

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**



**Trabajo de Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias Veterinarias**

**DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE VACAS REPETIDORAS  
EN TAMBOS DE LA CUENCA ABASTO SUR**

**Autor: MV, María Jaureguiberry**

**Director: MV, MSc, PhD, DECAR, Rodolfo Luzbel de la Sota**

**Codirector: MV, PhD, Marcelo Pecoraro**

**Lugar de Trabajo: Laboratorio de Reproducción Animal,  
Laboratorio de Virología,  
Facultad de Ciencias Veterinarias,  
Universidad Nacional de La Plata**

**Miembros del Jurado:  
MV, MSc, PhD, DACT, Julián Bartolomé  
MV, DrCsVet, Santiago Callejas  
MV, DrCsVet, Luis Fazzio**

**La Plata, 3 de julio de 2017**

*“Hay una fuerza motriz más poderoso que el vapor, la electricidad y la energía  
atómica: la voluntad”*

**Albert Einstein**

**DEDICATORIA**

*A mi esposo Juan Martín y a mi hija Rosario,*

*A mis padres Catalina y Alejandro.*

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. R. Luzbel de la Sota, por brindarme con generosidad sus conocimientos y experiencias en el área científica, por confiar en mí y darme la posibilidad de conocer otros grupos de trabajo y sobre todo por su gran corazón.

Agradezco también a mi codirector, el Dr. Marcelo Pecoraro, y especialmente al Dr. Marco Tizziano, por haberme guiado en el estudio de expresión génica y haberme brindado su laboratorio para realizar todas las pruebas necesarias.

A la Dra. Vanina Madoz y al Dr. Mauricio Giuliadori, quienes a través de sus conocimientos y experiencias me han ayudado, aconsejado y apoyado en la realización de este trabajo.

Al Dr. Tomás B. Díaz Pernía, quien, con gran calidez y total desinterés, me brindó todo lo que tenía a su disposición para que pueda llevar a cabo este trabajo. Además, le agradezco por haberme transmitido sus conocimientos sobre esta hermosa profesión y sobre los valores importantes de la vida.

A las Dras. Silvina Quintana, Maia Marín y Mercedes Burucua por brindarme su valiosa ayuda en el procesamiento de las muestras correspondientes al estudio de expresión génica. Realmente fue un placer trabajar con ellas.

A los colegas veterinarios Tomás Díaz Pernía, Edgardo Alvarez, Roberto Chiavonne, Ignacio, Conrado, Juan Francisco y Norberto Céspedes, Santiago Uranga, Sebastián Rollie, Javier Roldán, Germán Domínguez y Horacion Lagomarcino por haber colaborado con los muestreos y con la recolección de datos.

A los productores y personal de trabajo, por haberme permitido, con total generosidad, utilizar sus animales para los trabajos experimentales y colaborar durante los muestreos.

A todos los integrantes de la Cátedra de Reproducción Animal, especialmente a Lore, Walter, Joaquín, Facundo y Ramiro por brindarme su ayuda cada vez que la necesité y por todos los gratos momentos que hemos pasado juntos.

A los Drs. Marc Drillich y Monika Ehling-Schulz por haberme dirigido en el experimento correspondiente al capítulo IV, y a todo su equipo de trabajo por su colaboración en la realización del mismo.

A la Dra. Afra Mang, por haber colaborado en la primera etapa de este largo trabajo.

A la Universidad Nacional de La Plata, por haberme permitido realizar mis estudios de grado, y por haberme becado para iniciar mis estudios de posgrado.

Al CONICET, por haberme becado para finalizar mis estudios de posgrado.

A los jurados por sus sugerencias y correcciones que permitieron enriquecer el trabajo.

A mi familia, mis padres, hermanas, tías, cuñados y sobrinos; por el cariño y apoyo incondicional de siempre.

A Juan Martín, mi esposo, por ayudarme con los muestreos cuando yo no podía realizarlos y porque junto a Rosario, nuestra hija, llenan mis días de felicidad.

## INDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE TABLAS .....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>PUBLICACIONES REALIZADAS DE LA TESIS.....</b>	<b>XII</b>
<b>TITULO: DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE VACAS REPETIDORAS EN TAMBOS DE LA CUENCA ABASTO SUR .....</b>	<b>XIV</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>XIV</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>XVI</b>
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL.....</b>	<b>1</b>
<b>CAUSAS.....</b>	<b>3</b>
<b>1. Factores externos .....</b>	<b>3</b>
1.2. Desbalance nutricional .....	3
1.2. Problemas de manejo.....	6
<b>2. Factores internos.....</b>	<b>7</b>
2.1. Infecciones.....	7
2.2. Desbalances hormonales .....	9
2.3. Factores genéticos .....	10
<b>TRATAMIENTOS.....</b>	<b>11</b>
<b>ÚLTIMOS AVANCES EN VACAS REPETIDORAS .....</b>	<b>15</b>
<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>16</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES .....</b>	<b>16</b>
<b>HIPÓTESIS RELEVANTES .....</b>	<b>17</b>

<b>CAPÍTULO II .....</b>	<b>19</b>
<b>DIAGNÓSTICO, PREVALENCIA Y TRATAMIENTO DE VACAS REPETIDORAS CON Y SIN ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA.....</b>	<b>19</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>19</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
Diseño experimental.....	22
Análisis estadístico .....	26
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>30</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>33</b>
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>34</b>
<b>COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA ENDOMETRIAL EN VACAS REPETIDORAS Y VACAS FÉRTILES DURANTE EL DIESTRO .....</b>	<b>34</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>34</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
Diseño experimental.....	40
Análisis estadístico .....	46
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>48</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>

<b>CAPÍTULO IV .....</b>	<b>54</b>
<b>IDENTIFICACIÓN DE ESCHERICHIA COLI Y TRUUPERLLA PYOGENES POR MARCHA BACTERIOLÓGICA CONVENCIONAL Y ESPECTROSCOPIA INFRARROJA TRANSFORMADA DE FOURIER EN VACAS LECHERAS .....</b>	<b>54</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>54</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>57</b>
Diseño experimental.....	57
Análisis estadístico .....	60
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>60</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>61</b>
<b>CONCLUSINES.....</b>	<b>65</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>66</b>
<b>BIOGRAFÍA PERSONAL.....</b>	<b>68</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>70</b>
<b>APÉNDICE I .....</b>	<b>87</b>



**LISTA DE ABREVIATURAS**

ATB	Antibióticos
BE	Benzoato de estradiol
CB	Cytobrush
CC	Condición corporal
DIV	Dispositivo intravaginal
dpp	Días postparto
E <sub>2</sub>	Estrógenos
EC	Endometritis clínica
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ES	Endometritis subclínica
IA	Inseminación artificial
IATF	Inseminación artificial a tiempo fijo
im	Intramuscular
IPC	Intervalo parto concepción
P <sub>4</sub>	Progesterona
PMN	Polimorfo nucleares neutrófilos
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real
SVR	Síndrome de Vaca repetidora
US	Ultrasonografía
VR	Vacas Repetidoras

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1.1. Desempeño reproductivo de vacas en lactancia sin problemas reproductivos y desempeño reproductivo de vacas repetidoras (adaptado de Yusuf y col., 2010).....	2
2.1. Análisis descriptivo de las vacas repetidoras incluidas en el estudio.....	29
2.2. Efecto del líquido en la luz uterina sobre el porcentaje de preñez a la primera inseminación artificial post muestreo en vacas repetidoras .....	29
2.3. Aislamientos bacterianos de vacas repetidoras con y sin endometritis subclínica.....	29
2.4. Efecto de la endometritis subclínica en el porcentaje de preñez a la primera inseminación de vacas repetidoras diagnosticadas por cytobrush o por ultrasonografía.....	30
2.5. Efecto del tratamiento realizado a vacas repetidoras con o sin endometritis subclínica sobre el riesgo de quedar preñadas a la primera inseminación artificial .....	30
3.1. Secuencia de los cebadores forward (F) y reverse (R), tamaño del producto de PCR y su referencia .....	45
4.1. Efecto del grado de descarga vaginal en el riesgo de aislar <i>Escherichia coli</i> y <i>Trueperella pyogenes</i> en vacas lecheras .....	62

**LISTA DE FIGURAS**

Figura	Página
1.1. Efecto del balance energético negativo (BEN) profundo sobre la reproducción.....	5
1.2. Efecto de la disminución de la pulsatilidad de LH y/o anormal concentración de metabolitos en sangre (glucosa, ácidos grasos no esterificados, $\beta$ -hidroxibutirato) sobre la reproducción en vacas lecheras .....	6
2.1. Diseño experimental y asignación de tratamientos correspondientes a cada grupo.....	26
3.1. Comparación de la expresión relativa de ARNm del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), factor Nodal (FNod) y de la enzima prostaglandina-endoperóxido sintasa (PTGS2) en vacas repetidoras (VR) y vacas fértiles (CF) .....	48
3.2. Comparación de la expresión relativa de ARNm del receptor de estradiol (ER) y del receptor de progesterona (RP) en vacas repetidoras (VR) y vacas fértiles (CF) .....	49

## PUBLICACIONES REALIZADAS DE LA TESIS

### Congresos

1. **Jaureguiberry M**, Mang AV, Drillich M, de la Sota RL. 2013. Diagnosis and treatment of repeat breeder cows in dairy herds from Argentina. International Meeting of the Society for Biology of Reproduction & 46th Annual Conference of Physiology and Pathology of Reproduction. Gdansk, Poland. February 27-March 1. Poster.
2. **Jaureguiberry M**, Mang AV, Madoz LV, Álvarez E, Chiabone R, Díaz Pernía T, Díaz Pernía T, Pecoraro M, Drillich M, de la Sota RL. Diagnóstico y tratamiento de vacas repetidoras con y sin endometritis subclínica en tambos de la cuenca Abasto Sur. IX Simposio Internacional de Reproducción Animal. IRAC. Córdoba 04, 05 y 06 de Julio de 2013. Presentación oral y poster.
3. **Jaureguiberry M**, Madoz LV, Giuliadori MJ, Wagener K, Prunner I, Grunert T, Ehling-Schulz M, Drillich M, de la Sota RL. 2015. Identificación de bacterias uterinas por espectrofotometría infrarroja en vacas de tambo entre 5 y 60 días postparto. XI Simposio Internacional de Reproducción Animal. IRAC. Córdoba 14, 15 y 16 de agosto de 2015. Presentación de poster N°414.
4. **Jaureguiberry M**, Giuliadori MJ, Madoz LV, de la Sota RL. Diagnóstico de endometritis subclínica por ultrasonografía. VI Jornadas Jóvenes

investigadores. CABA, 10 de junio de 2016. Facultad de Ciencias Veterinarias, UBA. Presentación oral.

5. **Jaureguiberry M**, Giuliadori MJ, Madoz LV, Mang AV, Pothmann H, Drillich M, de la Sota. 2016. Diagnosis and treatments of repeat breeder cows in Argentina. 18<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction. ICAR. Tour, Francia, 26-30 de Junio. Poster presentation: PW1018.

### Revistas

1. **Jaureguiberry M**, Madoz LV, de la Sota RL. 2015. Actualización en el síndrome de vaca repetidora. *Taurus*. 65:14-19.
2. **Jaureguiberry M**, Madoz LV, Giuliadori MJ, Drillich M, de la Sota RL. 2016. Espectroscopia infrarroja transformada de Fourier para identificar bacterias uterinas patógenas en vacas lecheras. *Revista Veterinaria*. ISSN (papel): 1668-4834. ISSN (on line): 1669-6840.
3. **Jaureguiberry M**, Madoz LV, Giuliadori MJ, Wagener K, Prunner I, Ehling-Schulz M, Drillich M, de la Sota RL. 2016. Identification of *Escherichia coli* and *Trueperella pyogenes* isolated from the uterus of dairy cows using routine bacteriological testing and Fourier transform infrared spectroscopy. 58:81. *Acta Vet Scand*. Factor de impacto: 1.230. DOI: 10.1186/s13028-016-0262-z.
4. **Jaureguiberry M**, Giuliadori MJ, Mang AV, Madoz LV, Pothmann H, Drillich M, and R. L. de la Sota. 2016. Repeat breeder cows with fluid in their uterine lumens had poorer fertility. 100:1-3. Factor de impacto: 2.854. *J Dairy Sci*. DOI:10.3168/jds.2016-11406.

**TITULO: Diagnóstico y tratamiento de vacas repetidoras en tambos de la cuenca abasto sur**

**PALABRAS CLAVES:** Vacas repetidoras, subfertilidad, endometritis subclínica, ultrasonografía, expresión génica endometrial, RT-qPCR, FT-IR.

**RESUMEN:** Las vacas repetidoras (VR) se caracterizan por ser clínicamente sanas, pero fallan en quedar preñadas luego de 3 o más inseminaciones. Este es un problema frecuente en nuestros rodeos lecheros que genera grandes pérdidas económicas. Numerosos trabajos afirman que las causas son múltiples (desórdenes nutricionales, infecciones, desbalances hormonales, factores genéticos, manejo). Dentro de éstas, parecen ser importantes las que modifican el ambiente uterino. La endometritis subclínica (ES) y la alteración de la expresión del factor de crecimiento epidérmico (EGF) a nivel endometrial podrían ser responsables del síndrome de vaca repetidora. Se determinó la prevalencia de ES en VR por cytobrush (n= 432) y por ultrasonografía (N= 358). Se evaluó la eficacia de cefapirina benzatínica intrauterina (grupo tratado, n=38; grupo control, n= 46) en VR con ES, y un protocolo de sincronización a celo detectado (grupo tratado, n= 135; grupo control; n= 136) en VR sin ES. Los resultados obtenidos determinaron que la ES no es la causa principal de infertilidad en las VR. La detección de  $\geq 2$  mm de luz uterina está relacionada con un menor riesgo de preñez en VR. Por último, el tratamiento con cefapirina benzatínica en VR con ES y el protocolo de sincronización en VR sin ES no tuvieron efecto beneficioso en los porcentajes de preñez. Posteriormente, se estudiaron mecanismos moleculares relacionados con subfertilidad en VR. Para esto, se evaluó la expresión endometrial de los receptores de progesterona, estrógeno y EGF, al factor nodal (FNod) y la enzima prostaglandina endoperóxido

sintasa (PTGS2), por RT-qPCR en tiempo real en VR (n= 16) y vacas fértiles (n= 9). Los resultados obtenidos demuestran que hubo diferencias significativas en la expresión del EGFR, FNod, y PTGS2. Por último, teniendo en cuenta la aparición, cada vez más frecuente, de cepas bacterianas resistentes; se realizó un estudio en el que se comparó la marcha bacteriológica convencional (n = 64) y la espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FT-IR, n = 27) como métodos diagnósticos (simple, relativamente rápido y de bajo costo) para la identificación de bacterias patógenas uterinas. Los resultados obtenidos determinaron que, mediante la técnica de FT-IR es posible identificar *E. coli* y *T. pyogenes*.

**TITLE: Diagnosis and treatments of repeat breeder cows in Argentina**

**KEY WORDS:** Repeat breeder cows, subfertility, subclinical endometritis, ultrasonography, endometrial gene expression, RT-qPCR, FT-IR.

**SUMMARY:** The repeat breeder cows (RBC) are defined as clinically normal cows that fail to conceive after at least three consecutive insemination. This is a frequent problem in dairy farms that cause important economic losses. Numerous researches agree that there are multiple causes (nutritional disorders, infections, hormonal imbalance, genetic factors, management). Among them, the alteration of the uterine environment seems to be an important one. It is possible that subclinical endometritis (SE) and the alteration of the endometrial expression of epidermal growth factor are responsible for RBC. The prevalence of SE in RBC was diagnosed by cytobrush (n= 432) and by ultrasonography (N= 358). The efficacy of an intrauterine treatment of benzathine cephapirin (treatment group, n=38; control group, n= 46) in RBC with SE, and a synchronization protocol (treatment group, n= 135; control group; n= 136) in RBC without SE were tested. The results showed that SE is not the main cause of RBC. The detection of  $\geq 2$  mm of fluid in uterine lumen was associated with lower odds for pregnancy in RBC. Finally, neither the antimicrobial treatment with cephapirin benzathine in RBC with SCE nor the synchronization protocol in RBC without SE improved pregnancy rate. Then, the molecular mechanisms associated with subfertility in RBC were studied. The expression of progesterone and estradiol receptors, epidermal growth factor receptor, nodal (NodF) and prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) were studied by real time RT-qPCR in RBC (n= 16) and fertile cows (n= 9). The results demonstrated a significance difference in endometrial EGFR, NodF, and PTGS2



expression. Finally, considering the increasingly development of bacterial resistant; a study about comparing routine methods of bacteriological testing (n= 64) and the Fourier Transformed infrared spectroscopy (FTIR, n= 27) method (a simple, relatively fast and inexpensive method) to uterine pathogenic bacteria identification, was done. The results determined that it is possible identify *E. coli* and *T. pyogenes* by FT-IR.

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN GENERAL

En los últimos 30 años se ha registrado en nuestro país, así como en otras partes del mundo (Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Holanda, Australia y Nueva Zelanda) una disminución en la fertilidad de las vacas lecheras (Silvestrini y col., 2011a, b; Walsh y col., 2011). Si bien se han realizado importantes avances en cuanto a los conocimientos sobre la salud y el manejo de las vacas lecheras, todavía queda mucho por aprender (LeBlanc y col., 2006). El SVR es uno de los problemas que se relaciona con una disminución en la fertilidad (García-Ispuerto y col., 2007), y que se da frecuentemente en los rodeos lecheros de todo el mundo. Se caracteriza por ser un grupo heterogéneo de vacas subfértiles que al examen clínico no poseen anomalías anatómicas macroscópicas o evidencia de infecciones del tracto reproductivo (Casida, 1961). Esta definición no ha cambiado mucho durante los últimos 60 años y actualmente se ha limitado a las vacas que exhiben una variedad de problemas reproductivos sobre un período de 3 o más ciclos consecutivos de duración normal (17-25 días) (Pérez-Marín y España, 2007).

La importancia de este síndrome se debe a las pérdidas económicas que produce. Por un lado afecta la eficiencia reproductiva, lo cual fue descrito por Yusuf y col. (2010) al comparar el desempeño reproductivo de las VR con vacas normales en lactancia (vacas que se preñaron dentro de los tres primeras IA; Tabla 1.1), debido a que incrementa los días de vaca vacía y aumentar el número de pajuelas utilizadas por preñez, disminuye la disponibilidad de hembras de reposición y de machos para su comercialización, e incrementa los rechazos por

causas reproductivas. Por otro lado, afecta la eficiencia productiva ya que disminuye la eficiencia de conversión de alimentos en leche (Martino y Capitaine Funes, 2011). Sumado a esto, hay un aumento en la demanda de servicios veterinarios y de utilización de medicamentos.

Tabla 1.1. Desempeño reproductivo de vacas en lactancia sin problemas reproductivos y desempeño reproductivo de vacas repetidoras (adaptado de Yusuf y col., 2010).

	Vacas en lactancia	Vacas repetidoras
Vacas inseminadas (n)	479	86
Días en leche a la 1° IA	81 ± 2	74 ± 4
Tasa de concepción a la 1° IA (%)	49.1	-
Porcentaje de preñez ≤100 dpp (%)	50.1	1.2
Porcentaje de preñez ≤150 dpp (%)	75.2	11.6
Porcentaje de preñez ≤210 dpp (%)	94.8	31.4
Porcentaje de preñez ≤300 dpp (%)	99.8	50
Porcentaje de preñez ≤400 dpp (%)	99.8	58.1
Vacas preñadas a los 435 dpp (%)	100	58.1
Intervalo parto concepción (días)	114 ± 3	211 ± 10
Servicios por concepción (n)	1.7 ± 0.1	4.7 ± 0.2

1°IA: primera inseminación artificial

dpp: días postparto

La incidencia de VR en un rodeo puede variar de un 9 % hasta un 24% dependiendo de la región, el ambiente y el manejo del tambo (Yusuf y col., 2010; Janowski y col., 2013). El manejo del tambo es uno de los principales factores de riesgo al cual se le suman la incidencia de distocia, las enfermedades del postparto, el reinicio de la actividad ovárica dentro de los 80 días postparto y los días en leche a la 1° IA (Moss y col., 2002; Yusuf y col., 2010), lo cual se describirá con mayor detalle a continuación.

## **CAUSAS**

El SVR puede darse por fallas en la fertilización o muertes embrionarias muy tempranas (0 a 7 días post concepción) o tempranas (8 a 24 días post concepción) (Ayalon, 1978). En vaquillonas repetidoras, las fallas en la fertilización son más frecuentes que las muertes embrionarias, mientras que en VR ambas son igualmente importantes (Ayalon, 1978). Que estas ocurran depende de la calidad del ovocito, el ambiente oviductal y el ambiente uterino (Bridges y col., 2013), los cuales pueden ser afectados por una variedad de factores (Bage y col., 2002; Yusuf y col., 2010). Estos factores podemos dividirlos en: factores externos al animal (desbalances nutricionales, problemas de manejo) y factores internos (infecciones, desbalances hormonales y factores genéticos).

### **1. Factores externos**

#### **1.2. Desbalance nutricional**

Numerosos estudios demuestran que los desbalances nutricionales que se producen durante el parto y postparto afectan la fertilidad (Giuliodori y col., 2011; Giuliodori y col., 2013b). Esto se debe a que dichos desbalances provocan la alteración de los niveles sanguíneos de ciertos metabolitos y hormonas que participan en mecanismos relacionados con la actividad ovárica, calidad del ambiente uterino y el sistema inmune del animal (Lucy y col., 2014). Uno de los desbalances nutricionales que ocurre con mayor frecuencia se da durante el postparto temprano. Durante esta etapa, la energía requerida por el animal es mayor que la que puede ingerir y por lo tanto se produce un balance energético negativo (BEN). El grado de BEN se relaciona con el reinicio de la actividad ovárica, un

parámetro muy importante de fertilidad (Leroy y col., 2008; Grummer y col., 2010). Dentro de los metabolitos y hormonas que participan en dichos mecanismos se encuentran la glucosa, los ácidos grasos no esterificados (NEFA), beta hidroxibutirato (BHB), factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-1) e insulina.

La glucosa juega un rol importante tanto en la producción de leche como en la reproducción. Un estudio reciente describe que bajos niveles de glucosa en sangre provocan una disminución en la pulsatilidad de LH lo que afecta negativamente el crecimiento y desarrollo folicular y por ende la calidad del ovocito (Butler, 2014). A su vez, la glucosa regula la liberación de insulina, quien estimula la síntesis y liberación de IGF-1 en el hígado. Estas hormonas son de suma importancia en lo que respecta a la reproducción ya que actúan sinérgicamente con las gonadotrofinas ováricas, estimulando también el crecimiento y desarrollo folicular (Lucy, 2001). Además, tanto la insulina como el IGF-1 actúan sobre el ovario estimulando la producción de  $17\beta$ -estradiol (Castro y col., 2012). Este, junto con la  $P_4$ , regulan la expresión de receptores y proteínas en el útero, fundamentales para llevar a cabo la gestación (Bridges y col., 2013). En vacas con BEN, los niveles en sangre de ambas hormonas disminuyen, afectando la actividad ovárica (Lucy, 2001) y el ambiente uterino entre otras cosas. Además, en vacas con BEN los niveles en sangre de NEFA y BHB se encuentran elevados, lo cual afecta negativamente la fertilidad y el sistema inmune del animal. Un estudio reciente describe que las concentraciones altas de NEFA en sangre y en líquido folicular, se relacionan negativamente con la síntesis de  $E_2$ , mientras que, junto con las concentraciones altas de BHB en sangre durante las primeras semanas postparto, se relacionan con un desempeño reproductivo menos eficiente (ej., incremento del IPC, menor porcentaje de preñez

a la 1ª IA) (Ribeiro y col., 2013; Butler, 2014). Otro parámetro que se relaciona con una menor fertilidad son los niveles de calcio en sangre (Souza y col., 2014). La disminución de éste se asocia con una menor capacidad inmunitaria y con un ambiente uterino sub-óptimo. (Figura 1.1 y 1.2)

Por otro lado, aquellos animales que se encuentran en balance energético positivo ( $CC \geq 3.5$ ) tienen predisposición a padecer enfermedades metabólicas (acidosis, hígado graso, cetosis, desplazamiento de abomaso) que incrementan la incidencia de mastitis, laminitis y endometritis, las cuales contribuyen a disminuir la eficiencia reproductiva (Walsh y col., 2011; Ribeiro y col., 2013).

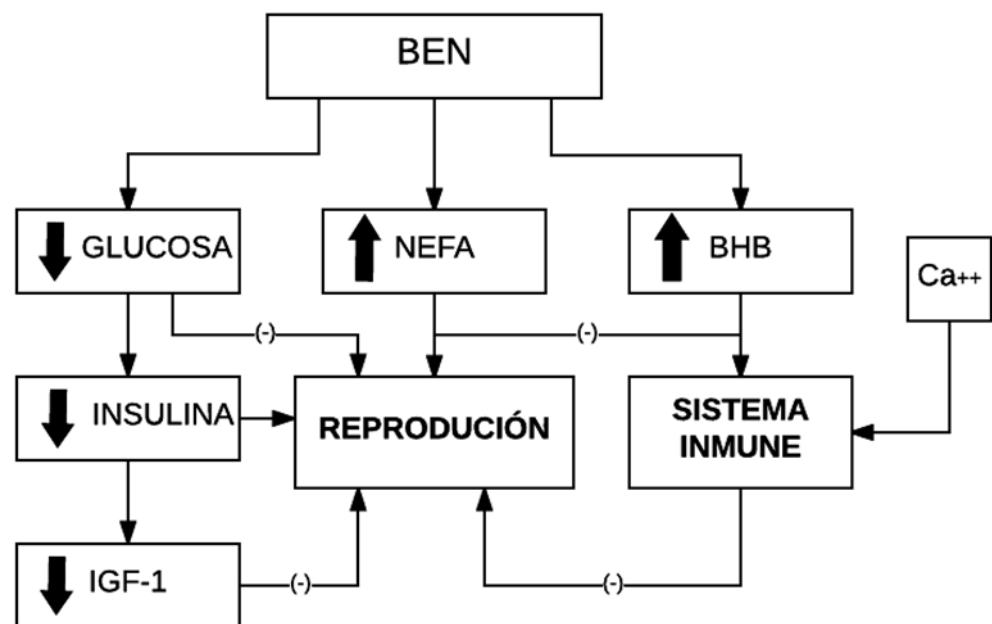


Figura 1.1. Efecto del balance energético negativo (BEN) profundo sobre la reproducción.

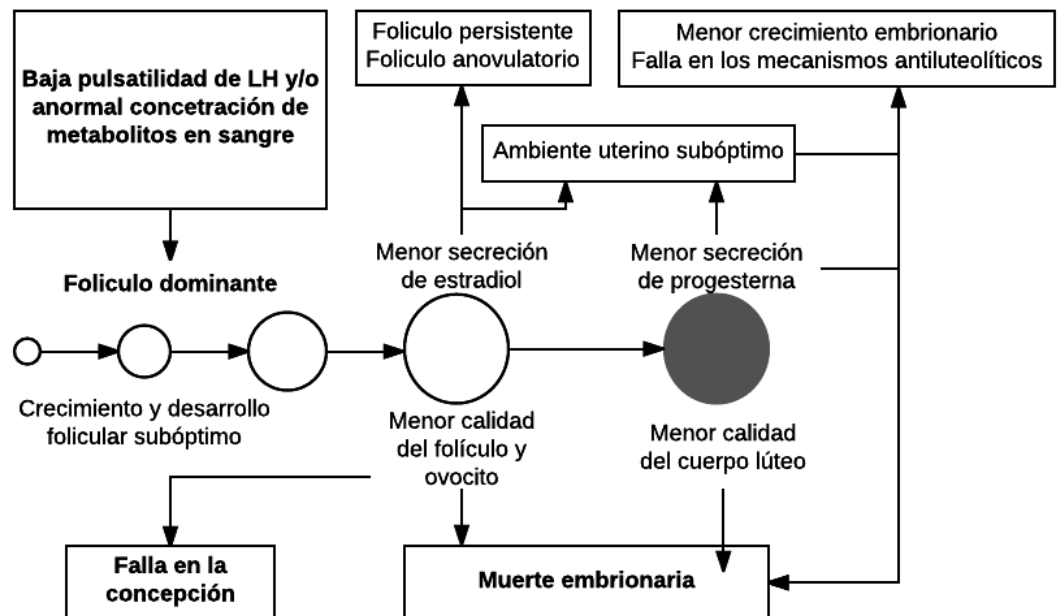


Figura 1.2. Efecto de la disminución de la pulsatilidad de LH y/o anormal concentración de metabolitos en sangre (glucosa, ácidos grasos no esterificados,  $\beta$ - hidroxibutirato) sobre la reproducción en vacas lecheras (adaptado de Lucy y col., 2014).

## 1.2. Problemas de manejo

El manejo de las vacas lecheras de alta producción es un gran desafío, especialmente en los sistemas de producción con base pastoril (Diskin y col., 2006). Para lograr que una vaca de alta producción se preñe, hay que brindarle las condiciones necesarias para que así sea. Un ambiente confortable debe evitarles el estrés térmico, físico, por enfermedad y social (Webster, 1983). El manejo nutricional es clave. La dieta que se les provee durante el parto y postparto es esencial para evitar que se desarrollen desórdenes metabólicos que afecten posteriormente el establecimiento de la gestación (Walsh y col., 2011). Como se mencionó en el apartado anterior, los desórdenes metabólicos están relacionados con la actividad ovárica, ambiente uterino y sistema inmune del animal. Además,

las vacas de alta producción tienen una menor intensidad y duración del celo. Wiltbank y col. (2006) reportó que las vacas que producen alrededor de 25 l expresan el celo durante 14 h, mientras que las que producen alrededor de 40 l lo expresan durante solo 5 h. Esto lleva a que se cometan errores en la detección de celo y en el momento en que se realiza la inseminación. Otros puntos importantes son, la técnica de inseminación en sí y la calidad del semen que se utiliza.

## **2. Factores internos**

### **2.1. Infecciones**

Dentro de los procesos infecciosos o inflamatorios, aquellos que involucran al útero tienen un impacto directo sobre el desempeño reproductivo del animal (LeBlanc y col., 2002; Sheldon y col., 2009; Giuliadori y col., 2013b, a). En relación al SVR podemos destacar la ES. Este es un proceso inflamatorio que afecta la capa más superficial del útero (Madoz y col., 2014). Los animales que la padecen no presentan signos clínicos pero si una disminución en la fertilidad (Madoz y col., 2012). Hill y Gilbert (2008) postularon que la ES podría alterar la calidad del embrión y favorecer de esta forma las muertes embrionarias tempranas. La participación de las bacterias patógenas uterinas (*Trueperella pyogenes*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella spp*) en el desarrollo de la ES fue propuesta por Kasimanickam y col. (2005). No obstante, otros trabajos realizados en vacas con ES no obtuvieron aislamiento de dichas bacterias (Madoz y col., 2014; Pothmann y col., 2015). Es posible que la desregulación de la respuesta inmune local tenga un rol preponderante en este tipo de afección (LeBlanc, 2012). Los trabajos publicados



hasta el momento sobre la ES en VR describen una prevalencia del 12%, 40% y 53% (Salasel y col., 2010; Janowski y col., 2013; Pothmann y col., 2015). Los mismos fueron realizados en Austria, Polonia e Irán, respectivamente, y utilizaron diferentes puntos de corte para el diagnóstico de ES ( $\geq 5\%$  en Austria,  $\geq 10\%$  en Polonia y  $\geq 3\%$  en Irán). Otra de las enfermedades que debería considerarse es la cervicitis ( $>5\%$  PMN, 21-35 dpp). Deguillaume y col. (2012) describieron que la cervicitis, diagnosticada entre el día 21 y 35 postparto, reduce el riesgo de preñez y alarga el IPC. Además, cuando se da junto con una endometritis los perjuicios sobre la fertilidad son aún mayores. El resto de las enfermedades uterinas (metritis, endometritis), podrían actuar como factores de riesgo para el desencadenamiento del SVR ya que, como explica Sheldon y col. (2009), tienen un efecto sobre la actividad ovárica y ambiente uterino que puede mantenerse una vez resulta la enfermedad.

Dentro de los microorganismos que se han estudiado en relación a procesos infecciosos del útero, el Herpes virus bovino-4 (BoHV-4) es el único virus fuertemente asociado a infecciones uterinas (Sheldon y col., 2009). En los últimos años se han realizado estudios sobre la implicancia del BoHV-4 en el desarrollo de metritis y endometritis, éstos no lograron demostrar una participación del BoHV-4 como agente primario (Fabian y col., 2008) pero si una asociación entre infección por BoHV-4 y desarrollo de metritis (Monge y col., 2006). En VR se han realizado estudios serológicos sobre dicho microorganismo. Los resultados obtenidos hasta el momento demuestran una mayor proporción de animales seropositivos en el grupo de VR (69%) con respecto al grupo de vacas no repetidoras (44%) (Gur y Dogan, 2010).

## 2.2. Desbalances hormonales

La detección de celo es fundamental para realizar la IA en el momento adecuado. En un trabajo realizado en VR se observó que un 50% de VR presentaban celo silente (Perez-Marin y Espana, 2007). Por lo tanto, una disminución de la duración o del grado de expresión del celo, puede llevar a errores en su detección y por lo tanto aumento del número de IA por preñez.

Ahora bien, suponiendo que la IA se realice en el momento adecuado y con semen de óptima calidad, el siguiente punto importante es la calidad del ovocito. De esta depende que se forme un embrión y que este sea capaz de desarrollarse y sobrevivir. Dicha calidad, puede verse afectada por desbalances hormonales, los cuales parecen ser una de las causas más estudiadas en VR. Los niveles adecuados de P<sub>4</sub> antes, durante y después de la IA son fundamentales para que la fertilización sea exitosa. Algunos autores encontraron niveles supra basales de P<sub>4</sub> al momento de la IA tanto en VR como en vaquillonas repetidoras (Bage y col., 2002; Ghanem y col., 2006). Estos niveles de P<sub>4</sub> por encima de lo normal, se relaciona con folículos preovulatorios de mayor tamaño y edad. Los ovocitos producto de estos folículos (folículos persistentes) son de baja calidad y si bien es posible que sean fertilizados, el embrión que se produce es igualmente de baja calidad y por lo tanto tienen una menor sobrevivencia (Wiltbank y col., 2013). Por otro lado, ciertos estudios registraron un retraso en el incremento de los niveles de P<sub>4</sub> sanguínea así como también una baja concentración total de la misma post IA en VR, lo cual incrementaría las muertes embrionarias (Shelton y col., 1990; Bage y col., 2002). Una baja concentración de P<sub>4</sub> post IA, disminuye el crecimiento embrionario, y por lo tanto

este tienen menor capacidad de producir interferón-tau, lo que afecta el reconocimiento materno de gestación (Walsh y col., 2011).

Es importante remarcar que los desbalances hormonales y endócrinos no sólo afectan la calidad del ovocito y/o del embrión, sino que también modifican el ambiente uterino, el cual es fundamental para que se lleve a cabo la gestación. El E<sub>2</sub> en particular, estimula la producción del EGF en el útero que a su vez actúa como un importante regulador de la función uterina y del desarrollo embrionario (Kliem y col., 1998). Trabajos recientes han demostrado una disminución de la concentración de EGF en VR al compararlas con vacas fértiles, y que la normalización de la expresión endometrial del mismo permitiría restablecer la fertilidad de dichos animales (Katagiri y Takahashi, 2004, 2006).

### **2.3. Factores genéticos**

Se han descrito algunas alteraciones cromosómica en VR (Bage y col., 2002; Perez-Marin y Espana, 2007). Una de ellas es la translocación Robertsoniana 1/29, que trae como consecuencia la formación de cigotos trisómicos y monosómicos y, por lo tanto, la muerte embrionaria (Lozano Carbajal y col., 1993). No obstante, se cree que este tipo de alteraciones tiene una baja incidencia (Bage y col., 2002). Algunos trabajos reportan que el porcentaje de endogamia se ha incrementado de 1 a 5% en la raza Holando en los últimos años. Este es otro de los puntos importantes ya que la endogamia afecta el desarrollo embrionario y por lo tanto el establecimiento de la gestación (Lazzari y col., 2011).

Durante muchos años, la selección de los animales de razas lecheras se basó, principalmente, en la producción de leche y posteriormente se incluyó a la fertilidad

(Miglior y col., 2005). Algunos autores reportaron una correlación negativa entre la selección por producción de leche y fertilidad (Veerkamp y col., 2001; Berry y col., 2003). No obstante, otros factores, como el manejo, la nutrición y el ambiente, parecerían tener un impacto mayor en el desempeño reproductivo de las vacas lecheras de alta producción (Leblanc, 2010; citado por Walsh y Col., 2011)

## **TRATAMIENTOS**

La mayoría de los trabajos realizados sobre tratamientos en VR apuntan a restaurar los desbalances hormonales mencionados anteriormente.

El uso de un protocolo de sincronización clásico, combinando BE (2 mg, día 0; 1mg, día 8), DIV de P<sub>4</sub> (1.38 gr, día 0 a 7 días, CIDR) y PG (25 mg, día 7) como tratamiento, pretende evitar la ovulación de ovocitos provenientes de folículos persistentes y brindar un aporte de P<sub>4</sub> previo a la IA. No obstante, las pruebas realizadas por Alnimer y Husein (2007) no mostraron diferencias significativas entre VR tratadas con dicho protocolo y sus controles. Katagiri y Takahashi (2008) utilizaron en su trabajo un protocolo de sincronización similar, pero con un objetivo muy diferente. El mismo fue normalizar las concentraciones del EGF en VR, cuya síntesis por las células endometriales es estimulada por E<sub>2</sub> en presencia de P<sub>4</sub>. Para ello compararon tres tratamientos cuya base es un protocolo de sincronización que combina, BE, DIV P<sub>4</sub>, PG e IA a celo detectado (IACD), la diferencia entre ellos fue la dosis de BE al comienzo del protocolo (grupo 1: 5 mg totales, grupo 2: 1 mg total y grupo 3: control, sin tratamiento). El porcentaje de vacas que lograron concentraciones normales de EGF después del tratamiento fue mayor en las vacas tratadas con 5 mg de BE (66.7%) que aquellas tratadas con 1

mg de BE (30%) o las controles (13.3%) ( $P < 0.01$ ). A su vez, las vacas que alcanzaron niveles normales de EGF post tratamiento tuvieron porcentajes de preñez mayores (88.9%, 1 mg de BE y 85%, 5 mg de BE) que las que continuaron con niveles anormales de EGF (19%, 1 mg de BE y 30%, 5 mg de BE) sin importar el tratamiento previamente administrado ( $P < 0.05$ ).

El tiempo que transcurre entre el comienzo del celo y el pico de LH es mayor en vaquillonas repetidoras comparándolas con vaquillonas fértiles ( $4.6 \pm 6$  h vs  $4.0 \pm 1$  h, respectivamente) lo que sugiere un retraso en la ovulación (Bage y col., 2002). El uso de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) es uno de los tratamientos más utilizados en VR (Amiridis y col., 2009). Kharche y Srivastava (2007) probaron utilizar distintas dosis de GnRH (Receptal, Alemania) al momento de la IA (20  $\mu$ g de GnRH, 10  $\mu$ g de GnRH y solución salina). Los resultados que obtuvieron indican que la administración de 20  $\mu$ g de GnRH al momento de la IA incrementa el porcentaje de preñez total de VR en un 29% con respecto al grupo tratado con 10  $\mu$ g y en un 39% con respecto al grupo control ( $P < 0.05$ ). Amiridis y col. (2009) realizaron una prueba similar con la diferencia de que la aplicación de GnRH (12  $\mu$ g) la realizaron 4-6 h antes de la IA sin encontrar diferencias significativas entre el grupo tratado y el control. No obstante, cuando compararon el uso de una combinación de P<sub>4</sub> (100 mg en forma de cápsulas intravaginales, los días 4, 5, 6 después del celo, cada 12 h), GnRH (12  $\mu$ g im, 4-6 h antes de la IA) y meloxicam (0.5 mg/kg subcutáneo, los días 16, 17 y 18 post IA) con el grupo control, si encontraron diferencias significativas entre grupos (37,76% vs 21.74%, respectivamente,  $P < 0.05$ ). El uso del meloxicam tiene como objeto inhibir la PG, que es un factor luteolítico natural. La contribución de cada uno de los componentes

del tratamiento es difícil de definir, ya que cuando fueron utilizados individualmente y como única droga del tratamiento, no se encontraron diferencias significativas con el grupo no tratado.

La hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG) administrada durante la fase luteal temprana post IA, induce la ovulación del folículo de la 1<sup>o</sup> onda folicular y forma un cuerpo lúteo (CL) accesorio. Este incrementa los niveles de P<sub>4</sub> durante el período de reconocimiento materno de gestación. La GnRH y la hCG son igualmente efectivas induciendo un CL accesorio, pero el incremento de P<sub>4</sub> es mayor cuando se emplea hCG en vaquillonas (Khoramian y col., 2011). Khoramian y col. (2011), en su trabajo compararon el uso de hCG (1500 IU), vs DIV P<sub>4</sub> (CIDR) vs GnRH (20 µg) en VR el día 5 post IA. Los mayores porcentajes de preñez a los 45 días los obtuvo utilizando el tratamiento con hCG y con el tratamiento con DIV P<sub>4</sub> (P <0.05). Del mismo modo, Kendall y col. (2009) propusieron la administración de hCG (1500UI) al día 5 post IA, los resultados que obtuvieron fueron alentadores pero solo en VR múltiparas y no en primíparas (P <0.05). También probaron utilizar DIV P<sub>4</sub> (1.9 g) a partir del día 5 y 6 post IA durante 7 días, pero no encontraron diferencias significativas en cuanto a porcentaje de preñez entre VR tratadas y controles (P >0.05).

Una alternativa interesante es la utilización de VR como receptoras en los protocolos de transferencia embrionaria. Con ésta herramienta se puede incrementar la probabilidad de mantener la gestación en aquellos casos donde la calidad del ovocito y el desarrollo embrionario se vean afectados (Son y col., 2007). Son y col. (2007) compararon el porcentaje de preñez obtenido por IATF (BE 2 mg, DIV P<sub>4</sub> por 7 días, PG 25 mg y BE 1mg), transferencia embrionaria a tiempo fijo

(utilizando el mismo protocolo que el anterior) e IACD en VR. La transferencia embrionaria logró un porcentaje de preñez de 53.8%, el cual fue significativamente superior a los obtenidos por IACD (18.5%) e IATF (7.7%) ( $P < 0.05$ ). Por otro lado (Rodrigues y col., 2010) en su trabajo compararon un protocolo de sincronización para transferencia embrionaria a tiempo fijo (TETF) y otro donde empleó una única dosis de PG, detección de celo y transferencia embrionaria 6-8 días después de detectado el celo (TECD). Las VR para ser transferida tenían que tener un CL al momento de la transferencia. El porcentaje de VR transferidas fue mayor en el grupo TETF (75%) comparado con el grupo TECD (34.5%) ( $P < 0.0001$ ). Así mismo, el porcentaje de preñez fue mayor en el primer grupo (29% vs 16%) aunque el resultado no fue tan alentador como el obtenido por Son y col. (2007) ( $P = 0.001$ ).

Varios trabajos demuestran la importancia de ciertos mediadores moleculares, como factores de crecimiento y citoquinas, en el establecimiento de la gestación (Katagiri y Takahashi, 2004; Bridges y col., 2013). Lange-Consiglio y col. (2015) propusieron en su trabajo, la administración de un concentrado plaquetario intrauterino post IA en VR, con el objeto de brindar los mediadores moleculares que se encuentran en las plaquetas. De esta forma, propone mejorar el ambiente uterino y el establecimiento de la gestación. Si bien el número de animales por grupo fue bajo (grupo tratado:  $n = 30$ , grupo control:  $n = 30$ ), hubo diferencia significativa en el porcentaje de preñez entre los animales del grupo tratado y control (70% vs. 33%, respectivamente), lo cual brinda información alentadora para nuevas alternativas de tratamientos.

## ÚLTIMOS AVANCES EN VACAS REPETIDORAS

El endometrio es un tejido en el que ocurren muchos cambios a lo largo del ciclo estral y durante la gestación. En los últimos años, muchos investigadores comenzaron a estudiar en el endometrio mecanismos moleculares que podrían participar en el desencadenamiento del SVR. Ciertas interleuquinas, citoquinas, factores de crecimiento, proteínas de fase aguda, entre otras; fueron algunas de las moléculas estudiadas.

Hayashi y col. (2017), describieron diferencias en la expresión génica endometrial entre VR y vacas controles. Una de ellas, es la inhibición de la expresión de genes relacionados con la adhesión celular en VR comparándolas con las vacas controles lo cual podría asociarse a fallas en la implantación. Siguiendo la misma línea, estudios realizados en VR describen un incremento en la expresión endometrial de mucina en comparación con vacas control (Kasimanickam y col., 2014; Wagener y col., 2017). La mucina, es una proteína secretada por células epiteliales que actúa como barrera para evitar la adhesión de patógenos a las superficies epiteliales y en los últimos años se la asoció a fallas en la implantación por impedir la adhesión del embrión al endometrio (Kasimanickam y col., 2014; Wagener y col., 2017). A su vez, también se comenzó a estudiar la expresión de ciertas interleuquinas y citoquinas relacionadas con procesos inflamatorios en el útero. Estas alteraciones podrían modificar la expresión de genes relacionados con la estabilidad de membrana, ciclo celular y apoptosis del embrión (Kasimanickam y col., 2014). Janowski y col. (2013) reportaron un incremento en la expresión de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  y de la enzima óxido nítrico sintasa en VR con ES



comparándolas con VR sin ES, por lo que sugiere la participación de éstos en los casos de VR con ES.

El SVR es una entidad compleja que involucra múltiples factores para su desencadenamiento, por ende, no es posible actualmente recomendar un único tratamiento efectivo. De los numerosos tratamientos que se han probado, los tratamientos hormonales parecerían ayudar a restablecer la fertilidad en algunos casos de VR. No obstante, es necesario continuar investigando los mecanismos que participan en el desencadenamiento del SVR para poder dar soluciones concretas.

A nuestro conocimiento, a pesar de que en Argentina el SVR es un problema que se da en la mayoría de los establecimientos, existe escasa información sobre el tema. La falta de información sobre causas, formas de diagnóstico y posibles tratamientos para las VR sumado a las pérdidas económicas que genera, hizo que eligiéramos este tema para la realización de la presente tesis. A continuación, se detallarán los objetivos e hipótesis de la misma.

### **OBJETIVO GENERAL**

1. Realizar un estudio sobre el diagnóstico y tratamiento de las VR en tambos de la cuenca Abasto Sur.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Determinar mediante CB la prevalencia de ES en VR.
2. Evaluar mediante US el efecto de la presencia de líquido en la luz uterina sobre la fertilidad de VR.
3. Determinar el grado de acuerdo entre el diagnóstico de ES por US y CB.

4. Determinar si la ES en VR es producida por agentes bacterianos.
5. Evaluar la eficacia de la administración de 500 mg de cefapirina benzatínica intrauterina en VR con ES.
6. Evaluar la eficacia de un protocolo de sincronización que combina progesterona y altas dosis de BE en VR sin ES.
7. Comparar la expresión endometrial de ARNm de transcritos involucrados en el establecimiento y mantenimiento de la gestación entre VR sin ES y vacas fértiles.
8. Determinar el grado de acuerdo entre marcha bacteriológica convencional y la TF-IR.
9. Determinar si la base de datos generada a partir de bacterias uterinas de vacas lecheras europeas podría ser utilizada para la identificación de bacterias uterinas de vacas lecheras de nuestro país.

### **HIPÓTESIS RELEVANTES**

1. La ES es un factor de riesgo importante para el desencadenamiento del SVR.
2. La presencia de líquido en la luz uterina disminuye la fertilidad en VR.
3. Es posible realizar el diagnóstico de ES por US.
4. La ES en VR es producida por agentes bacterianos.
5. La administración de 500 mg de cefapirina benzatínica intrauterina es efectiva para el tratamiento de VR con ES.
6. La realización de un protocolo de sincronización combinando progesterona con altas dosis BE es efectivo para el tratamiento de VR sin ES.

7. La expresión endometrial de ARNm de transcritos involucrados en el establecimiento y mantenimiento de la gestación difiere entre VR sin ES y vacas fértiles.
8. La TF-IR puede ser utilizada para la identificación de bacterias uterinas de vacas lecheras.
9. La base de datos producida a partir de bacterias obtenidas de vacas lecheras europeas puede ser utilizada para la identificación de bacterias uterinas de vacas lecheras de nuestro país.

## **CAPÍTULO II**

### **DIAGNÓSTICO, PREVALENCIA Y TRATAMIENTO DE VACAS REPETIDORAS CON Y SIN ENDOMETRITIS SUBCLÍNICA**

#### **INTRODUCCIÓN**

Las VR se definen como vacas clínicamente sanas, pero que fallan en quedar preñadas luego de tres o más IA. Como se mencionó en el capítulo anterior, la causa es multifactorial (Bage y col., 2002; Katagiri y Takahashi, 2004; Kharche y Srivastava, 2007; Salasel y col., 2010; Yusuf y col., 2010). Dentro de estas causas, parecen ser importantes los procesos inflamatorios y los desbalances hormonales y endócrinos que modifican el ambiente uterino.

Para que el desarrollo embrionario sea normal, es necesario que el útero se encuentre en óptimas condiciones (Walsh y col., 2011), y es por ello que los procesos infecciosos/inflamatorios del endometrio podrían afectar negativamente dicho desarrollo (Hill y Gilbert, 2008). En los últimos 10 años, aproximadamente, se ha estudiado la ES en vacas lecheras post parto. Estos estudios han permitido obtener las primeras estimaciones de su prevalencia y su efecto sobre la eficiencia reproductiva (Gilbert y col., 2005; Kasimanickam y col., 2005; Cheong y col., 2011; Madoz y col., 2013). Un estudio realizado en nuestro país demostró que la prevalencia de ES en vacas lecheras postparto es del 17%, y que la misma produce efectos negativos sobre la eficiencia reproductiva (Madoz y col., 2013). No obstante, se han realizado pocos trabajos en los que estudien la ES como una posible causa del SVR (Salasel y col., 2010; Pothmann y col., 2015). El diagnóstico de ES

se realiza por citología endometrial, utilizando la técnica de lavaje uterino, CB o, según estudios realizados recientemente, cytotape (Pascottini y col., 2015). Si bien dichas técnicas son simples en cuanto a su realización y equipamiento, todas requieren tiempo para arribar a un diagnóstico, lo cual no las hace prácticas para ser realizadas a campo. En los últimos años se comenzó a estudiar el uso de la US para el diagnóstico de ES (Kasimanickam y col., 2004; Lenz y col., 2007). Según estos trabajos, la presencia de líquido en la luz uterina es uno de los criterios que pueden utilizarse para su diagnóstico (Kasimanickam y col., 2004; Barlund y col., 2008). La principal ventaja que posee la US es su practicidad, permitiendo obtener el diagnóstico en el mismo momento en que se realiza el examen clínico. Por lo tanto, la validación de la US sería un gran adelanto en el diagnóstico de la ES. El otro punto importante es determinar la causa de la ES para poder realizar un tratamiento efectivo. Si bien todavía no se ha podido demostrar, es posible que los agentes bacterianos que comúnmente se relacionan con las enfermedades uterinas, también participen en los casos de ES. Por lo tanto, un tratamiento con ATB permitiría eliminar dicha infección e incrementar las posibilidades de preñez en VR con ES.

Los desbalances hormonales, como se mencionó anteriormente, podrían ser otro factor importante en el desencadenamiento del SVR. Junto con la  $P_4$ , los  $E_2$  de origen ovárico regulan la función uterina estimulando la producción de citoquinas y factores de crecimiento que median funciones críticas en el establecimiento y mantenimiento de la preñez. Los  $E_2$  en particular, estimulan la producción de EGF en el útero que a su vez actúa como un importante regulador de la función uterina y del desarrollo embrionario. Trabajos realizados en los últimos años han demostrado una alteración en la concentración endometrial de EGF en VR (Katagiri

y Takahashi, 2004, 2006). La normalización de la concentración de EGF debido a un tratamiento hormonal permitió mejorar la eficiencia reproductiva de dichos animales (Katagiri y Takahashi, 2008). Por lo tanto, un tratamiento en el que se combine P<sub>4</sub> y altas dosis de BE podría ser una opción terapéutica eficaz, simple y económica para restablecer la funcionalidad del útero y de esta forma, incrementar las posibilidades de preñez en VR sin ES.

Teniendo en cuenta lo antes mencionado, el proceso de diagnóstico, en el caso de las VR, debería identificar en primera instancia aquellas vacas que poseen ES y que se beneficiarían con un tratamiento antibiótico sin descarte en leche; y en segunda instancia asumir que las VR restantes tendrían perfiles anormales de EGF y por lo tanto se beneficiarían utilizando un tratamiento hormonal que combine BE, a una dosis mayor que la utilizada normalmente (5 mg vía im), DIV de P<sub>4</sub> y PGF, realizando la IA a celo detectado. Por lo tanto, los objetivos del siguiente capítulo fueron: 1) determinar mediante CB la prevalencia de ES en VR, 2) evaluar mediante US el efecto de la presencia de líquido en la luz uterina sobre la fertilidad de VR, 3) determinar el grado de acuerdo entre el diagnóstico de ES por US y CB, 4) determinar si la ES en VR es producida por agentes bacterianos, 5) evaluar la eficacia de la administración de 500 mg de cefapirina benzatínica intrauterina en VR con ES y 6) evaluar la eficacia de un protocolo de sincronización que combina progesterona y dosis más altas de BE en VR sin ES. Las hipótesis correspondientes a dichos objetivos fueron: 1) la ES es un factor de riesgo importante para el desencadenamiento del SVR, 2) la presencia de líquido en la luz uterina disminuye la fertilidad en VR, 3) es posible realizar el diagnóstico de ES por US, 4) la ES en VR es producida por agentes bacterianos, 5) la administración de 500 mg de

cefapirina benzatínica intrauterina es efectiva para el tratamiento de VR con ES y  
6) la realización de un protocolo de sincronización combinando progesterona con dosis más altas de BE es efectivo para el tratamiento de VR sin ES.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### ***Diseño experimental***

Para la realización de este experimento se utilizaron VR Holando Argentino (n= 432) de 14 tambos comerciales ubicados en las localidades de Bavio, Branden, Lobos (Buenos Aires, Argentina) y Alejo Ledezma (Córdoba, Argentina) en un sistema de producción pastoril con suplementación.

### **Definición del caso clínico**

Se consideró VR aquellas vacas con  $\geq 3$  servicios a intervalos regulares de tiempo (entre 17 y 25 días), vacías y clínicamente sanas (sin afecciones uterinas u ováricas). Además, las VR incluidas en el experimento no presentaron registros de abortos o tratamientos, ya sean hormonales o ATB, durante el período antes mencionado.

### **Evaluación clínica**

La evaluación clínica de las vacas comenzó con un examen mediante US (ecógrafo Mindray™ 6600Vet, sonda lineal de 7.5 MHz) con el objeto de eliminar aquellas vacas que se encontraban preñadas o que presentaban alguna afección o anomalía en los ovarios o en el útero. Además, se realizó la técnica de flujeo manual para eliminar las vacas con EC (Sheldon y col., 2002; Dominguez, 2006). Para el

flujeo manual se limpió la zona perineal y con una mano cubierta por un guante de tacto nuevo y lubricado, se recolectó flujo vaginal desde la porción craneal de la misma. El flujo se clasificó en 4 grados: FL0 corresponde a un flujo normal (EC0), FL1 corresponde a un flujo con flóculos de pus (EC1; <50% de pus), FL2 corresponde a un flujo purulento sin olor (EC2;  $\geq$ 50% de pus) y FL3 corresponde a un flujo purulento y con olor fétido (EC3). Se consideraron los FL1-FL3 como indicadores de EC. Por lo tanto, solamente aquellas VR en las que se confirmó vacuidad y no presentaron EC o cualquier otra afección o anomalía, se incluyeron en el estudio. Los datos que se recolectaron de cada vaca fueron: número de servicios, fecha del último parto, producción de leche, número de lactancia, CC (utilizando la escala que va de 1 a 5, (Edmonson, 1989; Ferguson y col., 1994), estructuras ováricas presentes (folículos  $\geq$ 10mm y <10 mm, cuerpos lúteos, cuerpos lúteos quísticos) y presencia de luz uterina (en mm).

### **Toma de muestras y diagnóstico de endometritis subclínica**

El diagnóstico de ES se realizó utilizando primero la técnica de CB (n= 432; técnica utilizada como Prueba de Oro), y posteriormente la US (n= 358; 74 de 432 VR no pudieron ser evaluadas por US). El diagnóstico de ES por CB se realizó utilizando una pistola de acero inoxidable (similar a las que se utilizan para inseminación) que constaba de dos partes, una pieza tubular externa y un vástago interno que poseía en su extremo anterior 1 cm de rosca. En el extremo anterior de ésta última se le adosó un cepillito estéril utilizado en ginecología humana (Medibrush XL ®, Medical Engineering Co, SA). Posteriormente se colocó una vaina de inseminación (IVM Technologies, Francia) para cubrir la pistola y el



cepillito. Una vez lista la pistola se procedió al enhebrado de la misma de modo similar a la técnica utilizada en IA, pasado el cérvix se expuso el cepillito al endometrio y se lo hizo rotar sobre el mismo. Antes de retirar la pistola del útero, se retrajo el cepillito para que nuevamente quede cubierto por la vaina plástica de inseminación. Para realizar la citología se hizo rotar el cepillito sobre un portaobjeto nuevo y rotulado, y se lo fijó con spray Roby (Roby, Argentina). Por último, en el laboratorio, las muestras fueron teñidas con tinción 15 (Tinción 15<sup>®</sup>, Biopur Diagnostic). El conteo celular se realizó a 40 X, se contaron 200 células y de ellas se obtuvo el porcentaje de PMN. El punto de corte para el diagnóstico de ES fue  $\geq 5\%$  PMN (Madoz y col., 2013) . El diagnóstico de ES por US se realizó recorriendo todo el útero y midiendo el diámetro de luz uterina, en milímetros, en la base de uno de los cuernos.

### **Toma de muestras para bacteriología**

Las muestras bacteriológicas fueron tomadas a VR con ES (n= 48) y a VR sin ES (n= 13). Éstas se obtuvieron utilizando la técnica de CB como se describió anteriormente, con el agregado de una camisa sanitaria que se colocó por encima de la vaina plástica de inseminación. Una vez que se ubicó la pistola en el útero, la camisa sanitaria fue rasgada para luego exponer el cepillo. Una vez obtenida la muestra se introdujo el cepillito en el medio de transporte Stuart (Eurotubo, DeltaLab) el cual fue colocado en una caja de poliestireno expandido con refrigerantes hasta su llegada al laboratorio.

En el laboratorio, las muestras fueron sembradas en medios para aerobios. Se utilizó el medio Agar Sangre Base, con el agregado de 5% de sangre ovina

desfibrinada y Mac Conkey. Las placas fueron incubadas por 48 horas a 37°C. Las bacterias se identificaron por las siguientes características: morfología de colonia, coloración Gram, tipo de hemólisis y pruebas bioquímicas convencionales (Baron, 1995).

### **Tratamientos**

Basándonos en el diagnóstico de ES por CB, las VR positivas a ES se dividieron en dos grupos según el número de caravana. Las VR con número de caravana par fueron tratadas con 500 mg de cefapirina benzatínica intrauterina (Metricure, n=38), mientras que las VR con número de caravana impar no recibieron tratamiento (n= 46). Las VR negativas a ES fueron divididas en 2 grupos de la misma manera que se mencionó anteriormente. Las VR con número de caravana par fueron tratadas con un protocolo de sincronización (n= 135), mientras que las VR con número de caravana impar no recibieron tratamiento (n= 136). El protocolo de sincronización antes mencionado se basó en la combinación de una dosis más alta de BE combinado con un DIV de progesterona (Día 0: administración de 5 mg de BE + DIV con 1 g de P<sub>4</sub>, día 7: administración de 150 µg cloprostenol + retiro del DIV). Todas las vacas fueron inseminadas a celo detectado, tomando el primer celo posterior al tratamiento o al muestreo según el grupo asignado (Figura 2.1). El diagnóstico de gestación se realizó por US a los 35±5 días post IA. La evaluación de la eficacia del tratamiento se basó en el porcentaje de preñez obtenido a la 1° IA.

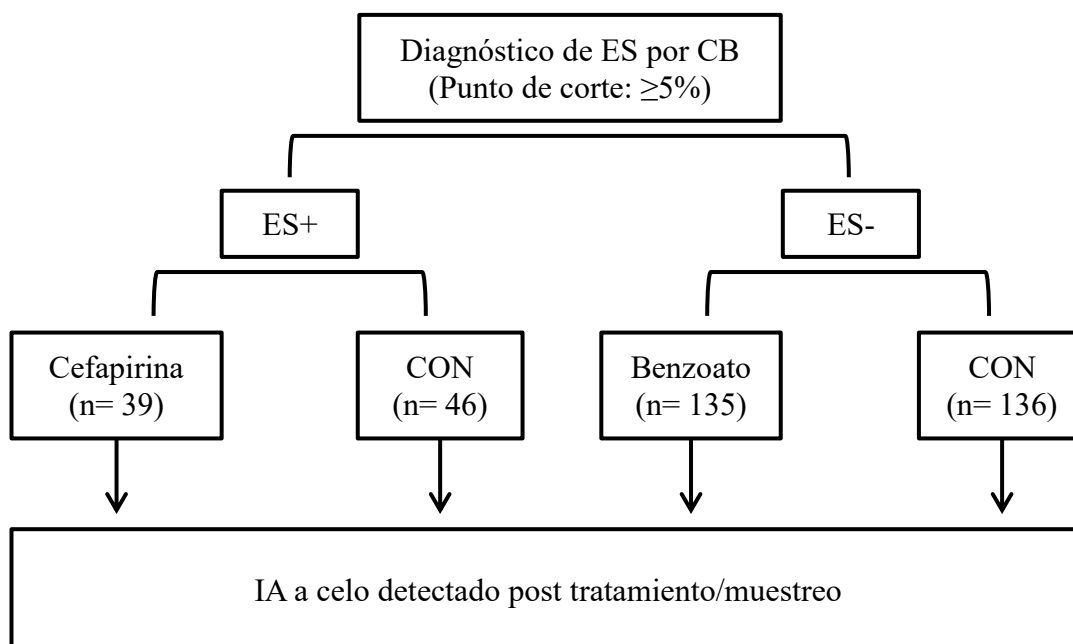


Figura 2.1. Diseño experimental y asignación de tratamientos correspondientes a cada grupo.

### *Análisis estadístico*

Para el análisis de este experimento se utilizó un diseño en bloques completamente aleatorizado, donde se utilizó cada tambo como criterio de bloque y a la vaca como unidad experimental. Los análisis descriptivos de las VR fueron realizados con procedimiento UNIVARIATE de SAS (SAS, 2003). Para evaluar el efecto del líquido en la luz uterina sobre la fertilidad (preñez a la 1° IA post muestreo) se realizaron 2 modelos en el que se incluyó como efecto aleatorio al tambo, y como efecto fijo al parto (1 vs.  $\geq 2$ ) y al resultado de la US (1 mm vs.  $\geq 1$  mm en el modelo 1, y  $< 2$  mm vs.  $\geq 2$  mm en el modelo 2), y su interacción. El grado de acuerdo entre la técnica de CB y US para el diagnóstico de ES fue analizado por el Coeficiente Kappa con procedimiento FREQ de SAS (SAS, 2003). Para evaluar la probabilidad de aislamiento bacteriano en VR con y sin ES se utilizó el

procedimiento FREQ de SAS (SAS, 2003). Para evaluar el efecto de la ES diagnosticada por CB y el efecto de los tratamientos (cefapirina benzatínica y BE) (modelo tratamientos) en la fertilidad (preñez a la primera IA), se utilizó un modelo lineal generalizado con una distribución binomial y un enlace logit (Procedimiento LOGISTIC, SAS, 2003). En ambos casos se incluyeron también el efecto fijo del parto (1 vs. 2+) y en el modelo tratamientos se utilizó, además, el efecto fijo del tratamiento (tratamiento cefapirina benzatínica, si vs. no; tratamiento con un protocolo de sincronización con dosis más altas de BE, si vs. no). Se consideró que hubo diferencias significativas a partir de  $P < 0.05$ , y se consideró que hubo una tendencia a partir de  $P < 0.1$ .

## RESULTADOS

El análisis descriptivo de las VR incluidas en este trabajo se presenta en la tabla 2.1. La prevalencia de ES en VR fue de 24% (104/432) por CB y de 20.3% (73/358) por US utilizando como punto de corte  $\geq 2$  mm de líquido en la luz uterina. Las VR con  $\geq 1$  mm de líquido en la luz uterina tuvieron iguales chances de preñez que las VR sin líquido (RP= 0.875, P= 0.655, Tabla 2.2), siendo los porcentajes de preñez de 20.4 y 22.6%, respectivamente. Contrariamente, las VR con  $\geq 2$  mm de líquido en la luz uterina tuvieron 2 veces menos chances de quedar preñadas que las que tuvieron  $< 2$  mm (RP= 0.456, P= 0.046, Tabla 2.2), siendo los porcentajes de preñez de 15 y 27%, respectivamente. Debido a que el diámetro de la luz uterina puede variar en condiciones fisiológicas durante el ciclo estral o con el número de partos (Lenz y col., 2007), se midió cual fue la variación causada por los mismos y se determinó si estos factores podrían afectar el diagnóstico de ES por US. Se

encontró que las VR con folículos  $\geq 10$  mm de diámetro tuvieron más líquido en la luz uterina que las vacas que no tenían, 1.12 (0.82-1.41) vs 0.57 mm (0.24-0.90) de luz uterina, respectivamente (IC95%,  $P= 0.004$ ). Así mismo, las VR con cuerpo lúteo (CL) tuvieron menos líquido en la luz uterina que las VR sin CL, 0.66 (0.40-0.92) vs 1.02 mm (0.66-1.38), respectivamente ( $P= 0.057$ ). Por último, la interacción entre la presencia de folículos  $\geq 10$  mm y CL no afectó el volumen de líquido en la luz uterina ( $P= 0.254$ ). En cuanto al número de partos, primíparas y multíparas tuvieron similar volumen de líquido en la luz uterina, 0.75 (0.35-1.15) vs 0.93 mm (0.70-1.16), respectivamente ( $P= 0.390$ ). Según estos resultados, utilizando un punto de corte de 2 mm, las vacas normales que se encuentren en estro o que sean multíparas, no estarían incluidas en el grupo de las vacas con un volumen de líquido anormal. Por lo tanto, 2 mm de líquido en la luz uterina podría ser utilizado como punto de corte para identificar VR con menor chance de quedar preñadas. Por otro lado, no hubo correlación en el diagnóstico de ES por CB y US en VR (Coeficiente Kappa= 0.03, 95% CI = -0.073 – 0.136,  $P= 0.54$ ). Tampoco hubo diferencias significativas entre los aislamientos bacterianos de VR con o sin ES ( $P= 0.42$ , Tabla 2.3). Las VR con ES diagnosticadas por CB tuvieron un porcentaje de preñez a la 1° IA similar a las VR sin ES (Tabla 2.4). No hubo interacción entre CB x US en el porcentaje de preñez ( $P= 0.886$ , Tabla 2.4). Por último, el tratamiento con cefapirina benzatínica en VR con ES o con dosis más altas de BE en VR sin ES no tuvo efecto en el porcentaje de preñez a la 1°IA (Tabla 2.5).

Tabla 2.1. Análisis descriptivo de las vacas repetidoras incluidas en el estudio.

	Promedio	ES	Media	Cuartiles	n
Condición corporal <sup>1</sup>	3	0.52	3	2.75-3.50	394
Inseminaciones artificiales (n)	4.4	2.1	4.0	3.0-5.0	432
Número de lactancia	2.80	1.53	3.0	2-4	398
Producción diaria de leche (kg)	26.2	8.2	26.4	21.0-31.4	139
Días postparto	275	160	226	173-326	402

<sup>1</sup>Escala de condición corporal: 5 puntos (1-5).

Tabla 2.2. Efecto del líquido en la luz uterina sobre el porcentaje de preñez a la primera inseminación artificial post muestreo en vacas repetidoras (n= 358).

		% (n/N)	RP (95% IC)	P
US	< 1 mm	22.6 (31 / 137)	Referencia	0.655
	≥ 1 mm	20.4 (38 / 186)	0.875 (0.485 - 1.578)	
	< 2 mm	26.8 (68 / 254)	Referencia	0.046
	≥ 2 mm	14.5 (10 / 69)	0.456 (0.211 - 0.985)	

US: Ultrasonografía,

RP (95% IC): razón de probabilidad y 95% del intervalo de confianza,

Treinta y cinco vacas fueron excluidas del análisis estadístico por no tener registros del resultado del diagnóstico de gestación (358-35= 323).

Tabla 2.3. Aislamientos bacterianos de vacas repetidoras con y sin endometritis subclínica (n= 49).

Bacteria	Diagnóstico, % (n/N.)	
	ES+	ES-
<i>Corynebacterium spp.</i>	3 (1/38)	0 (0/11)
<i>Trueperella pyogenes</i>	3 (1/38)	18 (2/11)
<i>Bacillus spp.</i>	32 (12/38)	9 (1/11)
<i>Escherichia coli</i>	5 (2/38)	9 (1/11)
<i>Proteus spp.</i>	0 (0/38)	27 (3/11)
<i>Staphylococcus coagulasa -</i>	5 (2/38)	0 (0/11)
<i>Streptococcus beta hemolítico</i>	3 (1/38)	0 (0/11)
Sin aislamiento	50 (19/38)	36 (4/11)

ES+: VR con ≥5% de neutrófilos diagnosticadas por CB,

ES-: VR con <5% de neutrófilos diagnosticadas por CB,

Doce de 61 muestras fueron excluidas del estudio por contaminación bacteriana durante el muestreo.

Tabla 2.4. Efecto de la endometritis subclínica en el porcentaje de preñez a la primera inseminación de vacas repetidoras diagnosticadas por cytobrush o por ultrasonografía

		% (n/N)	RP (95% IC)	P
CB	<5% PMN	26.28 (72/274)	Referencia	0.579
	≥5% PMN	23.33 (21/90)	0.85 (0.49-1.49)	
US	<2 mm	26.8 (68/254)	Referencia	0.046
	≥2 mm	14.5 (10/69)	0.456 (0.211 - 0.985)	

PMN: polimorfo nucleares neutrófilos,

RP (95% IC): razón de probabilidad y 95% del intervalo de confianza,

Interacción CB por US: 0.886,

Punto de corte utilizado para diagnosticar ES: ≥5% PMN (CB) y ≥2 mm (US).

Tabla 2.5. Efecto del tratamiento realizado a vacas repetidoras con o sin endometritis subclínica sobre el riesgo de quedar preñadas a la primera inseminación artificial.

	Tratamiento	Riesgo de preñez		P
		% (n/N)	RP (95% CI)	
Cefapirina Benzatínica	NO	19.5 (9/46)	Referencia	0.503
	SI	25.64 (10/39)	1.42 (0.51-3.95)	
Benzoato de estradiol	NO	28.68 (39/136)	Referencia	0.430
	SI	24.44 (33/135)	0.81 (0.47-1.38)	

OR (95% IC): razón de probabilidad y 95% de intervalo de confianza

## DISCUSIÓN

La prevalencia de ES en VR de tambos de Argentina es del 24%, justo el doble que la descripta en tambos de Austria (12%) (Pothmann y col., 2015) y la mitad que la descripta en tambos de Israel (54%) (Salasel y col., 2010). La diferencia en estos resultados puede deberse no solo a los puntos de corte utilizados en cada trabajo (≥5% de PMN en los dos primeros, y ≥3% de PMN en el último), sino también a variables relacionadas con cada tambo como manejo, tipo de personal, nutrición, sistema de producción, clima, etc. Estas últimas son importantes ya que podrían variar la prevalencia de la enfermedad incluso en tambos de la misma región. Por otro lado, comparando la prevalencia de ES en VR

con vacas postparto de Argentina, encontramos que las primeras tienen una prevalencia mayor (24% vs 17%) a pesar de haber cumplido el puerperio por completo. No obstante, la ES (diagnosticada por CB) no afecta la fertilidad en VR a diferencia de lo reportado en vacas postparto donde disminuye las chances de preñez en un 30% e incrementa el IPC en 30 días (Madoz y col., 2013). Contrariamente, la ES diagnosticadas por US reduce las probabilidades de preñez en VR. Estos resultados concuerdan con los reportados por Kasimanickam y col. (2004) en vacas postparto. Este autor, reportó que el porcentaje de preñez de vacas con líquido en la luz uterina y sin endometritis clínica, fue menor comparándolo con vacas sin líquido en la luz uterina. A su vez, el porcentaje de preñez fue incluso menor cuando se daban ambas condiciones. En nuestro trabajo, no se encontró efecto aditivo de ambas técnicas (CB vs. US). Según un trabajo realizado en ratones, las causas del efecto negativo del líquido intrauterino sobre la fertilidad pueden relacionarse con: 1) un efecto tóxico directo sobre el desarrollo del embrión, 2) un mecanismo de interferencia en la implantación, 3) un efecto de lavado sobre el embrión, y 4) una alteración de la receptividad endometrial por cambios en la expresión génica (Lu y col., 2013).

El diagnóstico de ES por CB no tuvo correlación con el diagnóstico de ES por US. Este resultado concuerda con otros estudios realizados en vacas postparto (30 y 50 dpp) (Kasimanickam y col., 2004; Barlund y col., 2008; kappa= 0.28 y kappa= 0.25 respectivamente). La falta de acuerdo entre ambas técnicas podría deberse a que identifican distintos mecanismos de defensa frente a una injuria, en el caso de la citología endometrial evalúa la respuesta inmune celular y la US evalúa, indirectamente, el mecanismo de clearance uterino (Kasimanickam y col.,



2004). Los resultados bacteriológicos demuestran que el 50% de las VR con ES fueron positivas al aislamiento bacteriano, pero la mayoría de las bacterias aisladas raramente causan enfermedades uterinas o directamente no están relacionadas con enfermedades uterinas (*Corynebacterium spp*, *Bacillus spp*, *Proteus sp*, *Staphylococcus coagulasa - and Streptococcus beta hemolítico*) (Sheldon y col., 2002). De hecho, muchas de las bacterias aisladas se encuentran en el útero de vacas postparto sanas (Prunner y col., 2014a; Wagener y col., 2015). Estos resultados concuerdan con otro estudio que describe una amplia variedad de bacterias en el útero de VR no relacionadas con infección uterina (Pothmann y col., 2015). Por lo tanto, en acuerdo con otros estudios, en los que además incluyeron el aislamiento de bacterias anaerobias (Madoz y col., 2014; Prunner y col., 2014b), podríamos sugerir que las bacterias no serían la causa principal de ES en VR. No obstante, sería necesario realizar otro estudio en el que se incluya un mayor número de muestras y el aislamiento de bacterias anaerobias para confirmar dicha hipótesis.

Por último, contrariamente a nuestra hipótesis, tanto el tratamiento con cefapirina benzatínica, como el tratamiento hormonal que contaba con una dosis mayor de BE (5mg en el día 0 del tratamiento) más P<sub>4</sub>; no mejoraron el porcentaje de preñez en la 1<sup>o</sup> IA post tratamiento en VR. En el caso de las VR con ES, a pesar de que el número de animales incluidos en cada grupo no nos permite llegar a una conclusión, los resultados de bacteriología descritos arriba podrían explicar la posible falta de eficacia del tratamiento (500 mg de cefapirina benzatínica intrauterina). No obstante, (Kasimanickam y col., 2005) reportó que la cefapirina benzatínica tuvo un efecto beneficioso al disminuir los DA de vacas tratadas con respecto a los controles (no tratados), pero no tuvo efecto sobre el porcentaje de

preñez. Por otro lado, contrariamente a nuestros resultados, Katagiri y Takahashi (2008) reportaron que el porcentaje de preñez fue mayor en VR tratadas con 5 mg que en VR tratadas con 1 mg y 2.5 mg de BE. La razón para esta diferencia no es fácil de determinar. Es posible que el gran número de tambos ( $n=14$ ) incluidos en el trabajo haya afectado negativamente nuestros resultados de fertilidad. Por otro lado, estudios realizados más recientemente reportaron concentraciones normales de  $E_2$  en VR (Bage y col., 2002; Pothmann y col., 2015), por lo que una dosis mayor de BE no parecería ser necesaria, salvo en aquellos casos en los que los niveles de  $E_2$  se encuentren por debajo de lo normal. Desafortunadamente, los niveles de estradiol no fueron medidos en el presente trabajo por lo que no podemos confirmar dicha hipótesis.

## CONCLUSIONES

En conclusión, ES no es la causa principal de VR. La detección de  $\geq 2$  mm de luz uterina está relacionada con un menor riesgo de preñez en VR. Contrariamente, la detección de  $\geq 5\%$  PMN no está relacionada con el riesgo de preñez en VR. Por lo tanto, podríamos decir que la presencia de líquido en la luz uterina y la citología endometrial, no representan la misma afección. Por último, el tratamiento con dosis más altas de BE en VR sin ES no tuvo un efecto beneficioso en los porcentajes de preñez. Si bien los resultados muestran que no hubo efecto beneficioso del tratamiento con cefapirina benzatínica en VR con ES, es necesario incrementar el número de muestras para poder concluirlo. Por lo tanto, se requieren más estudios para comprender los mecanismos que causan VR y de esta forma poder establecer un tratamiento efectivo.

### **CAPÍTULO III**

## **COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA ENDOMETRIAL EN VACAS REPETIDORAS Y VACAS FÉRTILES DURANTE EL DIESTRO**

### **INTRODUCCIÓN**

Para que se establezca la gestación, es importante tanto la calidad del ovocito como la del ambiente oviductal y uterino. En el caso de las VR, alguna de estas condiciones no se cumple y por lo tanto fallan en quedar preñadas. Varios estudios demuestran que la mayor parte de las pérdidas de preñez ocurren antes del reconocimiento materno de gestación, el cual se da alrededor del día 15 de gestación (Diskin y Morris, 2008; Bridges y col., 2013). Durante dicho período, en el que se produce el crecimiento embrionario e inicio de la implantación, la expresión génica endometrial no varía entre una vaca cíclica y una vaca preñada (Forde y col., 2011b; Mamo y col., 2012; Brooks y col., 2014). Esto se debe a que, en cada ciclo estral, el útero se prepara para recibir a un embrión. Esta condición es importante ya que, el estudio de expresión génica endometrial en vacas fértiles y subfértiles, como lo son las VR, nos podría ayudar a comprender los mecanismos por los que se desencadena dicha subfertilidad.

Una vez que el ovocito es fertilizado, el embrión comienza su crecimiento en el oviducto, el cual continuará en el útero unos 4 a 6 días más tarde (Brooks y col., 2014). Desde la fertilización y hasta el estadio de blastocisto protruido (día 9 a 10), el embrión es relativamente autónomo, es decir no requiere del contacto con el endometrio materno para sobrevivir (Forde y Lonergan, 2012). Posteriormente,

su crecimiento y desarrollo dependerá principalmente de las sustancias sintetizadas y secretadas por el endometrio, que en conjunto se las denomina leche uterina o histotrofo (Mamo y col., 2012). El histotrofo, está formado por proteínas (enzimas, factores de crecimiento, citoquinas, factores de adhesión, proteínas de transporte y proteínas derivadas del suero materno), lípidos, aminoácidos, azúcares (glucosa, fructosa), iones, exosomas y otros metabolitos (Mamo y col., 2012; Brooks y col., 2014). Este, es la principal fuente de energía y nutrientes para el embrión, lo cual se relaciona con el crecimiento y desarrollo del mismo y esto último con la producción de interferón tau, indispensable para el reconocimiento materno de la gestación (Mann y Lamming, 2001). Alrededor del día 13 comienza el proceso de implantación, en el cual participan una gran variedad de moléculas en las que se incluyen factores de crecimiento, prostaglandinas, hormonas y citoquinas (Sugawara y col., 2010; Dorniak y col., 2011). Este complejo proceso, se caracteriza por la elongación del conceptus, aposición, unión y adhesión del trofoectodermo al endometrio (Forde y Lonergan, 2012).

Para que estos procesos sean exitosos se requiere de una serie de interacciones muy bien sincronizadas entre ovarios, oviductos, útero y embrión (Shimizu y col., 2010). Como mencionamos en el capítulo anterior, los E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> de origen ovárico regulan, a nivel uterino, la expresión de una amplia variedad de citoquinas y factores de crecimiento que cumplen un rol muy importante en el crecimiento del conceptus, formación del histotrofo, e implantación (Bazer y col., 2009; Singh y col., 2011; Forde y col., 2012; Brooks y col., 2014; Killeen y col., 2014). Estas hormonas ejercen su acción uniéndose a sus receptores (ER y PR) ubicados en el endometrio (células del epitelio luminal, glandular y del estroma) y

miometrio. La expresión de dichos receptores está regulada por ambas hormonas (Ing y Tornesi, 1997). En líneas generales, el E<sub>2</sub> tienen un efecto estimulador en la expresión de ambos receptores, mientras que la P<sub>4</sub> tiene un efecto inhibitor (Meikle y col., 2001; Robinson y col., 2001). Los cambios de expresión de estos receptores podrían relacionarse con alteraciones en la concentración sérica de ambas hormonas y con cambios en la expresión endometrial de factores relacionados con el establecimiento de la gestación.

Dentro de los factores de crecimiento cuya expresión está regulada por E<sub>2</sub> y P<sub>4</sub> se encuentra el EGF. La actividad del mismo está relacionada con la receptividad uterina, la cual se define como la condición fisiológica en la que se debe encontrar el útero para que el crecimiento del conceptus y la implantación sean posibles (Minten y col., 2013), y con el crecimiento embrionario.

Como se describió en el capítulo anterior, el EGF parecería tener un rol importante en el desencadenamiento del SVR (Katagiri y Takahashi, 2004, 2006, 2008). La alteración de la concentración endometrial de EGF fue descrita en un 70% de VR sin endometritis subclínica (Katagiri y col., 2013). Este factor de crecimiento es sintetizado por células endometriales y su función está relacionada con el crecimiento, proliferación y diferenciación de células uterinas y del trofoblasto (Akbalik y Ketani, 2013; Takatsu y col., 2015). Además, participa en la estimulación de la síntesis de prostaglandinas (Zhang y col., 1992) a través de la activación de la enzima prostaglandina peróxido sintasa 2 (PTGS2), también conocida como ciclooxigenasa (Bany y Kennedy, 1995), cuya importancia en el establecimiento de la gestación será descrito más adelante. Su función la ejerce a

través de la unión con su receptor (EGFR), quien forma parte de un grupo de 4 receptores transmembrana con actividad tirosin-kinasa (Akbalik y Ketani, 2013).

En mamíferos, el grupo de receptores antes mencionado se localiza en diferentes tejidos del organismo, participando en la regulación de procesos relacionados con el crecimiento, migración, proliferación y diferenciación celular (Sagsoz y col., 2012). En el tejido uterino, estos receptores se expresan en diferentes tipos celulares siendo mayor en el epitelio luminal y en el epitelio de las glándulas superficiales (Sagsoz y col., 2012). A su vez se describió que, a nivel endometrial, la expresión del EGFR se da principalmente durante el diestro medio y tardío (Takatsu y col., 2015) y durante las etapas de pre-implantación e implantación (Kliem y col., 1998; Hambruch y col., 2010). Por lo tanto, los cambios en la expresión del sistema EGFR/EGF, podrían relacionarse con alteraciones en la receptividad uterina en VR sin ES.

El Factor Nodal (FNod) forma parte de la super familia del factor de crecimiento transformador  $\beta$  (Jones y col., 2006; Singh y col., 2011). Muchos de los miembros de esta super familia participan en la remodelación endometrial, lo cual es esencial durante el período de pre-implantación (Sugawara y col., 2010). Así mismo, trabajos realizados en humanos y ratones reportan que el rol principal del FNod estaría relacionado con la implantación, aunque todavía se desconoce su función específica (Sugawara y col., 2010; Park y Dufort, 2013). Papageorgiou y col. (2009), reportaron que el mismo fue detectado en el fluido uterino en humanos, por lo que su presencia podría estar relacionada, además, con el desarrollo embrionario.

La actividad del FNod está regulada por los niveles de éste y su inhibidor, Lefty, quien actúa como antagonista impidiendo que el FNod se una a su receptor (Park y Dufort, 2011). Un trabajo realizado en ratones postula que, la alteración en la regulación de FNod/Lefty estaría relacionada con pérdidas embrionarias (Park y Dufort, 2011). En bovino se han realizado pocos estudios sobre el FNod. Arganaraz y col. (2013) estudiaron la expresión del FNod en el oviducto y útero de vacas durante el ciclo estral y gestación temprana. Los resultados demuestran que el FNod se expresa tanto en el oviducto como en el útero de vacas vacías y preñadas. A nivel uterino, los mayores niveles de expresión se dieron durante el estro. La alteración de la expresión del FNod y su antagonista, Lefty, podría estar relacionada con fallas en el proceso de implantación en los bovinos (Arganaraz y col., 2013). Por lo tanto, debido a la importancia que tendría este factor en el proceso de implantación y a la falta de información del mismo, sería interesante estudiar la expresión endometrial del FNod en VR sin ES durante el diestro.

Las prostaglandinas juegan un rol muy importante en el establecimiento de la gestación ya que regulan la expresión de genes en el endometrio relacionados con la elongación e implantación del embrión (Brooks y col., 2014; Takatsu y col., 2015). De hecho, las concentraciones de prostaglandinas son mayores en el útero de hembras gestantes que en aquellas cíclicas o no gestantes (Brooks y col., 2014). En ovinos, durante el día 10 y 12, la P<sub>4</sub> induce la expresión endometrial de una gran variedad de genes que codifican proteínas relacionadas con la adhesión celular, el transporte de glucosa, transporte de aminoácido y enzimas, entre las que se encuentra la PTGS2 (Dorniak y col., 2011). La PTGS2, se encarga de la síntesis de prostaglandinas. Algunas de éstas, como prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y prostaciclina

I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), son consideradas importantes reguladoras de la interacción entre el conceptus y el endometrio durante la gestación temprana (Spencer y col., 2008). Además, se describió que la PGE<sub>2</sub> tienen un efecto luteotrófico (Katagiri y Takahashi, 2006), lo cual favorece el mantenimiento de la gestación.

En bovinos, la expresión de PTGS2 es mayor durante el diestro medio y tardío y durante la primera y última etapa de gestación (Arosh y col., 2003; Arosh y col., 2004). A nivel celular, la expresión de PTGS2 es mayor en las células del epitelio luminal que en las del estroma o miometrio (Arosh y col., 2004). Recientemente, un estudio realizado en VR describió una alteración en la expresión de PTGS2 (Wagener y col., 2017). Por lo tanto, la alteración de la expresión endometrial de PTGS2 podría estar relacionada con la subfertilidad en VR.

Las alteraciones del ambiente uterino, producidas por cambios en la expresión génica endometrial, podrían ser responsables de la disminución de la fertilidad en VR (Hayashi y col., 2017). Por lo tanto, el estudio de la expresión endometrial de transcritos involucrados en el establecimiento y mantenimiento de la gestación, nos ayudaría a comprender los mecanismos moleculares relacionados con subfertilidad en VR. El objetivo del presente capítulo fue comparar la expresión endometrial de ARNm de PR, ER, EGFR, FNod y PTGS2 entre VR sin ES y vacas fértiles. La hipótesis correspondiente a dicho objetivo fue que la expresión endometrial de ARNm de PR, ER, EGFR, FNod y PTGS2 difiere entre VR sin ES y vacas fértiles.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Diseño experimental*

Para la realización de este experimento se utilizaron vacas Holando Argentino (n= 110) de tambos comerciales de las localidades de Castelli, Brandsen y Lobos.

### **Definición del caso clínico**

Al igual que en el capítulo anterior, se consideró VR (n= 59) aquellas vacas con  $\geq 3$  servicios a intervalos regulares de tiempo (entre 17 y 25 días), vacías y clínicamente sanas (sin afecciones uterinas u ováricas). Además, las VR incluidas en el experimento no presentaron registros de abortos o tratamientos, ya sean hormonales o ATB, durante el período antes mencionado. Por otro lado, se consideró como vacas control (CF, n= 51) aquellas vacas con  $\geq 30$  dpp, clínicamente sanas y que quedaron preñadas dentro de las primeras dos IA.

### **Evaluación clínica**

La evaluación clínica de las vacas se realizó de la forma descrita en el capítulo anterior. En primer lugar se realizó un examen mediante US (ecógrafo Mindray™ 6600Vet, sonda lineal de 7.5 MHz) y posteriormente se realizó la técnica de flujeo manual para el diagnóstico de EC (Sheldon y col., 2002; Dominguez, 2006). Se incluyeron en el estudio solamente aquellas VR en las que se confirmó vacuidad y no presentaron EC o cualquier otra afección o anomalía. En el caso de las CF, se incluyeron aquellas vacas que se encontraban clínicamente

sanas al momento de la evaluación y que posteriormente quedaron preñadas en las primeras 2 IA.

### **Toma de muestras**

La muestra consistió en 2 cepillados endometriales tomados mediante la técnica de cytobrush. Uno de los cepillos se utilizó para el diagnóstico de ES y posteriormente, junto con el otro cepillo, se utilizaron para el estudio de la expresión de ARNm de PR, ER, EGFR, FNod y PTGS2.

El diagnóstico de ES se realizó como se describió en el capítulo anterior. Las VR y CF que fueron positivas al diagnóstico de ES (conteo de PMN  $\geq 5\%$ ) fueron eliminadas del experimento.

Para el estudio de expresión génica, el material de ambos cepillos se descargó en un eppendorf nuevo, libre de RNasas, que contenía 1 ml de estabilizador de ARN (RNA later, Qiagen). Los mismos fueron rotulados y colocados en gradillas refrigeradas hasta su llegada al laboratorio en donde fueron almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

Por último, se tomó una muestra de sangre de la vena coccígea y se depositó en tubos de sangre de polipropileno. Una vez en el laboratorio la sangre fue centrifugada a 600 rpm durante 10 min. El suero obtenido se colocó en tubos tipo eppendorf de 1,5 ml y rotulados. El suero obtenido se almacenó por duplicado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Estas muestras fueron utilizadas para medir las concentraciones de  $\text{P}_4$  mediante quimioluminiscencia (Progesterone II, inmunoanalizador Elecsys and Cobas e, Roche<sup>®</sup>, Mannheim, Alemania).

## **Estudio de la expresión génica endometrial**

### **a. Extracción de ARN**

Antes de comenzar con la extracción de ARN, a cada eppendorf se le agregó 500 µl de PBS (Invitrogen Corp.) helado libre de RNasas, se centrifugó a 8000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. El objetivo de este paso fue formar un pellet de células endometriales y eliminar el estabilizador de ARN.

Una vez que se obtuvo el pellet de células endometriales, a cada eppendorf se le agregó 500 µl de Trizol (TriReagent, Molecular Research Center Inc.) y se realizó la extracción de ARN según las indicaciones del fabricante, con la adición de 2 µl de glicógeno al momento de la incorporación del isopropanol e incubación de cada muestra a -20°C durante toda la noche, con el objetivo de mejorar el rendimiento de la extracción de ARN (Apéndice 1). Una vez obtenido el ARN, éste fue cuantificado por espectrofotometría y tratado con DNasas (DNase I amplification grade, Invitrogen Corp.) para eliminar el ADN genómico contaminante. Una vez finalizado este paso, se realizó la retrotranscripción.

### **b. Retrotranscripción**

Para la retrotranscripción se incubó 1 µg de ARN tratado con DNasa junto con 1.5 µl de primers random hexamers (160 ng/ µl) (Random primers, Biodynamics SRL) a 65°C durante 10 min (Apéndice I). Se dejó la mezcla a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, se agregó a la mezcla 4 µl de First Strand Buffer 5X (Invitrogen corp.), 2 µl de 0,1 M DTT, 1 µl de dNTPs 10mM y 1 µl de Inhibidor de RNasas (RNase Out, Invitrogen Corp.) y se la incubó a 37°C durante 2 min. Luego se le agregó 1 µl de la enzima retrotranscriptasa (MMLV, Invitrogen Corp.), siendo el volumen final de la reacción igual a 20 µl. Se incubó a

25°C por 10 min, luego a 37°C por 50 min y a 70°C por 15 in para inactivar la enzima. El ADNc se almacenó a -20°C hasta su utilización.

En todas las reacciones se procesó un control sin ARN y un control negativo de retrotranscripción sin la enzima retrotranscriptasa.

### **c. Selección y validación de primers**

Los primers seleccionados para el presente trabajo (Tabla, 3.1) fueron tomados de la bibliografía y evaluados mediante herramientas bioinformáticas. En el caso de EGFR y FNod, dado que no se encontraron primers que cumplieran las condiciones necesarias para su utilización, se diseñó un par de primers específico mediante el software Primer Premier (PREMIER Biosoft International).

Una vez recibidos los primers en el laboratorio, se realizó la validación de los mismos. Para ello se pusieron a punto los parámetros en la qPCR, tomando en cuenta el tamaño del amplicón producido y la temperatura de melting proporcionada por el proveedor de los primers. Las temperaturas de annealing se determinaron de forma empírica. Durante el proceso de validación, los productos de PCR fueron sembrados en un gel de agarosa 1,5% con el fin de corroborar la amplificación específica del producto en cuestión y la ausencia de dímeros de primers. Adicionalmente, se corroboró que los negativos de retrotranscripción (sin retrotranscriptasa) no presentaran producto de PCR y que en todas las reacciones se amplificara el producto del peso molecular correspondiente.

Para el estudio del transcrito de FNod se testearon tres pares de primers diferentes, para el estudio de EGF se testearon 4 pares de primers, para el estudio de EGFR se testearon dos pares de primers y para el resto de los genes se testeó uno. Una vez establecidos los parámetros de amplificación de cada par de primers,

se determinó la eficiencia de amplificación por qPCR a través de curvas de rango dinámico para cada par de cebadores. Se realizaron amplificaciones por duplicado de un ADNc correspondiente a una VR y sus diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000. Todas las curvas tuvieron una pendiente entre -3,2 y -3,5 y entre los duplicados la desviación estándar fue en todos los casos  $< 0,167$  según lo recomendado para realizar estudios de expresión génica relativos (Bustin, 2002). Si bien se logró obtener amplicones con los primers testeados de EGF, dicha PCR no mostró las eficiencias de reacción necesaria (mayores a 90%) para ser incluido en el presente estudio.

Tabla 3.1. Secuencia de los cebadores forward (F) y reverse (R), tamaño del producto de PCR y su referencia.

Cebador	Secuencia	Tamaño del producto	Referencia
PR	F: GAGAGCTCATCAAGGCAATTGG R: CACCATCCCTGCCAATATCTTG	227 pb	Forde y col. (2011a)
ER	F: CCTCTCTCACTTCAGGCACA R: ATCTCCAGCAGCAGGTCGTA	99 pb	Okumu y col. (2010)
EGFR	F: ATGCAGAAGGAGGCAAGGTC R: GTCGAGATCTCACTCGCAGG	166 pb	Diseñado por la Dra. Silvina Quintana
FNod	F: CCCCTCGCTTATATGCTGAGTCT R: TGCAGGCTACGGATGATGTC	68 pb	Diseñado por la Dra. Belén Rabaglino
PTGS2	F: CTAAACAAGAGCATCCAGAATGG R: GCTGTACGTAGTCTTCAATCACAATCT	106 pb	Sugimura y col. (2014)
GAPDH	F: TTCTGGCAAAGTGGACATCGT R: CTTGACTGTGCCGTTGAACTTG	112 pb	McGuire y col. (2004)

PR: Receptor de progesterona.

ER: Receptor de estradiol.

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico.

FNod: Factor Nodal.

PTGS2: prostaglandina-endoperóxido sintasa 2

GAPDH: gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa.

**d. PCR en tiempo real**

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo utilizando una mezcla preformada y optimizada de todos los componentes de la reacción (Mezcla Real, Biodynamics SRL), exceptuando primers, moldes y agua, en un volumen final de 25  $\mu$ l y por duplicado. La detección del producto amplificado se monitoreó en un equipo Rotor Gene Q (Qiagen, Hilden, Alemania), que mide el aumento de la fluorescencia en cada ciclo de PCR causado por la unión del EVA Green al ADN doble cadena.

Se efectuó una curva de disociación en cada caso para corroborar que se estaba amplificando el producto de tamaño esperado y asegurarse que no se forman dímeros de primer que pudieran estar interfiriendo en la lectura de fluorescencia del termociclador.

Todas las determinaciones se efectuaron con una concentración de cebadores de entre 448 a 900 mM. El programa de ciclado consistió en una desnaturalización inicial de la premezcla de 3 minutos a 95°C y cuarenta ciclos de 20 segundos a 95°C, 20 segundos a la temperatura de annealing específica del primer y 20 segundos a 72 °C.

Para la determinación de los niveles relativos de expresión de cada marcador se aplicó el método 2 delta-delta CT (Livak y Schmittgen, 2001). El gen endógeno utilizado para el análisis de expresión génica fue Gliceraldehído-3 fosfato deshidrogenasa (GAPDH) utilizándose ADNc de muestras de vacas en anestro como calibrador.

### *Análisis estadístico*

Para evaluar la diferencia de expresión relativa de los diferentes transcritos incluidos en el estudio entre VR y CF se utilizó un modelo lineal generalizado con una distribución Poisson y un enlace logarítmico (Procedimiento GLIMMIX, distribución Poisson, función Log Link; SAS, 2003). Se consideró que hubo diferencias significativas a partir de  $P < 0.05$ .

## **RESULTADOS**

De las 59 VR muestreadas, 6 presentaron ES, 9 presentaron niveles de  $P_4 < 1$  ng/ml y 28 fueron utilizadas para poner a punto la técnica RT-qPCR en tiempo real. De las 51 CF muestreadas, 8 presentaron ES, 18 presentaron niveles de  $P_4 < 1$  ng/ml y 15 no quedaron preñadas en las primeras dos IA. Por lo tanto, 16 VR y 10 CF fueron incluidas en el estudio. No obstante, a través del análisis estadístico utilizando el procedimiento UNIVARIATE de SAS (SAS, 2003), se determinó que una de las 10 CF incluidas en el estudio presentaba valores atípicos por lo que no se incluyó en el análisis estadístico final.

Los resultados obtenidos demuestran que hubo diferencias significativas en la expresión de ARNm de EGFR (RP= -1.098; 95% IC= -1.66 – -0.54;  $P < 0.01$ ; Figura 3.1), FNod (RP= -3.227; 95% IC -4.15 – -2.30;  $P < 0.01$ ; Figura 3.2) y PTGS2 (RP= 0.439; 95% IC= 0.39 – 0.49;  $P < 0.01$ ; Figura 3.3), siendo mayor la expresión de EGFR y FNod en VR que en CF y menor la expresión de PTGS2 en VR que en CF. En cuanto a PR y ER, no hubo diferencias significativas en la expresión de ARNm entre VR y CF (RP= 0.229; 95% IC= -1.13 – 1.59;  $P > 0.73$ ; RP= -0.517; 95% IC= -1.27 – 0.23;  $P = 0.17$ , respectivamente)

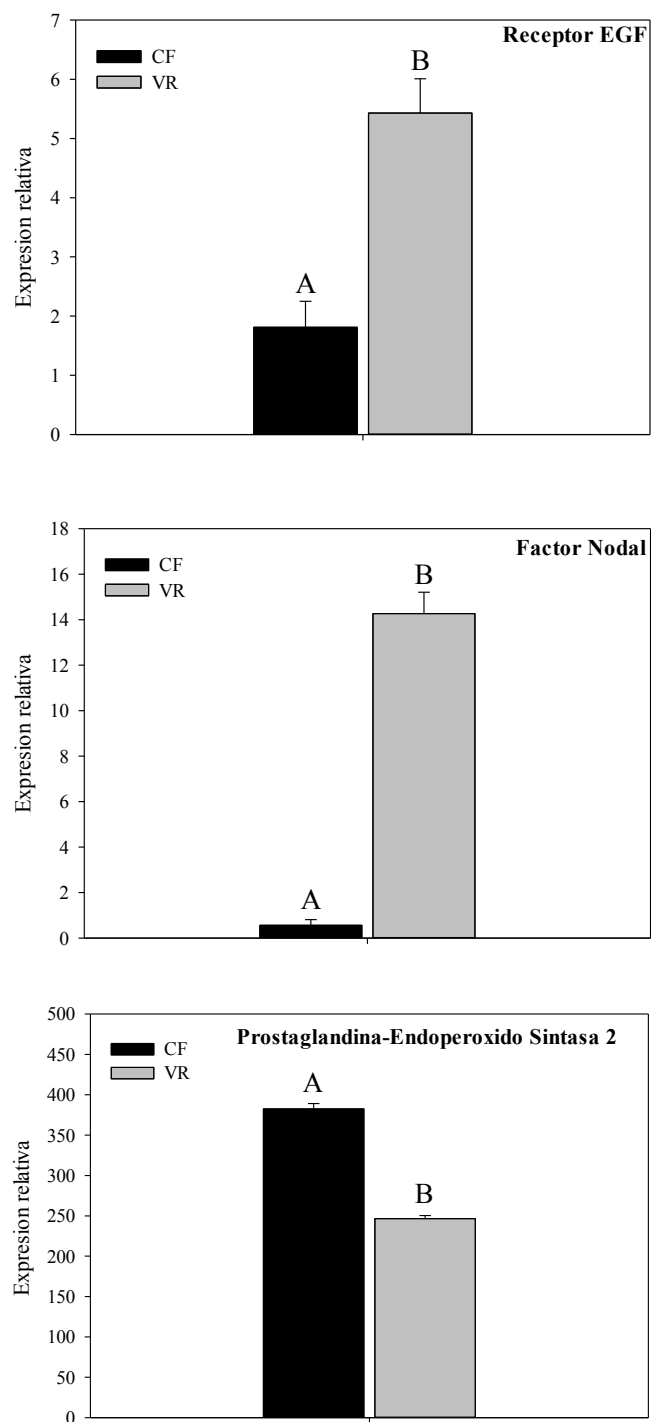


Figura 3.1. Comparación de la expresión relativa de ARNm del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR; panel superior), factor nodal (FNod; panel intermedio) y de la enzima prostaglandina-endoperoxido sintasa 2 (PTGS2; panel inferior) en vacas repetidoras (VR, n=16) y en vacas fértiles (CF, n=9;  $P < 0.01$ ).



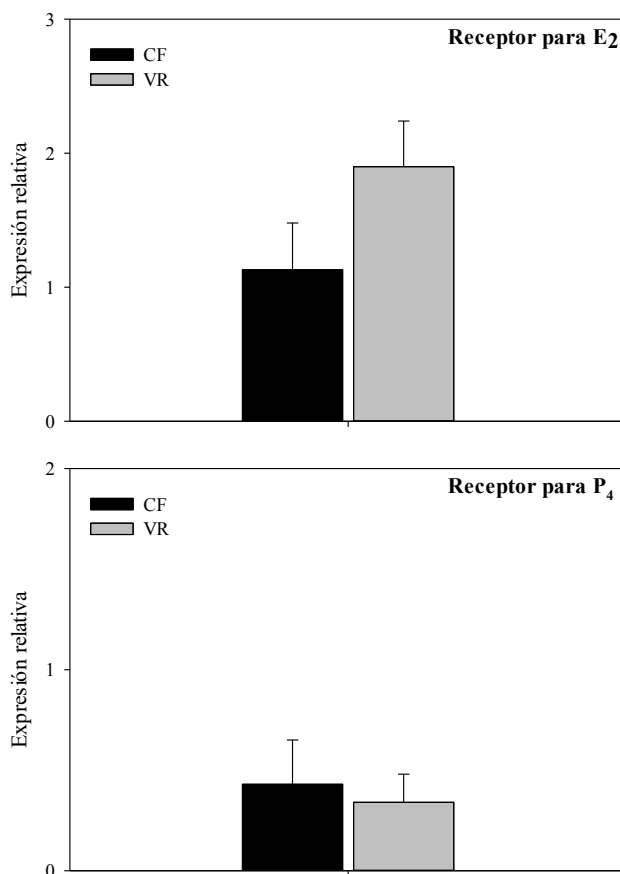


Figura 3.2. Comparación de la expresión relativa de ARNm del receptor de estradiol (ER; panel superior) y progesterona (PR; panel inferior) en vacas repetidoras (VR, n=16) y en vacas fértiles (CF;  $P>0.15$ ,  $P>0.73$ ).

## DISCUSIÓN

De acuerdo con nuestra hipótesis, se encontraron diferencias significativas en la expresión génica endometrial en VR comparándolas con CF. Las mismas corresponden a cambios en la expresión génica de EGFR, FNod y PTGS2, mientras que no hubo diferencias significativas en la expresión génica de ER y PR.

A pesar de que varios trabajos concuerdan en la importancia del EGF y su receptor (EGFR) para el establecimiento de la gestación en diferentes especies (Katagiri y Takahashi, 2004; Tamada y col., 2005; Bukowska y col., 2011; Singh y

col., 2011; Sagsoz y col., 2014), nuestros resultados demuestran una mayor expresión del ARNm de EGFR en VR comparándolas con CF. Una explicación para este resultado podría ser que, la mayor expresión de ARNm de EGFR en VR no necesariamente indicaría una mayor concentración del receptor a nivel celular, ya que el ARNm normalmente sufre modificaciones posteriores al proceso de transcripción cuyas alteraciones modificarían la expresión del receptor a nivel celular (Blaustein y col., 2007; Pérez-Sala Gozalo, 2012). Si bien la expresión génica es generalmente proporcional al número de copias de ARNm de un gen determinado (Quintana, 2013), un estudio realizado en Noruega describió una falta de correlación entre la expresión de ARNm evaluado a partir de RT-qPCR en tiempo real y microarreglos, y la expresión de proteínas evaluada por inmunohistoquímica (Jonsdottir y col., 2008). Por lo tanto, en futuras investigaciones sería interesante incluir el estudio de la expresión de la proteína, a través de técnicas como la inmunohistoquímica, para corroborar que la mayor expresión de ARNm se relacione con una mayor expresión de ésta, en este caso EGFR. Por otro lado, la alteración de los mecanismos que regulan la expresión de este receptor podrían ser la causa del incremento en la expresión, en este caso podrían estar alteradas las concentraciones de las hormonas esteroideas, especialmente E<sub>2</sub> o las de su ligando, el EGF, cuya alteración fue descrita en un 70% de VR sin ES (Katagiri y Takahashi, 2006).

Otro de los resultados obtenidos por el presente trabajo muestra una diferencia significativa en la expresión del FNod, siendo mayor la expresión de este factor en VR que en las CF. Este resultado es de suma importancia ya que, hasta el momento, hay escasa información sobre el patrón de expresión, regulación y

función del FNod en bovinos. El primer trabajo que estudio y evidenció la presencia del FNod en el tracto reproductivo del bovino fue realizado en Argentina y Alemania (Arganaraz y col., 2013). A su vez, determinaron que a nivel endometrial la expresión del ARNm fue mayor durante el estro y disminuyó 1.5 veces en el diestro y preñez temprana (Arganaraz y col., 2013). En el presente trabajo, realizado durante el diestro, la expresión del FNod fue mayor en VR que en CF. Este incremento en la expresión de FNod, podría relacionarse con un incremento en la expresión de su inhibidor, Lefty, ya que el FNod presenta un feed back positivo sobre la síntesis de él mismo y sobre la síntesis de su inhibidor (Shen, 2007), quien ha sido vinculado con casos de subfertilidad idiopática en humanos (Park y Dufort, 2013) y con pérdidas embrionarias en ratones (Park y Dufort, 2011). Lamentablemente, en el presente trabajo no se estudió la expresión de Lefty, por lo que no se puede comprobar dicha hipótesis. Por lo tanto, la alteración de la expresión del FNod podría estar relacionada con subfertilidad en VR.

A su vez, en el presente trabajo se determinó una diferencia significativa en la expresión génica endometrial de PTGS2 entre VR y CF, siendo menor la expresión en VR que en CF. En acuerdo con dicho resultado, Wagener y col. (2017) reportó una diferencia significativa en la expresión de PTGS2 entre VR y vacas control, siendo la expresión de PTGS2 6 veces menor en VR. Estos resultados se alinean con aquellos descritos por Arosh y col. (2003) y Dorniak y col. (2011), quienes describieron la importancia de las PG durante la implantación y el reconocimiento materno de gestación. Por lo tanto, la menor expresión de PTGS2 en VR, podría relacionarse con una menor expresión de PG relacionadas con el establecimiento de la gestación como la PGE quien a su vez presenta un efecto

luteotrófico. Por su parte, Ledgard y col. (2011), no encontró diferencias significativas en la expresión de PTGS2 comparando vacas con un potencial de fertilidad superior con vacas con un potencial de fertilidad inferior (el potencial de fertilidad se basó en la capacidad de secretar  $\text{PGF}_{2\alpha}$  en respuesta a la administración de oxitocina endovenosa). Teniendo en cuenta que las PG juegan un rol importante en el establecimiento de la gestación (Brooks y col., 2014; Spencer y col., 2016) y que la PTGS2 da lugar a la biosíntesis de prostanoïdes entre los que si incluyen: prostaglandinas ( $\text{PGF}_{2\alpha}$ , PGE, PGD), prostaciclina (PGI) y tromboxanos ( $\text{TXA}_2$ ) (Arosh y col., 2003), cuyas funciones biológicas varían ampliamente, sería interesante para futuras investigaciones incluir el estudio de moléculas relacionadas específicamente con la fertilidad, como los receptores de PGE, para comprender mejor el rol que estas moléculas ejercen sobre las VR.

Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la expresión génica endometrial de ER y PR entre VR y CF. Teniendo en cuenta que las hormonas esteroïdeas ( $\text{E}_2$  y  $\text{P}_4$ ) son responsables de regular sus propios receptores y a su vez regulan la expresión de muchos otros genes involucrados en la receptividad uterina, formación de histotrofo, crecimiento embrionario e implantación, parecería extraño no encontrar diferencia en la expresión de éstos y si en los otros tres transcritos estudiados. Una de las razones podría deberse a que la expresión de los ER y PR no es constante durante la etapa del diestro (Ing y Tornesi, 1997; Spencer y col., 2008; Okumu y col., 2010), por lo tanto, dicha característica podría dificultar la identificación de cambios en la expresión de los mismo entre VR y CF. A su vez, la expresión de PR en las células del epitelio luminal es baja a lo largo del ciclo estral y moderada en las células del epitelio

glandular y estroma (Robinson y col., 2001). Por lo tanto, la evaluación de la expresión de los PR en células obtenidas por cepillado endometrial podría dificultar la detección de cambios en la concentración de estos receptores.

Por último, las técnicas moleculares cada vez tienen mayor importancia en los trabajos de investigación ya que proveen valiosa información para comprender procesos tanto fisiológicos como patológicos a nivel molecular. Si bien existen protocolos que permiten llevarlas a cabo, la gran cantidad de variables que incluye el investigador para llevar a cabo su trabajo, como el tipo de muestras (células, tejidos, líquidos), forma de almacenamiento (-80°C, nitrógeno líquido), los insumos a utilizar (dependiendo de los protocolos seleccionados, marcas), hacen que no siempre sea sencillo poner a punto la técnica seleccionada (PCR, qPCR, microarreglos). Por lo tanto, la descripción de un protocolo exitoso para la realización de una de estas técnicas es sumamente valiosa para los investigadores que las utilizan. En lo que respecta a este trabajo podemos decir que, es posible almacenar células obtenidas de un cepillado endometrial de un animal vivo en un estabilizador de ARN (RNA later, Qiagen) a -20°C hasta su procesamiento y posteriormente realizar la extracción de ARN con Trizol (TriReagent, Molecular Research Center Inc.).

## **CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos demuestran diferencias significativas en la expresión génica endometrial de ARNm de EGFR, FNod y PTGS2 entre VR y CF, siendo mayor la expresión de EGFR y FNod en VR que en CF y menor la expresión

de PTGS2 en VR que en CF. Por otro lado, no se observó diferencias significativas en la expresión de ARNm de PR y ER entre VR y CF. Teniendo en cuenta la complejidad de los mecanismos moleculares que intervienen en establecimiento de la gestación y de la cantidad de moléculas que participan, este trabajo aporta valiosa información que servirá de base para futuras investigaciones.

## CAPÍTULO IV

### IDENTIFICACIÓN DE *ESCHERICHIA COLI* Y *TRUEPERLLA PYOGENES* POR MARCHA BACTERIOLÓGICA CONVENCIONAL Y ESPECTROSCOPIA INFRARROJA TRANSFORMADA DE FOURIER EN VACAS LECHERAS

#### INTRODUCCIÓN

Muchos trabajos han demostrado que las enfermedades uterinas como metritis (MT), EC y endometritis subclínica ES, están asociadas a una disminución de la fertilidad y a un incremento de los rechazos por causas reproductivas en vacas lecheras (Giuliodori y col., 2013a, b; Madoz y col., 2013). En muchos casos la causa es microbiana y *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Trueperella pyogenes* (*T. pyogenes*) son las bacterias patógenas más comúnmente aisladas de casos de MT, EC y en algunos casos de ES (Prunner y col., 2014b). A éstas les siguen *Prevotella sp.*, *Fusobacterium necrophorum*, y *Fusobacterium nucleatum* (Sheldon y col., 2009). El tratamiento para dichas afecciones se basa en la administración de antibióticos de forma empírica. Esto se debe a que la mayoría de los veterinarios no toman muestras bacteriológicas de rutina para completar el diagnóstico y definir un tratamiento. Normalmente, para los casos de MT se recomienda ceftiofur, penicilina procaínica o tetraciclina (administración subcutánea o intramuscular). Para los casos de EC y ES se recomienda cefapirina benzatínica (administración intrauterina) (Kasimanickam y col., 2005; LeBlanc, 2008). El inconveniente es que el uso empírico de antibióticos podría ser un factor importante en la aparición de

cepas bacterianas resistentes (Santos y col., 2010c). Un estudio reportó que más del 50% de *T. pyogenes* aisladas eran resistentes a amoxicilina, ampicilina, cloranfenicol, florfenicol, oxitetraciclinas y penicilinas (Santos y col., 2010b). Así mismo se reportó que el 35% de *E. coli* aisladas fueron multidroga resistentes (ampicilina-cloranfenicol-florfenicol) (Santos y col., 2010c). Recientemente, un estudio reveló una posible resistencia a la cefapirina (cefalosporina de primera generación), uno de los antibióticos más utilizados en el tratamiento de EC en vacas lecheras (de Boer M, 2015). El uso de cefalosporinas para el tratamiento de enfermedades en animales de producción es un tema controversial ya que éste es un antibiótico de reserva en medicina humana. De hecho, muchos países han implementado medidas para restringir el uso al mínimo y evitar así la resistencia bacteriana (Trevisi y col., 2014; Kasimanickam VR, 2016; Kuipers A, 2016).

La marcha bacteriológica convencional se basa en las características morfológicas, de crecimiento, propiedades bioquímicas y metabólicas de las bacterias (Winn WC, 2006). A pesar de que este método es muy útil para identificar bacterias, en la práctica diaria presentan algunas limitaciones que se observan de manera específica y más evidente en algunos tipos bacterianos. Dentro de las limitaciones podemos mencionar el tiempo para llegar a un diagnóstico y la dificultad y falta de precisión para identificar algunos tipos bacterianos (Fernández Olmos y col., 2010). Los métodos moleculares para la identificación bacteriana permiten soslayar estas limitaciones.

La espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (TF-IR) es una técnica que permite determinar la composición bioquímica (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, polisacáridos, etc.) de cualquier material (Naumann y col., 1991). De



hecho, hace algunos años que se está utilizando como método de identificación bacteriana (Kuhm y col., 2009). Gracias a que los microorganismos son bioquímicamente diferentes unos de otros, el espectro que generan actúa como una huella digital, permitiendo diferenciarlos en género, especie, tipo y serotipo (Beekes y col., 2007). Esta diferenciación se basa en la distancia espectral entre microorganismos, cuanto más distancia haya entre los espectros mayor la diferencia bioquímica entre microorganismos. Por ello, es muy importante poseer una base de datos con una gran cantidad de espectros de referencia. Contando con una base de datos completa, TF-IR podría ser un método simple, relativamente rápido y de bajo costo para la identificación de bacterias uterinas patógenas. No obstante, TF-IR no es una herramienta que se puede utilizar a campo, sino que, al igual que el método convencional, las muestras deben remitirse al laboratorio.

Los objetivos del presente trabajo fueron: 1) determinar el grado de acuerdo entre marcha bacteriológica convencional y la TF-IR; y 2) determinar si la base de datos generada a partir de bacterias uterinas de vacas lecheras europeas podría ser utilizada para la identificación de bacterias uterinas de vacas lecheras de nuestro país. Las hipótesis correspondientes a dichos objetivos fueron: 1) La TF-IR puede ser utilizada para la identificación de bacterias uterinas de vacas lecheras, y 2) la base de datos producida a partir de bacterias obtenidas de vacas lecheras europeas puede ser utilizada para la identificación de bacterias uterinas de vacas lecheras de nuestro país.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Diseño experimental*

Para la realización del presente trabajo se utilizaron vacas Holando Argentino (n= 64) de tambos comerciales de las localidades de Brandsen (35°17'S, 58°23'W) y Castelli (36°10'S, 57°78'W), provincia de Buenos Aires, Argentina.

### **Evaluación clínica**

La evaluación clínica se realizó en vacas entre 5 y 60 dpp que no habían sido tratadas con antibióticos durante los 14 días previos al estudio. La revisión de las vacas comenzó con la evaluación de la descarga vaginal (DV) a través de la técnica denominada flujeo manual. Dicha técnica consiste en limpiar la zona perineal e introducir suavemente una mano en forma de cuña cubierta por un guante de tacto nuevo y lubricado. El flujo vaginal se obtuvo desde la porción craneal de la misma y se lo clasificó en 4 grados: DV0 corresponde a un flujo normal, DV1 corresponde a un flujo con flóculos de pus (<50% de pus), DV2 corresponde a un flujo purulento sin olor ( $\geq$ 50% de pus) y DV3 corresponde a un flujo purulento y con olor fétido. Debido a que las muestras fueron tomadas de vacas con un amplio rango de dpp, el grado de DV fue tomado como una clasificación descriptiva y no como indicativo de MET o EC como lo describe (Williams y col., 2005)

### **Muestras bacteriológicas**

Las muestras bacteriológicas fueron tomadas a cada una de las vacas incluidas en el experimento independientemente del grado de DV (0-3). Para la obtención de las muestras se utilizó la técnica cytobrush (CB) con el agregado de

una camisa sanitaria (SBS Cryo<sup>®</sup>Tec, Buenos Aires, Argentina) para evitar contaminación proveniente de la vagina (Westermann y col., 2010). Para realizar la técnica CB se utilizó una pistola de acero inoxidable (similar a las que se utilizan para inseminación) que constaba de dos partes, una pieza tubular externa y un vástago interno que poseía en su extremo anterior 1 cm de rosca al cual se le adosó un cepillito estéril utilizado en ginecología humana (Medibrush XL<sup>®</sup>, Medical Engineering Co, SA, Argentina). Posteriormente se colocó una vaina de inseminación (IVM Technologies, París, Francia) para cubrir la pistola y el cepillito. Por encima de ésta se colocó una camisa sanitaria. Una vez lista la pistola se procedió al enhebrado de modo similar a la técnica utilizada en IA. En el cérvix, se tiró hacia atrás la camisa sanitaria para rasgarla. Pasado el cérvix se expuso el cepillito al endometrio y en contacto con el mismo se lo hizo rotar unas 4 veces. Antes de retirar la pistola, el cepillito se retrajo para que quede protegido nuevamente por la vaina plástica de inseminación. Una vez obtenida la muestra, se introdujo el cepillito en un medio de transporte Stuart (Eurotubo, DeltaLab, Barcelona, España) el cual se colocó en una caja de poliestireno expandido con refrigerantes hasta su llegada al Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

En el laboratorio, cada cepillo fue cultivado en un medio agar sangre base, con el agregado de 5% de sangre ovina desfibrinada (Laboratorios Britania, Buenos Aires, Argentina). Las bacterias se identificaron por las siguientes características: morfología de colonia, coloración Gram, tipo de hemólisis y pruebas bioquímicas convencionales (Winn WC, 2006). Las colonias bacterianas obtenidas (n= 27) fueron frezadas a -80 °C hasta su envío al Instituto de Microbiología de la

Universidad de Medicina Veterinaria de Viena, Austria, donde fueron identificadas por TF-IR.

### **TF-IR**

En el Instituto de Microbiología, las muestras (n= 27) fueron re-cultivadas en placas de agar sangre a 37 °C por 48 a 72 h para hacerlas crecer nuevamente. El protocolo utilizado para la identificación de las bacterias por el método TF-IR fue realizada según describieron Wagener y col. (2015) y será descrito brevemente a continuación. Una submuestra de cada colonia se cultivó a 37 °C por 48 h en agar sangre. De las colonias obtenidas se tomó otra submuestra y se cultivó en agar tripticasa soya (Oxoid, TSA, Hampshire, Inglaterra) a 30°C por 24 h. De las colonias obtenidas en este medio se tomó una ansada (1mm de diámetro) de material celular que fue suspendido en 100 µl de agua estéril desionizada y homogeneizada. Una alícuota de 30 µl de esa suspensión fue colocada en una placa de ZnSe y secadas en horno a 40 °C por 40 min. Las mediciones por TF-IR se realizaron cubriendo un rango espectral de 4000 a 500 cm<sup>-1</sup> (Bruker Optics). El análisis de los distintos espectros obtenidos fue analizado utilizando OPUS software (versión 5.5; Bruker Optics GmbH).

La base de datos utilizada para la identificación de bacterias uterinas está formada por más de 700 especies bacterianas (Wenning y col., 2008), incluyendo más de 200 especies bacterianas aisladas de vacas lecheras con infección uterina de tambos de Europa (Prunner y col., 2014b; Wagener y col., 2014; Wagener y col., 2015).

### *Análisis estadístico*

El grado de acuerdo entre la marcha bacteriológica convencional y TF-IR fue evaluada mediante el coeficiente Kappa, y la probabilidad de aislamiento bacteriano según el grado de DV fue evaluado por regresión logística (Lauritsen, 2000-2008).

## **RESULTADOS**

De las 64 muestras bacteriológicas, 9 (14%, 9/64) fueron excluidas del análisis por contaminación. Por lo tanto, se analizaron los resultados de 55 muestras bacteriológicas correspondientes a 55 vacas. Un 33% de vacas tuvieron DV0 (18/55), un 22% DV1 (12/55), un 10% DV2 (10/55), y un 27% tuvieron DV3 (15/55). Se aisló *E. coli* (n= 14), *T. pyogenes* (n= 12) y *Staphylococcus coagulasa negativo* (SCN) (n= 1) en 27 vacas de 64 vacas muestreadas. En todos los casos las bacterias crecieron en monocultivo.

Las muestras positivas a *E. coli*, *T. pyogenes* y SCN (n= 27) fueron enviadas al Instituto de Microbiología, Viena, Austria, donde fueron nuevamente cultivadas obteniendo un crecimiento bacteriano en 25 de 27 muestras enviadas. Las dos muestras en las que no se obtuvo crecimiento bacteriano correspondían a *T. pyogenes*. Por lo tanto, 25 muestras fueron evaluadas por TF-IR: 14 de *E. coli*, 10 de *T. pyogenes* y una muestra de SCN (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Efecto del grado de descarga vaginal en el riesgo de aislar *Escherichia coli* y *Trueperella pyogenes* en vacas lecheras (n= 55)

	Aislamiento bacteriano <sup>a</sup>		
	% (n)	RP (95% IC)	P
Descarga vaginal (DV)			0.06
DV0	39 (7/8)	Referencia	
DV1	25 (3/12)	0.64 (0.21-2.01)	
DV2	60 (6/10)	1.54 (0.71-3.33)	
DV3	73 (11/15)	1.88 (0.98-3.63)	

<sup>a</sup>Determinado por marcha bacteriológica convencional.

<sup>b</sup>RP (95% IC): Razón de probabilidad y 95% del intervalo de confianza.

FT-IR identificó 12 de las 14 muestras correspondientes a *E. coli*. Las otras dos muestras fueron identificadas como *Enterococcus faecium* y *Citrobacter freundii*. En el caso de *T. pyogenes*, FT-IR identificó ocho de las 10 muestras y las dos restantes fueron identificadas como *Streptococcus dysgalactiae*. Por último, FT-IR identificó la única muestra de SCN correctamente. El grado de acuerdo entre la marcha bacteriológica convencional y FT-IR tuvo un coeficiente Kappa de 0.73 (95%CI = 0.52 – 0.95, P <0.001).

Basándonos en los resultados de la marcha bacteriológica convencional, la probabilidad de aislar *E. coli* y *T. pyogenes* tendió a incrementarse junto con el grado de DV ( $P= 0.06$ ), siendo el porcentaje de aislamiento de 39% (7/18) en vacas con DV0, 25% (3/12) en vacas con DV1, 60% (6/10) en vacas con DV2, y 73% (11/15) en vacas con DV3 (Figura 1). La probabilidad de aislar *E. coli* o *T. pyogenes* fue 1.88 veces más alta en vacas con DV3 que en vacas con DV0 (Tabla 1).

## DISCUSIÓN

Si bien la mayoría de los autores concuerda en que TF-IR es una herramienta que combina alta especificidad, bajo costo y fácil procesamiento, la mayoría de los

estudios que se han realizado comparan dicha técnica con técnicas moleculares complejas y costosas (Kuhm y col., 2009; Samelis y col., 2011). Nuestro trabajo compara TF-IR con la técnica de identificación bacteriana convencional, ampliamente utilizada por los laboratorios, intentando proponer una alternativa más eficiente que brinde resultados en un menor tiempo y a bajo costo. Nuestro trabajo determinó que TF-IR tiene un grado de acuerdo bueno con la marcha bacteriológica convencional para la identificación de *E. coli* y *T. pyogenes*. Este resultado concuerda con un estudio reciente que demuestra que TF-IR mejora y facilita la identificación de bacterias involucradas en casos de mastitis comparándolo con métodos convencionales de diagnóstico (Schabauer y col., 2014). El tiempo que lleva obtener el resultado bacteriológico es  $< 3.5$  días, lo cual es menor al tiempo que lleva obtener un resultado por la marcha bacteriológica convencional, ya que normalmente las placas se incuban una semana (especialmente cuando no hay crecimiento previo de bacterias o cuando éstas son de crecimiento lento) y es más laborioso (Fernández Olmos y col., 2010). No obstante, hubo 4 casos en los que la identificación bacteriana por marcha bacteriológica convencional difirió de la identificación por FT-IR. La razón de dicha diferencia no es fácil de determinar. En líneas generales se puede decir que, para lograr un resultado preciso mediante FT-IR es necesario tener una base de datos completa (Santos y col., 2010a) y tanto mediante FT-IR como por marcha bacteriológica convencional las habilidades del operador son de suma importancia (Bou y col., 2011). Si bien se ha utilizado la TF-IR para la identificación de bacterias uterinas (Prunner y col., 2014b; Wagener y col., 2015), a nuestro conocimiento, este es el primer estudio que compara la TF-IR con la marcha bacteriológica convencional utilizando muestras uterinas de vacas

con distinto tipo de DV. No obstante, se requiere otro estudio con un mayor número de muestras para confirmar dichos resultados.

Se ha demostrado que TF-IR tiene un gran poder de resolución lo que le permite poder diferenciar microorganismos a distintos niveles taxonómicos (Kirschner y col., 2001; Wenning y Scherer, 2013). De hecho, TF-IR es capaz de identificar cambios en la composición bioquímica de bacterias cultivadas en distintos medios (Wenning y col., 2008) o de bacterias que hayan mutado o hayan variado su composición bioquímica para adaptarse a un nuevo hospedador (Kummerle y col., 1998; Beekes y col., 2007; Grunert y col., 2013; Grunert y col., 2014). El punto clave para que esta técnica sea exitosa es la cantidad de espectros de referencia que contenga la base de datos (Kummerle y col., 1998; Wenning y Scherer, 2013). Cuantos más espectros de referencia tenga la base de datos, mayor es el poder de resolución de la técnica. La base de datos que utilizamos para nuestro trabajo fue construida con espectros de bacterias uterinas de vacas lecheras europeas. A pesar de que las bacterias a identificar provenían de un origen y sistema de producción distinto, pudimos identificar las bacterias uterinas de vacas de nuestro país. Una de las limitaciones del presente trabajo es que no se involucraron bacterias anaerobias relacionadas con infecciones uterinas, lo cual hubiese sido de gran interés. La razón principal por lo que no se hizo fue las dificultades para tomar muestras con las condiciones necesarias para cultivo de anaerobios en los tambos donde fueron tomadas las muestras. Por otro lado, en futuros trabajos, sería interesante estudiar los cambios en el espectro de las bacterias cuando éstas se vuelven resistentes a un antibiótico. Esto permitiría no solo identificar bacterias de un modo más eficiente sino también identificar cepas resistentes.



En el presente estudio, la probabilidad de aislamiento bacteriano de una muestra (*E. coli* y *T. pyogenes*) tendió a incrementarse junto con el grado de DV. Esto concuerda con lo reportado por Williams y col. (2005) quien encontró una correlación entre el aislamiento de bacterias reconocidas como patógenas (*E. coli*, *A. pyogenes*, *F. necrophorum* y *Prevotella melaninogenicus*) y el grado de DV. Por otro lado, (Williams y col., 2005; Westermann y col., 2010) encontraron una correlación significativa entre *T. pyogenes* y grado de DV ( $P < 0.001$ ), pero no entre *E. coli* y el grado de DV ( $P = 0.21$ ). Sorpresivamente, se observó una alta tasa de aislamiento bacteriano en vacas con DV0. No obstante, la tasa de aislamiento bacteriano en vacas con DV0 y DV1 fue menor que en vacas con DV2 y DV3. Este resultado concuerda con lo reportado por Wagener y col. (2015) quien aisló *E. coli* y *T. pyogenes* en vacas con todos los tipos de DV (0-3), siendo menor en vacas con DV0 y DV1 que en vacas con DV2 y DV3. Si bien la evaluación de la DV podría ayudar a determinar protocolos de tratamiento (por ejemplo, tratar con antibióticos solo vacas con DV2 y DV3) para reducir el uso empírico de antibióticos, en muchas vacas con DV2 y DV3 no se aíslan bacterias e incluso está demostrado que en muchas vacas se desarrolla un proceso de autocura sin necesidad de tratamiento. Por lo tanto, es necesario contar con nuevas herramientas que ayuden a los veterinarios a tomar decisiones en cuanto a los tratamientos. El FT-IR podría ser una herramienta que colabore con esto.

## CONCLUSIONES

En conclusión, mediante la técnica de FT-IR es posible identificar *E. coli* y *T. pyogenes* de muestras uterinas de vacas lecheras de Argentina utilizando la base de datos realizada a partir de muestras de vacas lecheras de Austria y Alemania. No obstante, se requieren más estudios para poder determinar si FT-IR puede ser utilizado como una alternativa a la marcha bacteriológica convencional.

## CONCLUSIONES GENERALES

La gran variedad de factores que participan en el desencadenamiento del SVR, hacen que sea complejo su estudio. En la presente tesis se estudió el diagnóstico y tratamiento de VR con y sin ES; la expresión génica endometrial de transcritos involucrados en el establecimiento y mantenimiento de la gestación en VR y CF; y la identificación de bacterias uterinas patógenas a través de un método más simple, relativamente más rápido y de bajo costo en comparación con la marcha bacteriológica convencional. Los resultados de dichos estudios nos llevaron a las siguientes conclusiones.

En el Capítulo II, determinamos que la ES no es la causa principal de las VR ya que la prevalencia es del 24% y además no está relacionada con el riesgo de preñez en VR. Contrariamente, la detección de  $\geq 2$  mm de luz uterina está relacionada con un menor riesgo de preñez en VR. Por otro lado, la presencia de líquido en la luz uterina, determinada a través de US, no se relaciona con la presencia de PMN en el endometrio, determinada a través de citología endometrial. El tratamiento con dosis más altas de BE en VR sin ES y el tratamiento con cefapirina benzatínica en VR con ES, no tuvieron efecto beneficioso en los porcentajes de preñez.

En el Capítulo III, determinamos que hubo diferencia en la expresión génica endometrial de EGFR, FNod, y PTGS2 entre VR y CF; pero no hubo diferencias en la expresión génica endometrial de ER y PR. Teniendo en cuenta la complejidad de los mecanismos moleculares que intervienen en establecimiento de la gestación y de la cantidad de moléculas que participan, este trabajo aporta valiosa información que servirá de base para futuras investigaciones.

En el Capítulo IV, mediante la técnica de FT-IR es posible identificar *E. coli* y *T. pyogenes* de muestras uterinas de vacas lecheras de Argentina utilizando la base de datos realizada a partir de muestras de vacas lecheras de Austria y Alemania. No obstante, se requieren más estudios para poder determinar si FT-IR puede ser utilizado como una alternativa a la marcha bacteriológica convencional.

## BIOGRAFÍA PERSONAL

La Medica Veterinaria Maria Jaureguiberry, nació en la ciudad de Chascomús, provincia de Buenos Aires, el 10 de enero de 1986, y ha residido en la ciudad de Castelli desde esa fecha junto a sus padres, Catalina M. Ortiz y Alejandro M. Jaureguiberry, y sus hermanas Dolores, Milagro y Juana. Realizó sus estudios primarios en la escuela N°1 Domingo Faustino Sarmiento (1992-1998) y sus estudios secundarios en la escuela Media N°1 de Castelli (1999-2003). Paralelamente estudió inglés en un instituto de la localidad de Castelli durante 7 años aprobando el examen de 6° año de adultos en la Cultural Inglesa de Buenos Aires (diciembre de 2003). Realizó sus estudios universitarios en la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV) de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) durante el período 2004-2010. En el año 2009 obtuvo una beca de investigación para estudiantes de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la UNLP para trabajar en “Endometritis clínica y subclínica en vacas de tambo: Diagnostico, prevalencia e impacto sobre la eficiencia reproductiva”, bajo la dirección del Dr. Rodolfo Luzbel de la Sota y la codirección de la Dra. Laura Vanina Madoz.

Una vez finalizados los estudios, en 2010, retornó a la ciudad de Castelli donde trabajó en la veterinaria “San Narciso” en el área de pequeños animales realizando un reemplazo por tres meses de la veterinaria encargada. Luego trabajó durante dos meses en el tambo “La Polvorilla” en el sector de Guachera como encargada de la misma.

En abril de 2011, la UNLP le otorgó una beca doctoral de Tipo A para comenzar a trabajar en su proyecto de tesis doctoral. Como consecuencia de un

programa de Cooperación Científico-Tecnológica entre el Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la República Argentina (MINCyT) y el Ministerio de Ciencia e Investigación de la República de Austria (BMWF) realizó dos viajes de 45 días a la ciudad de Viena, Austria; como becaria del proyecto “Diagnóstico y Tratamiento de Vacas Repetidoras con Endometritis Subclínica en Tambos de Austria y Argentina” donde tuvo la oportunidad de trabajar en el cuarto experimento de esta tesis bajo la dirección de los Drs. Marc Drillich y Monika Ehling-Schulz. En abril de 2014 le fue otorgada una beca doctoral de tipo B de la UNLP, pero renunció a la misma para aceptar una beca de CONICET para finalizar su tesis doctoral. Como estudiante de postgrado participó en distintos proyectos y realizó varios cursos relacionados con la temática de su tesis. Parte de los resultados obtenidos de su tesis doctoral ya fueron publicados en congresos y revistas de alcance nacional e internacional.

Desde el año 2011 ha desarrollado tareas de docencia universitaria como Ayudante Diplomada dedicación simple de la Cátedra y el Servicio de Reproducción Animal, y ha desarrollado las tareas de investigación correspondientes a esta tesis doctoral en el marco de los Proyectos de Incentivos docentes de la Catedra. El 31 de octubre de 2015 se casó con Juan Martin Aristizabal y el 29 de diciembre de 2016 nació su hija Rosario.

Una vez finalizada esta tesis, durante su posdoctorado continuara con su labor de investigación en el área de Neonatología bovina estudiando los factores de riesgo relacionados con el crecimiento, morbilidad y mortalidad en terneras de tambo en la Catedra y Servicio de Reproduccion Animal y en el CEDIVE de Chascomús.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Akbalik ME, Ketani MA. Expression of epidermal growth factor receptors and epidermal growth factor, amphiregulin and neuregulin in bovine uteroplacental tissues during gestation. *Placenta*. 2013; 34: 1232e1242.
2. Alnimer MA, Husein MQ. The effect of progesterone and oestradiol benzoate on fertility of artificially inseminated repeat-breeder dairy cows during summer. *Reprod Domest Anim*. 2007; 42: 363-369.
3. Amiridis GS, Tsiligianni T, Dovolou E, Rekkas C, Vouzaras D, Menegatos I. Combined administration of gonadotropin-releasing hormone, progesterone, and meloxicam is an effective treatment for the repeat-breeder cow. *Theriogenology*. 2009; 72: 542-548.
4. Arganaraz ME, Apichela SA, Kenngott R, Vermehren M, Rodler D, Palma GA, Miceli DC, Sinowatz F. Expression and localization of nodal in bovine oviduct and uterus during different functional stages of oestrus cycle and pregnancy. *Histochem Cell Biol*. 2013; 139: 89-97.
5. Arosh JA, Banu SK, Chapdelaine P, Emond V, Kim JJ, MacLaren LA, Fortier MA. Molecular cloning and characterization of bovine prostaglandin E2 receptors EP2 and EP4: expression and regulation in endometrium and myometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology*. 2003; 144: 3076-3091.
6. Arosh JA, Banu SK, Chapdelaine P, Fortier MA. Temporal and tissue-specific expression of prostaglandin receptors EP2, EP3, EP4, FP, and cyclooxygenases 1 and 2 in uterus and fetal membranes during bovine pregnancy. *Endocrinology*. 2004; 145: 407-417.
7. Ayalon N. A review of embryonic mortality in cattle. *J Reprod Fertil*. 1978; 54: 483-493.
8. Bage R, Gustafsson H, Larsson B, Forsberg M, Rodriguez-Martinez H. Repeat breeding in dairy heifers: follicular dynamics and estrous cycle characteristics in relation to sexual hormone patterns. *Theriogenology*. 2002; 57: 2257-2269.

9. Bany BM, Kennedy TG. Regulation by epidermal growth factor of prostaglandin production and cyclooxygenase activity in sensitized rat endometrial stromal cells in vitro. *J Reprod Fertil.* 1995; 104: 57-62.
10. Barlund CS, Carruthers TD, Waldner CL, Palmer CW. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology.* 2008; 69: 714-723.
11. Baron EJ, Weissfeld, A., Fuselie, P., Brenner, D. *Manual of Clinical Microbiology.* Vol 1995.
12. Bazer FW, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Wu G. Comparative aspects of implantation. *Reproduction.* 2009; 138: 195-209.
13. Beekes M, Lasch P, Naumann D. Analytical applications of Fourier transform-infrared (FT-IR) spectroscopy in microbiology and prion research. *Vet Microbiol.* 2007; 123: 305-319.
14. Berry DP, Buckley F, Dillon P, Evans RD, Rath M, Veerkamp RF. Genetic parameters for body condition score, body weight, milk yield, and fertility estimated using random regression models. *J Dairy Sci.* 2003; 86: 3704-3717.
15. Blaustein M, Pelisch F, Srebrow A. Signals, pathways and splicing regulation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 2031-2048.
16. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. En: *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.* 2011, 601-608.
17. Bridges GA, Day ML, Geary TW, Cruppe LH. Triennial Reproduction Symposium: deficiencies in the uterine environment and failure to support embryonic development. *J Anim Sci.* 2013; 91: 3002-3013.
18. Brooks K, Burns G, Spencer TE. Conceptus elongation in ruminants: roles of progesterone, prostaglandin, interferon tau and cortisol. *J Anim Sci Biotechnol.* 2014; 5: 53.
19. Bukowska D, Kempisty B, Jackowska M, Wozna M, Antosik P, Piotrowska H, Jaskowski JM. Differential expression of epidermal growth factor and transforming growth factor beta isoforms in dog endometrium



- during different periods of the estrus cycle. *Pol J Vet Sci.* 2011; 14: 259-264.
20. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 2002; 29: 23-39.
  21. Butler ST. Nutritional management to optimize fertility of dairy cows in pasture-based systems. *Animal.* 2014; 8 Suppl 1: 15-26.
  22. Cary NC 1990. SAS/STAT user's guide (SAS Inst. Inc.).
  23. Casida L. Present status of the repeat breeder cow problem. *Journal of Dairy Science.* 1961; 44: 2323-2329.
  24. Castro N, Kawashima C, van Dorland HA, Morel I, Miyamoto A, Bruckmaier RM. Metabolic and energy status during the dry period is crucial for the resumption of ovarian activity postpartum in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2012; 95: 5804-5812.
  25. Cheong SH, Nydam DV, Galvao KN, Crosier BM, Gilbert RO. Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci.* 2011; 94: 762-770.
  26. de Boer M HC, Hussein H, and McDougall S. Minimum inhibitory concentrations of selected antimicrobials against *Escherichia coli* and *Trueperella pyogenes* of bovine uterine origin. *J Dairy Sci.* 2015; 98: 4427-4438.
  27. Deguillaume L, Geffre A, Desquilbet L, Dizien A, Thoumire S, Vorniere C, Constant F, Fournier R, Chastant-Maillard S. Effect of endocervical inflammation on days to conception in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2012; 95: 1776-1783.
  28. Diskin MG, Morris DG. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Domest Anim.* 2008; 43 Suppl 2: 260-267.
  29. Diskin MG, Murphy JJ, Sreenan JM. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. *Anim Reprod Sci.* 2006; 96: 297-311.
  30. Dominguez G, Magnasco, M., Magnasco, R., Hernandez, J., Risco, C., de la Sota, R.L. Effect of clinical endometritis on reproductive performance in Holstein cows in Argentina. *Theriogenology* 2006; 66: 679-680.

31. Dorniak P, Bazer FW, Spencer TE. Prostaglandins regulate conceptus elongation and mediate effects of interferon tau on the ovine uterine endometrium. *Biol Reprod.* 2011; 84: 1119-1127.
32. Edmonson AJ, Lean, I.J., Weaver, L.D., Farver, T., and Webster, G. A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows. *J Dairy Sci.* 1989; 72: 68-78.
33. Fabian K, Makrai L, Sachse K, Szeredi L, Egyed L. An investigation of the aetiological role of bovine herpesvirus 4 in bovine endometritis. *Vet J.* 2008; 177: 289-292.
34. Ferguson JD, Galligan DT, Thomsen N. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *J Dairy Sci.* 1994; 77: 2695-2703.
35. Fernández Olmos A, García de la Fuente C, Saéz Nieto JA, Valdezate Ramos S. Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. En: *Procedimientos en Microbiología Clínica.* 2010, 52.
36. Forde N, Beltman ME, Duffy GB, Duffy P, Mehta JP, O'Gaora P, Roche JF, Lonergan P, Crowe MA. Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. *Biol Reprod.* 2011a; 84: 266-278.
37. Forde N, Carter F, Spencer TE, Bazer FW, Sandra O, Mansouri-Attia N, Okumu LA, McGettigan PA, Mehta JP, McBride R, O'Gaora P, Roche JF, Lonergan P. Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow know she is pregnant? *Biol Reprod.* 2011b; 85: 144-156.
38. Forde N, Lonergan P. Transcriptomic analysis of the bovine endometrium: What is required to establish uterine receptivity to implantation in cattle? *J Reprod Dev.* 2012; 58: 189-195.
39. Forde N, Mehta JP, Minten M, Crowe MA, Roche JF, Spencer TE, Lonergan P. Effects of low progesterone on the endometrial transcriptome in cattle. *Biol Reprod.* 2012; 87: 124.
40. Garcia-Ispierto I, Lopez-Gatius F, Santolaria P, Yaniz JL, Nogareda C, Lopez-Bejar M. Factors affecting the fertility of high producing dairy herds in northeastern Spain. *Theriogenology.* 2007; 67: 632-638.

41. Ghanem ME, Nakao T, Nakatani K, Akita M, Suzuki T. Milk progesterone profile at and after artificial insemination in repeat-breeding cows: effects on conception rate and embryonic death. *Reprod Domest Anim.* 2006; 41: 180-183.
42. Gilbert RO, Shin ST, Guard CL, Erb HN, Frajblat M. Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology.* 2005; 64: 1879-1888.
43. Giuliodori M, Delavaud C, Chilliard Y, Becú-Villalobos D, Lacau-Mengido I, De La Sota R. High NEFA concentrations around parturition are associated with delayed ovulations in grazing Dairy Cows. *Livestock Science.* 2011.
44. Giuliodori MJ, Magnasco RP, Becu-Villalobos D, Lacau-Mengido IM, Risco CA, de la Sota RL. Clinical endometritis in an Argentinean herd of dairy cows: risk factors and reproductive efficiency. *J Dairy Sci.* 2013a; 96: 210-218.
45. Giuliodori MJ, Magnasco RP, Becu-Villalobos D, Lacau-Mengido IM, Risco CA, de la Sota RL. Metritis in dairy cows: risk factors and reproductive performance. *J Dairy Sci.* 2013b; 96: 3621-3631.
46. Grummer RR, Wiltbank MC, Fricke PM, Watters RD, Silva-Del-Rio N. Management of dry and transition cows to improve energy balance and reproduction. *J Reprod Dev.* 2010; 56 Suppl: S22-28.
47. Grunert T, Monahan A, Lassnig C, Vogl C, Muller M, Ehling-Schulz M. Deciphering host genotype-specific impacts on the metabolic fingerprint of *Listeria monocytogenes* by FTIR spectroscopy. *PLoS One.* 2014; 9: e115959.
48. Grunert T, Wenning M, Barbagelata MS, Fricker M, Sordelli DO, Buzzola FR, Ehling-Schulz M. Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* capsular serotypes by means of artificial neural network-assisted Fourier transform infrared spectroscopy. *J Clin Microbiol.* 2013; 51: 2261-2266.
49. Gur S, Dogan N. The possible role of bovine herpesvirus type-4 infection in cow infertility. *Anim Sci J.* 2010; 81: 304-308.

50. Hambruch N, Haeger JD, Dilly M, Pfarrer C. EGF stimulates proliferation in the bovine placental trophoblast cell line F3 via Ras and MAPK. *Placenta*. 2010; 31: 67-74.
51. Hayashi KG, Hosoe M, Kizaki K, Fujii S, Kanahara H, Takahashi T, Sakumoto R. Differential gene expression profiling of endometrium during the mid-luteal phase of the estrous cycle between a repeat breeder (RB) and non-RB cows. *Reprod Biol Endocrinol*. 2017; 15: 20.
52. Hill J, Gilbert R. Reduced quality of bovine embryos cultured in media conditioned by exposure to an inflamed endometrium. *Aust Vet J*. 2008; 86: 312-316.
53. Ing NH, Tornesi MB. Estradiol Up-Regulates Estrogen Receptor and Progesterone Receptor Gene Expression in Specific Ovine Uterine Cells. *Biology of reproduction*. 1997; 56: 1205-1215.
54. Janowski T, Baranski W, Lukasik K, Skarzynski D, Rudowska M, Zdunczyk S. Prevalence of subclinical endometritis in repeat breeding cows and mRNA expression of tumor necrosis factor alpha and inducible nitric oxide synthase in the endometrium of repeat breeding cows with and without subclinical endometritis. *Pol J Vet Sci*. 2013; 16: 693-699.
55. Jones RL, Stoikos C, Findlay JK, Salamonsen LA. TGF- $\beta$  superfamily expression and actions in the endometrium and placenta. *Reproduction*. . 2006; 132: 217–232.
56. Jonsdottir K, Størkson R, Krog A, Bukholm IRK. Correlation Between mRNA Detected by Microarrays and qRT-PCR and Protein Detected by Immunohistochemistry of Cyclins in Tumour Tissue from Colonic Adenocarcinomas. *The Open Pathology Journal*. 2008; 2: 96-101.
57. Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*. 2004; 62: 9-23.
58. Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH. The effect of a single administration of cephalixin or

- cloprostenol on the reproductive performance of dairy cows with subclinical endometritis. *Theriogenology*. 2005; 63: 818-830.
59. Kasimanickam R, Kasimanickam V, Kastelic JP. Mucin 1 and cytokines mRNA in endometrium of dairy cows with postpartum uterine disease or repeat breeding. *Theriogenology*. 2014; 81: 952-958 e952.
  60. Kasimanickam VR OK, and Kasimanickam RK. Detection of genes encoding multidrug resistance and biofilm virulence factor in uterine pathogenic bacteria in postpartum dairy cows. *Theriogenology*. 2016; 85: 173-179.
  61. Katagiri S, Moriyoshi M, Takahashi Y. Low incidence of an altered endometrial epidermal growth factor (EGF) profile in repeat breeder Holstein heifers and differential effect of parity on the EGF profile between fertile Holstein (dairy) and Japanese Black (beef) cattle. *J Reprod Dev*. 2013; 59: 575-579.
  62. Katagiri S, Takahashi Y. Changes in EGF concentrations during estrous cycle in bovine endometrium and their alterations in repeat breeder cows. *Theriogenology*. 2004; 62: 103-112.
  63. Katagiri S, Takahashi Y. Potential relationship between normalization of endometrial epidermal growth factor profile and restoration of fertility in repeat breeder cows. *Anim Reprod Sci*. 2006; 95: 54-66.
  64. Katagiri S, Takahashi Y. A progestin-based treatment with a high dose of estradiol benzoate normalizes cyclic changes in endometrial EGF concentrations and restores fertility in repeat breeder cows. *J Reprod Dev*. 2008; 54: 473-479.
  65. Kendall NR, Flint AP, Mann GE. Incidence and treatment of inadequate postovulatory progesterone concentrations in repeat breeder cows. *Vet J*. 2009; 181: 158-162.
  66. Kharche SD, Srivastava SK. Dose dependent effect of GnRH analogue on pregnancy rate of repeat breeder crossbred cows. *Anim Reprod Sci*. 2007; 99: 196-201.
  67. Khoramian B, Farzaneh N, Talebkhan Garoussi M, Mohri M. Comparison of the effects of gonadotropin-releasing hormone, human chorionic

- gonadotropin or progesterone on pregnancy per artificial insemination in repeat-breeder dairy cows. *Res Vet Sci.* 2011; 90: 312-315.
68. Killeen AP, Morris DG, Kenny DA, Mullen MP, Diskin MG, Waters SM. Global gene expression in endometrium of high and low fertility heifers during the mid-luteal phase of the estrous cycle. *BMC Genomics.* 2014; 15: 234.
  69. Kirschner C, Maquelin K, Pina P, Ngo Thi NA, Choo-Smith LP, Sockalingum GD, Sandt C, Ami D, Orsini F, Doglia SM, Allouch P, Mainfait M, Puppels GJ, Naumann D. Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 1763-1770.
  70. Kliem A, Tetens F, Klonisch T, Grealay M, Fischer B. Epidermal growth factor receptor and ligands in elongating bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev.* 1998; 51: 402-412.
  71. Kuhm AE, Suter D, Felleisen R, Rau J. Identification of *Yersinia enterocolitica* at the species and subspecies levels by Fourier transform infrared spectroscopy. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75: 5809-5813.
  72. Kuipers A KW, and Wemmenhove H. . Antibiotic use in dairy herds in the Netherlands from 2005 to 2012. *J Dairy Sci.* 2016; 99: 1632-1648.
  73. Kummerle M, Scherer S, Seiler H. Rapid and reliable identification of food-borne yeasts by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64: 2207-2214.
  74. Lange-Consiglio A, Cazzaniga N, Garlappi R, Spelta C, Pollera C, Perrini C, Cremonesi F. Platelet concentrate in bovine reproduction: effects on in vitro embryo production and after intrauterine administration in repeat breeder cows. *Reprod Biol Endocrinol.* 2015; 13: 65.
  75. Lauritsen J 2000-2008. EpiData Data Entry, Data Management and basic Statistical Analysis System. Odense Denmark, EpiData Association.
  76. Lazzari G, Colleoni S, Duchi R, Galli A, Houghton FD, Galli C. Embryonic genotype and inbreeding affect preimplantation development in cattle. *Reproduction.* 2011; 141: 625-632.

77. LeBlanc S. Assessing the association of the level of milk production with reproductive performance in dairy cattle. *J Reprod Dev.* 2010; 56 Suppl: S1-7.
78. LeBlanc SJ. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: a review. *Vet J.* 2008; 176: 102-114.
79. LeBlanc SJ. Interactions of metabolism, inflammation, and reproductive tract health in the postpartum period in dairy cattle. *Reprod Domest Anim.* 2012; 47 Suppl 5: 18-30.
80. LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2002; 85: 2223-2236.
81. LeBlanc SJ, Lissemore KD, Kelton DF, Duffield TF, Leslie KE. Major advances in disease prevention in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2006; 89: 1267-1279.
82. Ledgard AM, Meier S, Peterson AJ. Evaluation of the uterine environment early in pregnancy establishment to characterise cows with a potentially superior ability to support conceptus survival. *Reprod Fertil Dev.* 2011; 23: 737-747.
83. Lenz M, Drillich M, Heuwieser W. Evaluation of the diagnosis of subclinical endometritis in dairy cattle using ultrasound. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2007; 120: 237-244.
84. Leroy JL, Vanholder T, Van Knegsel AT, Garcia-Ispuerto I, Bols PE. Nutrient prioritization in dairy cows early postpartum: mismatch between metabolism and fertility? *Reprod Domest Anim.* 2008; 43 Suppl 2: 96-103.
85. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>(-Delta Delta C(T))</sup> Method. *Methods.* 2001; 25: 402-408.
86. Lozano Carbajal B, Márquez Orosco MC, Márquez Orosco A, Pérez Vargas JE. La translocación Robertsoniana 1/29 en vacas de la raza Suizo Pardo Americano y su repercusión en la reproducción. *Veterinaria Mexico journal.* 1993; 24: 331-333.

87. Lu S, Peng H, Zhang H, Zhang L, Cao Q, Li R, Zhang Y, Yan L, Duan E, Qiao J. Excessive intrauterine fluid cause aberrant implantation and pregnancy outcome in mice. *PLoS One*. 2013; 8: e78446.
88. Lucy MC. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J Dairy Sci*. 2001; 84: 1277-1293.
89. Lucy MC, Butler ST, Garverick HA. Endocrine and metabolic mechanisms linking postpartum glucose with early embryonic and foetal development in dairy cows. *Animal*. 2014; 8 Suppl 1: 82-90.
90. Madoz LV, Giuliadori MJ, Jaureguiberry M, Plontzke J, Drillich M, de la Sota RL. The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J Dairy Sci*. 2013; 96: 4333-4339.
91. Madoz LV, Giuliadori MJ, Migliorisi AL, Jaureguiberry M, de la Sota RL. Endometrial cytology, biopsy, and bacteriology for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows. *J Dairy Sci*. 2014; 97: 195-201.
92. Madoz LV, Plöntzke J, Albarracin D, Drillich M, De la Sota L. Determinación de los puntos de corte para el diagnóstico de endometritis subclínica en Argentina. *Taurus*. 2012; 54: 29-35.
93. Mamo S, Rizos D, Lonergan P. Transcriptomic changes in the bovine conceptus between the blastocyst stage and initiation of implantation. *Anim Reprod Sci*. 2012; 134: 56-63.
94. Mann GE, Lamming GE. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*. 2001; 121: 175–180.
95. Martino F, Capitaine Funes A. ¿Cuál es el verdadero objetivo reproductivo del sistema de producción de leche? IX Simposio Internacional de Reproducción Animal, 2011, 151-163, Córdoba, Argentina.
96. McGuire K, Manuja A, Russell GC, Springbett A, Craigmile SC, Nichani AK, Malhotra DV, Glass EJ. Quantitative analysis of pro-inflammatory cytokine mRNA expression in *Theileria annulata*-infected cell lines



- derived from resistant and susceptible cattle. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004; 99: 87-98.
97. Meikle A, Sahlin L, Ferraris A, Masironi B, Blanc JE, Rodriguez-Iraozqui M, Rodriguez-Pinon M, Kindahl H, Forsberg M. Endometrial mRNA expression of oestrogen receptor alpha, progesterone receptor and insulin-like growth factor-I (IGF-I) throughout the bovine oestrous cycle. *Anim Reprod Sci.* 2001; 68: 45-56.
  98. Miglior F, Muir BL, Van Doormaal BJ. Selection indices in Holstein cattle of various countries. *J Dairy Sci.* 2005; 88: 1255-1263.
  99. Minten MA, Bilby TR, Bruno RG, Allen CC, Madsen CA, Wang Z, Sawyer JE, Tibary A, Neibergs HL, Geary TW, Bauersachs S, Spencer TE. Effects of fertility on gene expression and function of the bovine endometrium. *PLoS One.* 2013; 8: e69444.
  100. Monge A, Elvira L, Gonzalez JV, Astiz S, Wellenberg GJ. Bovine herpesvirus 4-associated postpartum metritis in a Spanish dairy herd. *Res Vet Sci.* 2006; 80: 120-125.
  101. Moss N, Lean IJ, Reid SW, Hodgson DR. Risk factors for repeat-breeder syndrome in New South Wales dairy cows. *Prev Vet Med.* 2002; 54: 91-103.
  102. Naumann D, Helm D, Labischinski H. Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy. *Nature.* 1991; 351: 81-82.
  103. Okumu LA, Forde N, Fahey AG, Fitzpatrick E, Roche JF, Crowe MA, Lonergan P. The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression and localisation of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. *Reproduction.* 2010; 140: 143-153.
  104. Papageorgiou I, Nicholls PK, Wang F, Lackmann M, Mankanji Y, Salamonsen LA, Robertson DM, Harrison CA. Expression of nodal signalling components in cycling human endometrium and in endometrial cancer. *Reprod Biol Endocrinol.* 2009; 7: 122.
  105. Park CB, Dufort D. Elsevier Trophoblast Research Award lecture: The multifaceted role of Nodal signaling during mammalian reproduction. *Placenta.* 2011; 25: S125eS129.

106. Park CB, Dufort D. NODAL signaling components regulate essential events in the establishment of pregnancy. *Reproduction*. 2013; 145: R55-64.
107. Pascottini OB, Dini P, Hostens M, Ducatelle R, Opsomer G. A novel cytologic sampling technique to diagnose subclinical endometritis and comparison of staining methods for endometrial cytology samples in dairy cows. *Theriogenology*. 2015; 84: 1438-1446.
108. Perez-Marin CC, Espana F. Oestrus expression and ovarian function in repeat breeder cows, monitored by ultrasonography and progesterone assay. *Reprod Domest Anim*. 2007; 42: 449-456.
109. Pérez-Sala Gozalo D. Modificaciones postraduccionales de proteínas: mecanismos clave en el control de su actividad SEBBM DIVULGACIÓN. 2012.
110. Pothmann H, Prunner I, Wagener K, Jaureguiberry M, de la Sota RL, Erber R, Aurich C, Ehling-Schulz M, Drillich M. The prevalence of subclinical endometritis and intrauterine infections in repeat breeder cows. *Theriogenology*. 2015; 83: 1249-1253.
111. Prunner I, Pothmann H, Wagener K, Giuliadori M, Huber J, Ehling-Schulz M, Drillich M. Dynamics of bacteriologic and cytologic changes in the uterus of postpartum dairy cows. *Theriogenology*. 2014a; 82: 1316-1322.
112. Prunner I, Wagener K, Pothmann H, Ehling-Schulz M, Drillich M. Risk factors for uterine diseases on small- and medium-sized dairy farms determined by clinical, bacteriological, and cytological examinations. *Theriogenology*. 2014b; 82: 857-865.
113. Quintana S. Origen Celular, Desarrollo y Evaluación de Tumores de Células Somáticas Testiculares. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. 2013.
114. Ribeiro ES, Lima FS, Greco LF, Bisinotto RS, Monteiro AP, Favoreto M, Ayres H, Marsola RS, Martinez N, Thatcher WW, Santos JE. Prevalence of periparturient diseases and effects on fertility of seasonally calving grazing dairy cows supplemented with concentrates. *J Dairy Sci*. 2013; 96: 5682-5697.

115. Robinson RS, Mann GE, Lamming GE, Wathes DC. Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction*. 2001; 122: 965-979.
116. Rodrigues CA, Teixeira AA, Ferreira RM, Ayres H, Mancilha RF, Souza AH, Baruselli PS. Effect of fixed-time embryo transfer on reproductive efficiency in high-producing repeat-breeder Holstein cows. *Anim Reprod Sci*. 2010; 118: 110-117.
117. Sagsoz H, Ketani MA, Saruhan BG. Expression of the erbB/HER receptor family in the bovine uterus during the sexual cycle and the relation of this family to serum sex steroids. *Biotech Histochem*. 2012; 87: 105-116.
118. Sagsoz H, Liman N, Saruhan BG, Kucukaslan I. The expression of epidermal growth factor receptors and their ligands (epidermal growth factor, neuregulin, amphiregulin) in the bitch uterus during the estrus cycle. *Anim Reprod Sci*. 2014; 147: 161-179.
119. Salasel B, Mokhtari A, Taktaz T. Prevalence, risk factors for and impact of subclinical endometritis in repeat breeder dairy cows. *Theriogenology*. 2010; 74: 1271-1278.
120. Samelis J, Bleicher A, Delbes-Paus C, Kakouri A, Neuhaus K, Montel MC. FTIR-based polyphasic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Greek Graviera cheese. *Food Microbiol*. 2011; 28: 76-83.
121. Santos C, Fraga ME, Kozakiewicz Z, Lima N. Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Res Microbiol*. 2010a; 161: 168-175.
122. Santos TM, Caixeta LS, Machado VS, Rauf AK, Gilbert RO, Bicalho RC. Antimicrobial resistance and presence of virulence factor genes in *Arcanobacterium pyogenes* isolated from the uterus of postpartum dairy cows. *Vet Microbiol*. 2010b; 145: 84-89.
123. Santos TM, Gilbert RO, Caixeta LS, Machado VS, Teixeira LM, Bicalho RC. Susceptibility of *Escherichia coli* isolated from uteri of postpartum dairy cows to antibiotic and environmental bacteriophages. Part II: In vitro

- antimicrobial activity evaluation of a bacteriophage cocktail and several antibiotics. *J Dairy Sci.* 2010c; 93: 105-114.
124. SAS. SAS and STAT Users Guide, Release 9.1. SAS Institute Inc., Cary, NC. Vol 2003.
  125. Schabauer L, Wenning M, Huber I, Ehling-Schulz M. Novel physico-chemical diagnostic tools for high throughput identification of bovine mastitis associated gram-positive, catalase-negative cocci. *BMC Vet Res.* 2014; 10: 156.
  126. Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth HJ. Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol Reprod.* 2009; 81: 1025-1032.
  127. Sheldon IM, Noakes DE, Rycroft AN, Dobson H. Effect of postpartum manual examination of the vagina on uterine bacterial contamination in cows. *Vet Rec.* 2002; 151: 531-534.
  128. Shelton K, Gayerie De Abreu MF, Hunter MG, Parkinson TJ, Lamming GE. Luteal inadequacy during the early luteal phase of subfertile cows. *J Reprod Fertil.* 1990; 90: 1-10.
  129. Shen MM. Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development.* 2007; 134: 1023-1034.
  130. Shimizu T, Krebs S, Bauersachs S, Blum H, Wolf E, Miyamoto A. Actions and interactions of progesterone and estrogen on transcriptome profiles of the bovine endometrium. *Physiol Genomics.* 2010; 42A: 290-300.
  131. Silvestrini MP, Corva SG, Lizarribar I, De la Sota RL. Factores de riesgo que afectan la eficiencia reproductiva en rodeos lecheros de la pampa húmeda. 9º Simposio Internacional de Reproducción Animal, 2011a, 389, Córdoba, Argentina.
  132. Silvestrini MP, Corva SG, Lizarribar I, De la Sota RL. Predictores de la duración del intervalo parto concepción en rodeos lecheros de la pampa húmeda. 9º Simposio Internacional de Reproducción Animal, 2011b, 388, Córdoba, Argentina.

133. Singh M, Chaudhry P, Asselin E. Bridging endometrial receptivity and implantation: network of hormones, cytokines, and growth factors. *J Endocrinol.* 2011; 210: 5-14.
134. Son DS, Choe CY, Cho SR, Choi SH, Kim HJ, Hur TY, Jung YG, Kang HG, Kim IH. A CIDR-based timed embryo transfer protocol increases the pregnancy rate of lactating repeat breeder dairy cows. *J Reprod Dev.* 2007; 53: 1313-1318.
135. Souza AH, Narciso CD, Batista EOS, Carvalho PD, Wiltbank MC. Effect of uterine environment on embryo production and fertility in cows. *Anim Reprod.* 2014; 11: 159-167.
136. Spencer TE, Forde N, Lonergan P. The role of progesterone and conceptus-derived factors in uterine biology during early pregnancy in ruminants. *J Dairy Sci.* 2016; 99: 5941-5950.
137. Spencer TE, Sandra O, Wolf E. Genes involved in conceptus-endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. *Reproduction.* 2008; 135: 165-179.
138. Sugawara K, Kizaki K, Herath CB, Hasegawa Y, Hashizume K. Transforming growth factor beta family expression at the bovine fetomaternal interface. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010; 8: 120.
139. Sugimura S, Ritter LJ, Sutton-McDowall ML, Mottershead DG, Thompson JG, Gilchrist RB. Amphiregulin co-operates with bone morphogenetic protein 15 to increase bovine oocyte developmental competence: effects on gap junction-mediated metabolite supply. *Mol Hum Reprod.* 2014; 20: 499-513.
140. Takatsu K, Kuse M, Yoshioka S, Acosta TJ. Expression of epidermal growth factor (EGF) and its receptor in bovine endometrium throughout the luteal phase: effects of EGF on prostaglandin production in endometrial cells. *Animal Reproduction.* 2015; 12: 328-335.
141. Tamada H, Tominaga M, Kida K, Kawate N, Inaba T, Matsuyama S, Sawada T. Detection of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor mRNA and immunohistochemical localization of

- the corresponding proteins in the canine uterus during the estrous cycle. *Histol Histopathol.* 2005; 20: 817-824.
142. Trevisi E, Zecconi A, Cogrossi S, Razzuoli E, Grossi P, Amadori M. Strategies for reduced antibiotic usage in dairy cattle farms. *Res Vet Sci.* 2014; 96: 229-233.
143. Veerkamp RF, Koenen EP, De Jong G. Genetic correlations among body condition score, yield, and fertility in first-parity cows estimated by random regression models. *J Dairy Sci.* 2001; 84: 2327-2335.
144. Wagener K, Grunert T, Prunner I, Ehling-Schulz M, Drillich M. Dynamics of uterine infections with *Escherichia coli*, *Streptococcus uberis* and *Trueperella pyogenes* in post-partum dairy cows and their association with clinical endometritis. *Vet J.* 2014; 202: 527-532.
145. Wagener K, Pothmann H, Prunner I, Peter S, Erber R, Aurich C, Drillich M, Gabler C. Endometrial mRNA expression of selected pro-inflammatory factors and mucins in repeat breeder cows with and without subclinical endometritis. *Theriogenology.* 2017; 90: 237-244.
146. Wagener K, Prunner I, Pothmann H, Drillich M, Ehling-Schulz M. Diversity and health status specific fluctuations of intrauterine microbial communities in postpartum dairy cows. *Vet Microbiol.* 2015; 175: 286-293.
147. Walsh SW, Williams EJ, Evans AC. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Anim Reprod Sci.* 2011; 123: 127-138.
148. Webster AJ. Environmental stress and the physiology, performance and health of ruminants. *J Anim Sci.* 1983; 57: 1584-1593.
149. Wenning M, Scherer S. Identification of microorganisms by FTIR spectroscopy: perspectives and limitations of the method. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013; 97: 7111-7120.
150. Wenning M, Scherer S, Naumann D. Infrared spectroscopy in the identification of microorganisms. *Handbook of Vibrational Spectroscopy.* 2008.
151. Westermann S, Drillich M, Kaufmann TB, Madoz LV, Heuwieser W. A clinical approach to determine false positive findings of clinical

- endometritis by vaginoscopy by the use of uterine bacteriology and cytology in dairy cows. *Theriogenology*. 2010; 74: 1248-1255.
152. Wiltbank M, Lopez H, Sartori R, Sangsritavong S, Gumen A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology*. 2006; 65: 17-29.
153. Wiltbank M, Souza AH, Carvalho PD, Bender RB, Nascimento AB. Cómo mejorar la fertilidad a la IATF mediante la manipulación de las concentraciones de progesterona circulante en el ganado lechero. X Simposio Internacional de Reproducción Animal, 2013, 77-90, Córdoba, Argentina.
154. Williams EJ, Fischer DP, Pfeiffer DU, England GC, Noakes DE, Dobson H, Sheldon IM. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology*. 2005; 63: 102-117.
155. Winn WC aKE. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Vol. Lippincott Williams & Wilkins, 2006.
156. Yusuf M, Nakao T, Ranasinghe RB, Gautam G, Long ST, Yoshida C, Koike K, Hayashi A. Reproductive performance of repeat breeders in dairy herds. *Theriogenology*. 2010; 73: 1220-1229.
157. Zhang Z, Krause M, Davis DL. Epidermal growth factor receptors in porcine endometrium: binding characteristics and the regulation of prostaglandin E and F2 alpha production. *Biol Reprod*. 1992; 46: 932-936.

## APÉNDICE I

### **Protocolo de extracción de ARN a partir de células endometriales conservadas en RNAlater**

1. Desfreezar los tubos eppendorf correspondientes a cada muestra y colocar 500  $\mu$ l de PBS helado libre de RNasas (Invitrogen Corp.) en cada uno.
2. Centrifugar durante 5 min a 8000 rpm para formar un pellet de células y eliminar el sobrenadante.
3. Una vez formado el pellet, agregar a cada eppendorf 500  $\mu$ l de Trizol (TriReagent, Molecular Research Center Inc.) y resuspender con pipeta.
4. Incubar a T° ambiente por 5 min.
5. Añadir 100  $\mu$ l de cloroformo frío, tapar cada eppendorf y agitar vigorosamente durante 20 seg e incubar a T° ambiente por 3 min.
6. Centrifugar durante 15 min a 12000 rpm a 4°C. Esto hará que cada muestra quede separada en tres fases (fase superior: contiene ARN, fase intermedia: contiene ADN y proteínas, fase inferior: contiene principalmente proteínas).
7. Transferir la fase superior a un eppendorf de 1,5 ml libre de RNasas.
8. Agregar 500  $\mu$ l de isopropanol y 2  $\mu$ l de glicógeno 5 mg/ml.
9. Mezclar con vortex 10 seg, e incubar a T° ambiente por 10 min.
10. Incubar toda la noche a -20°C.
11. Centrifugar 15 min a 12000 rpm a 4°C para precipitar el ARN.
12. Eliminar el sobrenadante y lavar el pellet con 1 ml de etanol 75% frío, mezclar con vortex.
13. Centrifugar 5 min a 7500 rpm a 4°C. Descartar el sobrenadante.



14. Dejar secar por 5 min.
15. Resuspender el ARN en 50  $\mu$ l de agua libre de RNasas, mezclar vigorosamente e incubar a 55°C por 5 min.
16. Almacenar a 4°C para uso inmediato o a -80°C para almacenamiento a largo plazo.

**Protocolo para la digestión con DNasa**

1. A 1,5  $\mu\text{g}$  de ARN extraído, agregar 1  $\mu\text{l}$  de DNasa buffer 10X y 0,5  $\mu\text{l}$  de inhibidor de ribonucleasas (RNaseOUT, Invitrogen Corp.).
2. Agregar 1  $\mu\text{l}$  de DNasa libre de RNasas (DNase I Amplification Grade, Invitrogen Corp.). Volumen final: 10  $\mu\text{l}$ .
3. Incubar a T° ambiente por 15 min.
4. Agregar 1  $\mu\text{l}$  de EDTA 25 mM
5. Incubar a 65°C durante 10 min para inactivar la DNasa.

**Protocolo de retrotranscripción**

1. Utilizar 1  $\mu\text{g}$  de ARN digerido con DNasa.
2. Agregar 1,5  $\mu\text{l}$  de cebadores random hexamers (160 ng/  $\mu\text{l}$ ).
3. Incubación a 65°C por 10 min.
4. Dejar la mezcla a T° ambiente por 5 min.
5. Agregar 4  $\mu\text{l}$  de First strand Buffer 5X, 2  $\mu\text{l}$  0,1 M DTT, 1  $\mu\text{l}$  de dNTPs 10 mM y 1  $\mu\text{l}$  de inhibidor de RNasa (RNaseOUT, Invitrogen Corp.).
6. Calentar a 37°C por 2 min.
7. Agregar 1  $\mu\text{l}$  de retrotranscriptasa (MMLV, Invitrogen). Volumen final de reacción: 20  $\mu\text{l}$ .
8. Incubar a 25°C por 10 min.
9. Incubar a 37°C por 50 min.
10. Incubar a 70°C por 15 min.
11. Almacenar a 4°C para uso inmediato o a -20°C para almacenamiento prolongado.

### Protocolo de PCR en tiempo real

1. Agregar a un tubo de PCR 10  $\mu$ l de premezcla de PCR en tiempo real con intercalante Evagreen (Mezcla Real, Biodynamics SRL), 1  $\mu$ l de primer Forward y 1  $\mu$ l de primer reverse, 1  $\mu$ l de templado y 7  $\mu$ l de agua. Volumen final: 20  $\mu$ l. Esto se realiza para cada muestra, por gen, por duplicado. Para evitar errores de pipeteo se realiza una premezcla con todos los componentes excepto el ADNc y se reparte en los tubos de PCR.
2. Llevar al termociclador utilizando el protocolo correspondiente (Tabla 1 y 2).

Tabla 1. Tiempo, temperatura y número de ciclos correspondientes al protocolo utilizado en la presente tesis doctoral.

Tiempo	Temperatura (°C)	N° Ciclos
3 min	95	
20 seg	95	
20 seg	Ver tabla 2	40
30 seg	72	

Tabla 2. Temperatura de annealing correspondiente a cada par de primers.

Primer	T° de annealing (°C)
PR	50
ER	54
EGFR	57
FNod	56
PTGS2	50
GAPDH	60