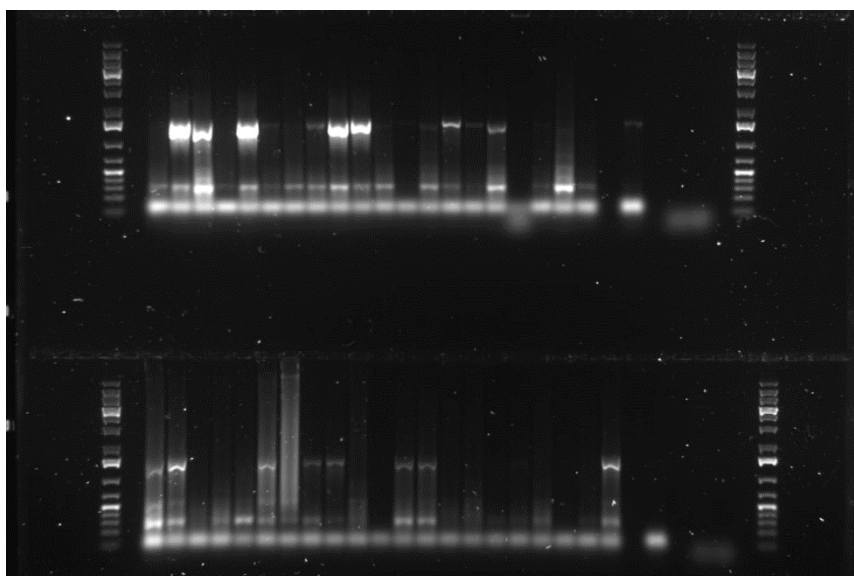
**Imagen J.** *Preparación de los geles de agar de 36 y 18 pocillos, respectivamente.*



**Imagen K.** Sembrado de los amplificados de 16S en el agar al 0.8% de 36 pocillos.



**Imagen L.** Análisis de gel de prueba. L: ladder; U5-U6-U7-U12: muestras de mucosa uterina bovina; CP: control positivo (*E. coli*); CN: control negativo; CR: control de reactivos.



**Imagen M.** Lectura de los amplificados de 16S en el agar al 0.8% de 36 pocillos.