



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CARACTERIZACIÓN DEL TRANSCRIPTOMA ENDOMETRIAL DE LA VACA REPETIDORA HOLSTEIN DURANTE LAS FASES FOLICULAR Y LÚTEA DEL CICLO ESTRAL

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA
JOSÉ FRANCISCO MARTÍNEZ ALBARRÁN

TUTOR PRINCIPAL
MARTÍN GUILLERMO MAQUIVAR LINFOOT
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, MAYO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**



**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y
ZOOTECNIA**

**CARACTERIZACIÓN DEL TRANSCRIPTOMA ENDOMETRIAL DE
LA VACA REPETIDORA HOLSTEIN DURANTE LAS FASES
FOLICULAR Y LÚTEA DEL CICLO ESTRAL**

T E S I S

PARA EL OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

JOSÉ FRANCISCO MARTÍNEZ ALBARRÁN

ASESOR:

MARTIN GUILLERMO MAQUIVAR LINFOOT

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Mayo 2023.

DEDICATORIA

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de recibir once años de invaluable formación académica, profesional y personal.

A mis padres José de Jesús y Dulce María por apoyarme de manera incondicional.

A mis hermanos José de Jesús, Mariana y Arely por ser mis modelos a seguir.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor el doctor Martin Maquivar por ser un gran amigo, darme la oportunidad de expandir mis fronteras y apoyarme con el financiamiento de este proyecto.

Al Department of Animal Sciences de Washinton State University, ya que esta investigación es producto del apoyo brindado durante mi estancia.

Al doctor Jiang Zhihua, a Jennifer Mitchell y a Hongyang Wang por apoyarme con el procesamiento de muestras, la preparación de las librerías y los análisis de secuenciación.

Al doctor Carlos Galina por las invaluable competencias adquiridas en nuestra trayectoria trabajando juntos y el apoyo en la edición de la presente investigación.

AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutorial conformado por la doctora Hilda Morayma y el doctor Alejandro Contreras por estar al pendiente de mí y del desarrollo de este proyecto.

A mi profesor el doctor Mario Pérez por compartir conmigo su conocimiento, el amor por la investigación y la divulgación de la ciencia.

A la doctora Ivette Rubio y el doctor Manuel Corro por ser un ejemplo de trabajo duro, además de darme su cariño, apoyo y conocimientos.

A la doctora Elke Von Son por el cariño y ser un gran modelo a seguir.

A Pablo Ortiz por ser un gran amigo y seguirme acompañando todos estos años.

RESUMEN

JOSÉ FRANCISCO MARTÍNEZ ALBARRÁN. Caracterización del transcriptoma endometrial de la vaca repetidora holstein durante las fases folicular y lútea del ciclo estral. Bajo la asesoría del PhD Martín Guillermo Maquivar Linfoot.

El objetivo de este estudio fue caracterizar el transcriptoma de la vaca repetidora durante la fase folicular y lútea del ciclo estral. Se utilizaron un total de 13 vacas lecheras Holstein multíparas en lactancia, evaluadas clínicamente sanas. Se clasificaron en dos grupos: 1) vacas que se encontraban dentro de los primeros 100 días postparto confirmadas preñadas al finalizar el estudio a una o dos inseminaciones (Testigo, VT; n= 6) con edad de 2.7 ± 0.8 ; y 2) vacas repetidoras con más de 350 días en leche que anteriormente no lograron concebir en más de 3 inseminaciones (Vacas repetidoras, VR; n = 7) con edad de 5.7 ± 1.5 , que al comienzo del estudio contaban con 18 ± 2 días y 450 ± 88 días posparto, respectivamente. Para tal efecto, se evaluaron el tamaño del folículo dominante y del *Cuerpo lúteo*, la presencia de signos de estro y de un Cuerpo lúteo, después de la administración de PGF2 α . Asimismo, la actividad motriz, rumia y alimentación. Se obtuvieron muestras de tejido endometrial para analizar y caracterizar la expresión genética de dicho tejido y caracterizar los sitios de poliadenilación alternativa (APA) en las vacas de ambos grupos. La respuesta a un PGF2 α , tamaño del folículo dominante y del *Cuerpo lúteo*, la presencia de signos de estro, no se observaron diferencias estadísticas significativas ($P>0.05$) entre ambos grupos. Los registros de ausencia de actividad por hora al día mostraron diferencias significativas para los días 0 (definido como el día de aplicación de PGF2 α) (VT= 16.19 minutos, VR= 21.03 minutos; $P= 0.048$), 1 (VT= 16.82 minutos, VR= 21.46 minutos; $P= 0.048$), 2 (VT= 14.80 minutos, VR= 20.35 minutos; $P= 0.007$) y 10 (VT= 15.55 minutos, VR= 20.98 minutos; $P= 0.01$) entre el grupo VT y VR. Los registros de rumia por hora al día no mostraron diferencias significativas entre el grupo VT y VR ($P>0.05$). Los registros de tiempo en que los animales consumían alimento mostraron diferencias

significativas para los días 2 (VT= 9.264 minutos, VR= 5.369 minutos; P= 0.013), 4 (VT= 10.01 minutos, VR= 5.815 minutos; P= 0.005), 5 (VT= 10.28 minutos, VR= 6.149 minutos; P= 0.006), 6 (VT= 9.548 minutos, VR= 5 minutos; P= 0.002), 7 (VT= 10.06 minutos, VR= 4.180 minutos; P<0.001), 8 (VT= 10.05 minutos, VR= 5.283 minutos; P<0.001) y 10 (VT= 9.084 minutos, VR= 5.214 minutos; P= 0.014) entre el grupo VT y VR. El tiempo que pasaron activas (medido por el número de pasos) presentó diferencias estadísticamente significativas en los días 0 (VT= 5.218 minutos, VR= 7.497 minutos; P=0.018), 3 (VT= 5.090 minutos, VR= 8.401 minutos; P<0.001), 5 (VT= 4.465 minutos, VR= 7.024 minutos; P=0.002), 6 (VT= 5.035 minutos, VR= 8.327 minutos; P<0.001), 7(VT= 5.076 minutos, VR= 8.928 minutos; P<0.001), 8(VT= 5.014 minutos, VR= 8.193 minutos; P<0.001) y 9(VT= 4.924 minutos, VR= 8.065 minutos; P<0.001) entre el grupo VT y VR. Los registros de alta actividad muestran una diferencia estadísticamente significativa al día 3 (VT= 8.028 minutos, VR= 15.09 minutos; P<0.001) entre el grupo VT y VR. Un total de 6 librerías (VT, 1 para la fase folicular y 1 para la fase lútea; VR, 3 en la fase folicular y 1 en la fase lútea), produjo 141,671 sitios APA que se expresaron en células endometriales cubriendo al menos 6 lecturas. De los sitios APA únicamente 94,562 fueron asignados a genes anotados en el genoma bovino. El biotipo del gen tuvo efectos significativos ($R^2= 0.115$, $P=<0.0001$) en el uso de sitios APA. El 83.86% (14,563/17,365) resultaron genes codificantes de proteínas, 73.06% (2,384/3,263) en ARNinc, 36.91% (547/1,482) en pseudogenes, 29.41% (10/34) en micro ARN, 71.87% (23/32) en ARN de transferencia utilizaron más de un sitio de poliadenilación alternativa. De acuerdo con el análisis de componentes principales (PCA), las VT no difieren de las VR en la fase folicular. Sin embargo, las vacas repetidoras se desvían de la tendencia de progresión de las vacas normales a la fase lútea en cuanto a la expresión de genes. Se puede concluir que no existieron disparidades entre las vacas testigo y las repetidoras en cuanto a sus estructuras ováricas, presencia de signos de estro y, porcentualmente, el número de animales que formaron un *Cuerpo lúteo* después de la aplicación de PGF2 α . Se encontraron diferencias en la actividad motriz, de rumia y de alimentación. Por último, el análisis

del transcriptoma demuestra que existen similitudes en la composición de los genes expresados en el endometrio durante la fase folicular de las vacas de ambos grupos. Sin embargo, la composición cambia durante la fase lútea entre las vacas testigo y las vacas repetidoras, demostrando que la expresión de genes en estas últimas, presenta una mayor variación en comparación a sus pares de mayor fertilidad que podrían modificar la fisiología del endometrio previo a la implantación, por lo tanto, se requiere mayor investigación sobre los desencadenantes de estas variaciones y su efecto en la receptividad endometrial.

ABSTRACT

JOSÉ FRANCISCO MARTÍNEZ ALBARRÁN. Characterization of the endometrial transcriptome of the Holstein repeat breeder cow during the follicular and luteal phases of the estrous cycle. Advised by PhD Martín Guillermo Maquivar Linfoot.

The objective of this study was to characterize the transcriptome of repeat breeder cows during the follicular and luteal phases of the estrous cycle. A total of 13 multiparous Holstein dairy cows in lactation, clinically healthy, were used. They were classified into two groups: 1) cows within the first 100 days postpartum, confirmed pregnant at the end of the study after one or two inseminations (Control, CT; n=6) with an average age of 2.7 ± 0.8 years; and 2) repeat breeder cows with over 350 days in milk that previously failed to conceive after more than 3 inseminations (Repeat Breeders, RB; n=7) with an average age of 5.7 ± 1.5 years, and at the beginning of the study, they were at 18 ± 2 days and 450 ± 88 days postpartum, respectively. The size of the dominant follicle and corpus luteum, the presence of estrus signs and corpus luteum, after the administration of $\text{PGF2}\alpha$, as well as the activity, rumination, and feeding behavior were evaluated. Endometrial tissue samples were collected to analyze and characterize the gene expression in the tissue and identify alternative polyadenylation sites (APAs) in cows from both groups. The response to $\text{PGF2}\alpha$, size of the dominant follicle and corpus luteum, and presence of estrus signs did not show statistically significant differences ($P>0.05$) between the two groups. The records of inactivity per hour per day showed significant differences for days 0 (defined as the day of $\text{PGF2}\alpha$ application) (CT=16.19 minutes, RB=21.03 minutes; $P=0.048$), 1 (CT=16.82 minutes, RB=21.46 minutes; $P=0.048$), 2 (CT=14.80 minutes, RB=20.35 minutes; $P=0.007$), and 10 (CT=15.55 minutes, RB=20.98 minutes; $P=0.01$) between the CT and RB groups. The records of rumination per hour per day did not show significant differences between the CT and RB groups ($P>0.05$). The records of feeding time showed significant differences for days 2 (CT=9.264 minutes, RB=5.369 minutes; $P=0.013$),

4 (CT=10.01 minutes, RB=5.815 minutes; $P=0.005$), 5 (CT=10.28 minutes, RB=6.149 minutes; $P=0.006$), 6 (CT=9.548 minutes, RB=5 minutes; $P=0.002$), 7 (CT=10.06 minutes, RB=4.180 minutes; $P<0.001$), 8 (CT=10.05 minutes, RB=5.283 minutes; $P<0.001$), and 10 (CT=9.084 minutes, RB=5.214 minutes; $P=0.014$) between the CT and RB groups. The time spent active (measured by the number of steps) showed statistically significant differences on days 0 (CT=5.218 minutes, RB=7.497 minutes; $P=0.018$), 3 (CT=5.090 minutes, RB=8.401 minutes; $P<0.001$), 5 (CT=4.465 minutes, RB=7.024 minutes; $P=0.002$), 6 (CT=5.035 minutes, RB=8.327 minutes; $P<0.001$), 7 (CT=5.076 minutes, RB=8.928 minutes; $P<0.001$), 8 (CT=5.014 minutes, RB=8.193 minutes; $P<0.001$), and 9 (CT=4.924 minutes, RB=8.065 minutes; $P<0.001$) between the CT and RB groups. The records of high activity showed a statistically significant difference on day 3 (CT=8.028 minutes, RB=15.09 minutes; $P<0.001$) between the CT and RB groups. A total of 6 libraries (CT: 1 for the follicular phase and 1 for the luteal phase; RB: 3 for the follicular phase and 1 for the luteal phase) generated 141,671 APA sites expressed in endometrial cells, covering at least 6 reads. Of the APA sites, only 94,562 were assigned to annotated genes in the bovine genome. The gene biotype had a significant effect ($R^2=0.115$, $P=<0.0001$) on the usage of APA sites. Of the total APA sites, 83.86% (14,563/17,365) were protein-coding genes, 73.06% (2,384/3,263) were lncRNAs, 36.91% (547/1,482) were pseudogenes, 29.41% (10/34) were microRNAs, and 71.87% (23/32) were transfer RNAs that used more than one alternative polyadenylation site. According to the principal component analysis (PCA), CT cows did not differ from RB cows during the follicular phase. However, the repeat breeder cows deviated from the trend of normal cows in progressing to the luteal phase in terms of gene expression. It can be concluded that there were no disparities between the control and repeat breeder cows regarding their ovarian structures, presence of estrus signs, and the percentage of cows that formed a corpus luteum after the administration of PGF2 α . Differences were found in activity, rumination, and feeding behavior. Lastly, the transcriptome analysis demonstrated similarities in the composition of expressed genes in the endometrium during the follicular phase.

However, the composition changed during the luteal phase between control and repeat breeder cows, indicating that gene expression in repeat breeder cows exhibited greater variation compared to their counterparts with higher fertility, which could potentially modify the endometrial physiology prior to implantation. Therefore, further research is required to investigate the triggers of these variations and their effect on endometrial receptivity.

ÍNDICE

Introducción.....	1
I. Revisión de Literatura.....	5
1. Contexto de la producción lechera y su relación con la vaca repetidora.....	5
2. La dinámica endometrial durante el ciclo estral y la implantación.....	12
2.1. Anatomía e histología uterina.....	13
2.2. Cambios en el endometrio durante ciclo estral.....	15
2.2.1 El endometrio durante la fase folicular.....	16
2.2.2 El endometrio durante la fase lútea.....	17
2.3. Cambios en el endometrio durante la implantación.....	20
3. La dinámica endometrial en la vaca repetidora.....	25
3.1. Microambiente endometrial en la vaca repetidora.....	26
II. Justificación.....	29
III. Hipótesis.....	30
IV. Objetivos.....	30
4.1 Objetivos generales.....	30
4.2 Objetivos específicos.....	30
V. Material y métodos.....	31
5.1. Ubicación.....	31
5.2. Animales.....	31
5.3. Manejo Reproductivo.....	31
5.4. Determinación de la fase del ciclo estral.....	32
5.5. Determinación de la actividad.....	33
5.6. Evaluaciones reproductivas.....	33
5.7. Perfil del transcriptoma endometrial.....	34
5.7.1. Obtención del ARN.....	34
5.7.2. Extracción del ARN.....	35
5.7.3. Tratamiento del ARN.....	36
5.7.4. Preparación de la biblioteca.....	37

5.7.5. Control de calidad, mapeo y procesamiento.....	38
5.7.6. Caracterización de los sitios APA.....	39
5.7.7. Análisis de secuencias.....	39
5.8. Análisis estadístico.....	40
VI. Resultados.....	41
6.1. Estructuras ováricas y presencia de signos de estro.....	41
6.2. Actividad motriz, rumia y alimentación.....	42
6.3. Caracterización de los sitios APA en vacas de ambos grupos.....	50
6.4. Sitios APA expresados diferencialmente entre las vacas testigo y las vacas repetidoras.....	52
6.5. Análisis de ontología génica usando los genes expresados diferencialmente entre las vacas testigo y las vacas repetidoras.....	55
VII. Discusión.....	62
VIII. Conclusiones generales.....	70
Referencias.....	71

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema de actividades para las vacas testigo y las vacas repetidoras.
- Figura 2. Comparación de las estructuras ováricas entre grupos antes y después de la aplicación de un agente luteolítico (Lutalyse – PGF2 α).
- Figura 3. Comparación entre vacas normales y repetidoras considerando la media e intervalo de confianza 95% de minutos sin registro de actividad/hora por día después de la aplicación de PGF2A (día 0).
- Figura 4. Comparación entre vacas normales y repetidoras considerando la media e intervalo de confianza 95% de minutos de rumia/hora por día después de la aplicación de PGF2A (día 0).
- Figura 5. Comparación entre vacas normales y repetidoras considerando la media e intervalo de confianza 95% de minutos de alimentación/hora por día después de la aplicación de PGF2A (día 0).
- Figura 6. Comparación entre vacas normales y repetidoras considerando la media e intervalo de confianza 95% de minutos de actividad/hora por día después de la aplicación de PGF2A (día 0).
- Figura 7. Comparación entre vacas normales y repetidoras considerando la media e intervalo de confianza 95% de minutos de alta actividad/hora por día después de la aplicación de PGF2A (día 0).
- Figura 8. Caracterización de sitios APA en el endometrio de vacas normales y repetidoras organizadas por biotipo.
- Figura 9. Distancias entre el transcriptoma de vacas testigo (VT) contra vacas repetidoras (VR) en la fase folicular (FF) y la fase lútea (FL) del ciclo estral.
- Figura 10. Sitios APA expresados diferencialmente en las células endometriales de vacas repetidoras al compararlos con los de las vacas testigo.

Figura 11. Principales términos enriquecidos en la ontología para los genes expresados diferencialmente en la fase folicular entre vacas testigo y vacas repetidoras.

Figura 12. Principales términos enriquecidos en la ontología para los genes expresados diferencialmente en la fase lútea entre vacas testigo y vacas repetidoras.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Los 10 principales genes diferencialmente expresados en la fase folicular entre vacas testigo y vacas repetidoras.

Cuadro 2. Los 10 principales genes diferencialmente expresados en la fase lútea entre vacas testigo y vacas repetidoras.

Cuadro 3. Principales términos enriquecidos para los genes expresados diferencialmente en procesos biológicos (BP), componentes celulares (CC), y función molecular (MF) durante la fase folicular entre vacas testigo y vacas repetidoras.

Cuadro 4. Principales términos enriquecidos para los genes expresados diferencialmente en procesos biológicos (BP), componentes celulares (CC), y función molecular (MF) en la fase lútea entre vacas testigo y vacas repetidoras.

Caracterización del transcriptoma endometrial de la vaca repetidora holstein durante las fases folicular y lútea del ciclo estral

I. Introducción

La eficiencia reproductiva es fundamental para la sustentabilidad de la empresa dedicada a la producción lechera (Stelwagen *et al.*, 2013). La vaca repetidora se define como un animal con ciclos estrales regulares de un rango entre 17 a 25 días y tres o más inseminaciones/servicios sin lograr el establecimiento de una gestación (Gustafsson y Emanuelson, 2002). El síndrome de la vaca repetidora conduce a una baja eficiencia reproductiva y se considera un importante trastorno reproductivo (Yusuf *et al.*, 2010). Las causas de que una vaca retorne a celo después de un servicio y experimente infertilidad son multifactoriales, por ejemplo, la detección inadecuada del estro (Madureira *et al.*, 2015), baja calidad del semen y/o técnica de inseminación (Walsh *et al.*, 2011), anovulación debido a una función endocrina anormal (Burnett *et al.*, 2017), ovocitos defectuosos o de baja calidad (Puglisi *et al.*, 2013; Heidari *et al.*, 2019), malformaciones del tracto reproductivo (Rizos *et al.*, 2010), pérdida embrionaria (Ealy y Seekford, 2019) e infecciones uterinas y/o cervicovaginales (Gilbert, 2019).

Lo que parece caracterizar a la vaca repetidora, es la ausencia de anomalías morfológicas y endócrinas detectables que puedan indicar o provocar la infertilidad observada en estos animales (Båge *et al.*, 2002). Se sugiere que la incidencia de vacas repetidoras, en las explotaciones lácteas de Estados Unidos, es de hasta el 30% (Ferguson y Skidmore, 2013). La infertilidad se ha definido como la incapacidad

de lograr una gestación dentro de un período estándar, que en hatos lecheros suele ser inferior a 200 días en leche para mantener un intervalo entre partos aproximado o menor a los 16 meses. Asimismo, se ha definido como el animal que sufre pérdida embrionaria o aborto durante cualquier etapa de la gestación y se considera una de las principales razones para desechar una vaca de las lecherías (Fetrow *et al.*, 2006, Ahlman *et al.*, 2011).

El establecimiento y mantenimiento de la gestación dependen, entre otras cosas, de la función y el microambiente del útero durante la fase lútea, sin embargo, el efecto de la fase folicular en el útero es esencial para el desarrollo del endometrio (Billhaq *et al.*, 2020). La señalización hormonal es esencial para preparar la ovulación, fertilización y la implantación del embrión (Hunter *et al.*, 2004). El recambio del endometrio uterino se produce bajo la influencia de diferentes hormonas, sin embargo, los estrógenos y la progesterona son de las hormonas que más influyen sobre el proliferación y funcionamiento del endometrio, lo que es crucial para preparar la implantación y el desarrollo del embrión (Robinson *et al.*, 2002). El tejido uterino experimenta ciclos repetidos de proliferación y degeneración celular en respuesta a las señales de hormonas esteroideas durante la vida reproductiva normal de los mamíferos (Motta *et al.*, 2020). Además, los principales procesos biológicos implicados en la remodelación del endometrio uterino como son la apoptosis, la remodelación de la matriz extracelular y la angiogénesis (Arai *et al.*, 2013).

Los recientes avances en las herramientas de secuenciación genética han hecho posible evaluar el transcriptoma a nivel de un grupo de células o de un tejido en

específico, ya que permite la recopilación de información sobre la expresión diferencial de los genes al estar expuestos a diferentes estímulos o ambientes (Stotts *et al.*, 2022). En la actualidad, diversos estudios han propuesto el enfoque del análisis del transcriptoma endometrial para determinar el rol que ejerce la correcta expresión de los diferentes genes en el desempeño reproductivo (Forde y Lonergan, 2012).

En la vaca repetidora, se han reportado variaciones en la expresión genética endometrial, al compararse con animales de fertilidad normal en muestras tomadas previo a la implantación (Jaureguiberry *et al.*, 2020), así como durante la fase lútea (Hayashi *et al.*, 2017; Kasimanickam *et al.*, 2020), haciendo eco en que el microambiente uterino, su estructura y la función, pueden estar relacionados con la reducción de la fertilidad en estos animales. Horlock *et al.*, (2020), evaluaron el transcriptoma endometrial de novillas vírgenes, tras la inducción experimental y recuperación de una infección bacteriana en el útero. La infusión bacteriana alteró el perfil del transcriptoma endometrial en comparación con el grupo testigo que no fue infectado, demostrando que es posible que un evento de enfermedad uterina altere la integridad del tejido y por consecuencia su funcionamiento y expresión genética.

De las publicaciones accesibles al autor, no se ha realizado ningún estudio que se enfoque en comparar el transcriptoma endometrial de vacas repetidoras para perfilar las variaciones en la expresión genética específicamente para las fases folicular (proliferativa) y lútea (secretora). Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue caracterizar el transcriptoma de la vaca repetidora durante la fase folicular y lútea

del ciclo estral, utilizando el procedimiento de secuenciación de sitios terminales del transcriptoma completo (Whole Transcriptome Termini Site Sequencing, WTTS-seq) que se diferencia de la secuenciación del transcriptoma entero para clonación al azar (Whole Transcriptome Shotgun Sequencing, RNA-seq) en dos puntos importantes: 1) generación de ADN complementario y 2) su enriquecimiento con colas de poli(A), lo que permite la identificación de diferentes sitios de poliadenilación alternativa capaces de afectar el fenoma (Zhou *et al.*, 2016). Asimismo, comparar las variaciones en los perfiles de expresión genética comparando con vacas de fertilidad normal. Esto permite detectar puentes entre el genoma (genotipos) y el fenoma (fenotipos), lo que conducirá a la detección de marcadores genéticos y vías funcionales para la selección de animales.

I. Revisión de literatura

1. Contexto de la producción lechera y su relación con la vaca repetidora

En vacas lecheras el manejo del periodo de transición se define como las 3 semanas antes y 3 semanas después del parto, y está relacionado directamente con el desempeño reproductivo del hato una vez concluido el periodo de espera voluntario (Melendez y Risco, 2005). Se ha demostrado en diversos estudios que, durante este periodo, se incrementa el riesgo de desarrollar enfermedades relacionadas con los desafíos metabólicos que están asociados con el parto y el inicio de la lactancia (Esposito *et al.*, 2014). El último tercio de la gestación se caracteriza por un incremento exponencial en el crecimiento del feto, lo que a su vez reduce gradualmente el consumo de materia seca por parte de la vaca hasta un 32%, ocurriendo la mayor parte de esta reducción 5 a 7 días antes del parto (Hayirli *et al.*, 2002). Esta reducción en el consumo de alimento aumenta la utilización de los triglicéridos acumulados en el tejido adiposo y puede predisponer a enfermedades metabólicas como la cetosis preparto por una alta utilización de estos, lo cual puede ser perjudicial para la salud posparto. Simultáneamente, el aumento súbito en la producción de leche y la reducción en el consumo de materia seca, conducen a las vacas a un estado fisiológico de balance energético negativo con duración variable, pero que se puede extender hasta 8 a 10 semanas después del parto (Butler, 2003). Información reciente ha demostrado que esta condición puede agravarse y extenderse por factores como la dieta insuficiente durante el periodo seco (O'Hara *et al.*, 2018), el estrés calórico que reduce aún más el consumo voluntario (Ntallaris *et al.*, 2017) y la alta producción láctea (Mann *et al.*, 2015). Lo anterior, sumado al

desafío metabólico del animal al inicio de la lactación resulta en una supresión de la función inmune y a una disminución en el desempeño reproductivo (Wathes *et al.*, 2009, Pascottini *et al.*, 2020).

Uno de los principales manejos zootécnicos en las fincas lecheras es la implementación del periodo de espera voluntario que tiene como principales objetivos, reducir el impacto negativo que estos eventos fisiológicos tienen durante el posparto, sobre la reproducción y mejorar el rendimiento económico de las fincas lecheras, además de dar un periodo de tiempo en el cual ocurre la involución uterina, y el reinicio de la actividad ovárica (Inchaisri *et al.*, 2011). En este tipo de sistemas de producción en lecherías de tipo intensivo y semi-intensivo, el periodo de espera voluntario se encuentra dentro de los 45 a 70 días en leche (dependiendo del tipo de animal) y al finalizar este periodo la vaca será considerada como elegible a recibir su primera inseminación/servicio (Miller *et al.*, 2007). Como se mencionó anteriormente, durante el período de espera voluntario, se espera que se restablezca la integridad tisular uterina mejorar el estado inmunológico y la resolución del proceso inflamatorio establecido durante el parto (LeBlanc *et al.*, 2011; LeBlanc, 2014) y así, retornen los patrones de secreción de hormonas reproductivas como la LH, FSH y las hormonas esteroides provenientes del ovario. Asimismo, durante este período se espera que el mejoramiento en el estado metabólico promueva la reanudación de la actividad ovárica reflejada en el crecimiento de folículos, acompañado de la ovulación y la formación de un Cuerpo lúteo (Butler, 2003; Cheong *et al.*, 2016). Eventualmente la vaca experimentará la recuperación de las reservas de tejido adiposo y la condición corporal (Carvalho *et*

al., 2014). No obstante, a pesar de que la selección de animales a su primer servicio está mediada por el periodo de espera voluntario, se estima que solo el 36% de las vacas elegibles lograrán concebir a su primera inseminación (Norman *et al.*, 2020). Lo anterior indica que al menos el 60% de los animales, fallaran al concebir a un primer servicio dentro de los primeros 100 días en leche. Ferguson y Skidmore, (2013), utilizando registros de 13,885 fincas lecheras de las regiones, sur, este, medio oeste y oeste de Estados Unidos, estiman tasas de concepción al tercer servicio de 38%, lo cual eventualmente podría llevar a estas vacas a ser consideradas como animales con dificultad para concebir o subfértiles. En México podemos encontrar un efecto similar. Por ejemplo, Mellado *et al.* (2013), evaluaron los servicios por concepción para vacas Holstein de granjas lecheras localizadas en zonas áridas de México y encontraron número mayor en los meses de mayo a julio (3.0 a 3.4) en comparación a los otros meses del año (2.1 a 3.0). Esto demuestra que muchos de estos vacas son propensas de ser consideradas repetidoras.

La vaca repetidora se define como aquella que no logra concebir después de 3 inseminaciones/servicios y se caracteriza por presentar ciclos estrales regulares con duración de 18 a 24 días en ausencia de evidencias clínicas que indiquen la presencia de patologías (Gustafsson y Emanuelson, 2002). Estas se deben de diferenciar de las vacas que no presentan ciclos estrales regulares y por ende son animales que no quedan gestantes o presentan otros problemas que causan la infertilidad (Yusuf *et al.*, 2010). En fincas lecheras en Estados Unidos se estima que el síndrome de la vaca repetidora se presenta con una incidencia del 20% (Bartlett *et al.*, 1986) y genera pérdidas económicas por el incremento del número de

inseminaciones/servicios, incremento en los días abiertos, el incremento del intervalo entre partos y el incremento del descarte (Lafi *et al.*, 1992). La etiología del síndrome de la vaca repetidora tiene un origen multifactorial y su incidencia involucra la interacción de aspectos reproductivos, nutricionales, patológicos, ambientales, genéticos y de manejo que conllevan a la vaca a presentar el síndrome (Lafi y Kaneene, 1992; Yusuf *et al.*, 2010). Moss *et al.*, (2002), en un estudio retrospectivo utilizando datos de fincas lecheras no estacionales en Australia, demostraron el efecto negativo que tienen diferentes variables relacionadas al periodo de transición y al postparto. Entre estas se encuentran la distocia o enfermedades durante el postparto, así como el volumen de producción láctea sobre variables reproductivas como los días del parto a primer celo, a primer servicio y servicios por concepción. Todo lo anterior demuestra un incremento en el riesgo de presentar el síndrome de la vaca repetidora, sobre todo cuando no se minimizan o tratan las enfermedades durante el periparto y se descuida el balance nutricional relacionado directamente con los volúmenes de leche producida.

Asimismo, la fertilidad en las fincas lecheras usualmente se encuentra comprometida debido a la presión de producción en la que se encuentran estos animales y a menudo es considerada como un problema fisiológico de la vaca que debe ser solucionado. A través de los años las vacas han sido seleccionadas por méritos productivos con la finalidad de incrementar las cantidades de leche producida por lactancia, resultando en más presión metabólica para estos animales durante esta etapa y disminuyendo a su vez el desempeño reproductivo (Windig *et al.*, 2005). Tradicionalmente, la selección genética para estas características se

realizó hasta principios de los 2000, desafortunadamente sin haber considerado las variables de reproducción (Lucy, 2001) y no fue hasta 2003 que la selección genética de ganado lechero incluyó caracteres reproductivos como la tasa de preñez de las hijas y la tasa de concepción de las novillonas (VanRaden *et al.*, 2004). Veronese *et al.*, (2019), demuestran que la fertilidad del hato puede mejorar cuando se selecciona los caracteres reproductivos a través de incrementar los signos del estro, incrementando el riesgo de quedar preñada. Además, Bedere *et al.*, (2018), realizaron un meta-análisis de la relación entre producción láctea, condición corporal y desempeño reproductivo, sugiriendo que realizar estrategias genéticas y nutricionales enfocadas a la reducción en la pérdida de condición corporal posparto y el pico de lactación, podrían ser una forma efectiva de mejorar la eficiencia reproductiva dentro de la finca. Esto demuestra que actualmente, el enfoque es buscar un equilibrio entre producción láctea y desempeño reproductivo. Sin embargo, en múridos, cérvidos y bóvidos en vida silvestre, se ha observado que se puede encontrar gestaciones durante la lactancia cuando las condiciones nutricionales son favorables, siendo lógica y natural la relación antagónica entre los volúmenes de producción láctea y el inicio del siguiente ciclo reproductivo (Verme y Ozoga, 1981; Knight, 2001; Perera, 2011).

Anteriormente, se mencionó que es común que un porcentaje de las vacas elegibles a ser inseminadas experimenten problemas de fertilidad durante sus primeros dos servicios y que esto podría no estar relacionado directamente con la condición fisiológica del animal (Norman *et al.*, 2020). El momento de la inseminación artificial, en relación con la ovulación, es importante para el éxito de la fecundación debido a

que las inseminaciones de manera tardía no permitirán un tiempo suficiente para la capacitación y los procesos celulares de los espermatozoides en el tracto reproductivo de la hembra para adquirir la capacidad de fertilizar el ovocito. Por otro lado, la inseminación demasiado temprana dará lugar a la muerte de una elevada proporción de espermatozoides antes de que el ovocito llegue al ámpula para la fertilización (Dalton *et al.*, 2001). En efecto, Ranasinghe *et al.* (2009), reportaron bajas tasas de concepción cuando se insemina a las hembras únicamente considerando signos secundarios de celo como inquietud, congestión de la vulva y secreción de moco claro en vacas altas productoras de leche. Dobson *et al.* (2008), mencionan que factores adicionales como mastitis y problemas podales, reducen la pulsatilidad de la FSH necesaria para inducir la producción de estradiol por el folículo dominante y consecuentemente la liberación de LH. En animales que presentan estos problemas clínicos pudieran estar contribuyendo a la disminución del porcentaje de animales que se dejan montar durante el estro, así como a la disminución en su duración, complicando la tarea de tener éxito al inseminar los animales. Lo anterior podría estar aumentando el número de servicios sin concepción y estar afectando de manera indirecta la incidencia de repetición de celos sin que el problema de fertilidad sea inherente al tracto reproductivo *per se*. El establecimiento y mantenimiento de la gestación dependen entre otras cosas de la función y el microambiente del útero durante el ciclo estral (Billhaq *et al.*, 2020). La señalización hormonal es esencial para preparar la ovulación, fertilización y la implantación del embrión (Hunter *et al.*, 2004). La dinámica endometrial se encuentra influenciada por diferentes hormonas, sin embargo, los estrógenos y la

progesterona son de las hormonas que más influyen sobre el desarrollo y funcionamiento del endometrio (Robinson *et al.*, 2002), experimentando ciclos repetidos de proliferación y degeneración celular durante la vida reproductiva normal de los mamíferos (Motta *et al.*, 2020), siendo los principales procesos biológicos implicados la apoptosis, la remodelación de la matriz extracelular y la angiogénesis (Arai *et al.*, 2013). Los recientes avances en las herramientas de secuenciación genética han hecho posible evaluar el transcriptoma a nivel de un grupo de células o de un tejido en específico, ya que permite la recopilación de información sobre la expresión diferencial de los genes expresados al estar expuestos a diferentes estímulos (Stotts *et al.*, 2022). En la actualidad se ha propuesto el enfoque de estudio del transcriptoma endometrial para determinar el rol que ejerce la correcta expresión de los diferentes genes en el desempeño reproductivo (Forde y Lonergan, 2012).

En la vaca repetidora, se han reportado variaciones en la expresión genética endometrial, al compararse con animales de fertilidad normal en muestras tomadas previo a la implantación (Jaureguiberry *et al.*, 2020), así como durante la fase lútea (Hayashi *et al.*, 2017; Kasimanickam *et al.*, 2020), haciendo eco en que el microambiente uterino, su estructura y la función, pueden estar relacionados con la reducción de la fertilidad en estos animales. Horlock *et al.*, (2020), evaluaron el transcriptoma endometrial de novillas vírgenes, tras la inducción experimental y recuperación de una infección bacteriana en el útero. La infusión bacteriana alteró el perfil del transcriptoma endometrial en comparación con el grupo testigo que no

fue infectado, demostrando que es posible que un evento de enfermedad uterina altere la integridad del tejido y por consecuente su funcionamiento.

2. La dinámica endometrial durante el ciclo estral y la implantación

El sistema reproductivo de la vaca está diseñado para transportar los espermatozoides hacia el oviducto y un óvulo hacia el sitio de fertilización. De externo a interno, el útero puede dividirse en tres capas: el perimetrio, el miometrio y el endometrio (Hopper, 2021). El perimetrio es la capa serosa o cubierta peritoneal visceral del útero, es continuación del peritoneo pélvico y abdominal y está formada por un mesotelio y una fina capa de tejido conectivo. El miometrio es la capa mas gruesa y esta en contacto con capa muscular de la vagina y el oviducto (Fails y Magee, 2018). El endometrio es el revestimiento epitelial interno del útero y se organiza en dos regiones distintas, caruncular e intercaruncular (Hopper, 2021). Las carúnculas son regiones mucosas elevadas del endometrio que están altamente vascularizadas. Las carúnculas del útero se unen a los cotiledones de las membranas placentarias fetales para formar los placentomas característicos de una placenta cotiledonaria (Hopper, 2021). Tanto el miometrio como el endometrio sufren cambios cíclicos, correspondientes con el ciclo estral, para preparar el útero para la implantación de un embrión. Si un embrión se implanta y hay un reconocimiento de la gestación, el ciclo estral se pausa y, tanto el miometrio como el endometrio, experimentan un crecimiento y una diferenciación considerables durante la preñez (Liebich, 2020).

2.1. Anatomía e histología uterina

El útero en la hembra bovina consta de un cuerpo y dos cuernos. El cuerpo mide entre 4 y 5 cm de longitud, cranealmente se bifurca para continuar como cuernos uterinos y caudalmente se conecta con la vagina a través del canal cervical (Ghosh, 2021). Los cuernos uterinos son órganos con una capa muscular gruesa y tubulares, que se encuentran en la cavidad abdominal entre el oviducto y el cuerpo del útero. Cada cuerno mide 30 cm de largo en vacas no gestantes y se disponen sentido craneal, se dividen en los ligamentos intercornuales, cada uno de ellos gira bruscamente en sentido ventral, para continuar luego en sentido caudales y terminar finalmente en sentido dorsal al ovario (Ghosh, 2021).

La mucosa del endometrio está compuesta por un epitelio superficial y una lámina propia mucosa (estroma endometrial). La lámina propia está adyacente a la túnica muscular; y cubierta por una capa serosa llamada perimetrio. Ambos componentes de la mucosa experimentan variaciones estructurales cíclicas. En los rumiantes, el epitelio superficial es columnar simple ciliado y no ciliado y suelen tener microvellosidades. Asimismo, puede haber zonas de epitelio columnar pseudoestratificado. Las células pueden presentar cilios (Hopper, 2021). El tejido conectivo forma el marco estructural de la lámina propia (estroma endometrial), que contiene una multitud de glándulas uterinas ramificadas y tubulares. Las porciones terminales de las glándulas pueden extenderse hacia la túnica muscular. El andamiaje de tejido conectivo tiene una gran capacidad de adaptación estructural y funcional y apoya el papel metabólico de la mucosa uterina durante la gestación y el desarrollo de la placenta. Esto se ve facilitado por la presencia de células del

sistema inmunitario innato (natural killers uterinas, células dendríticas y macrófagos) y adaptativo (linfocitos T, linfocitos T regulares, linfocitos B y células plasmáticas derivadas de linfocitos B activados) debajo del epitelio (Lőw *et al.*, 2016).

La túnica muscular está formada por haces de fibras musculares lisas que se prolongan desde la capa muscular del cuerno uterino y se extienden hasta la pared del cuello uterino (Pawlina y Ross, 2018). En el cuerpo y los cuernos del útero, la capa muscular es circular con fibras predominantemente espirales que se cruzan entre sí. Además de las fibras musculares lisas, la capa muscular externa contiene fibroblastos modificados (miofibroblastos contráctiles) que sostienen las capas musculares lisas. Particularmente en la gestación, éstas células se transforman en células musculares y tras el parto, retroceden y sintetizan fibras de colágeno (Pawlina y Ross, 2018). La capa muscular está rodeada por una capa vascular prominente que contiene importantes arterias, venas y vasos linfáticos. Los vasos y las fibras nerviosas que los acompañan (mielinizadas y no mielinizadas) se extienden desde el estrato vascular hasta el endometrio para abastecer las glándulas y el epitelio (Pawlina y Ross, 2018).

El perimetrio rodea al miometrio. Está formado por una túnica serosa externa, que comprende una sola capa de mesotelio, recubierta por una tela subserosa y una capa bien desarrollada de fibras musculares lisas orientadas longitudinalmente (stratum musculare longitudinale). El músculo proyecta hacia el ligamento ancho del útero y es continuo con el músculo del cuello uterino (Ghosh, 2021).

2.2. Cambios en el endometrio durante ciclo estral

Los ciclos estrales consisten en una serie de acontecimientos reproductivos predecibles que comienzan con el celo, terminan con el siguiente y solo se interrumpen durante la gestación y/o problemas patológicos y aspectos ambientales (Forde *et al.*, 2011). La hembra bovina se clasifica como poliéstrica continua, pues presenta sus ciclos estrales durante todo el año; este, se puede dividir en dos fases que son nombradas a partir de la estructura ovárica dominante (Senger, 2012). La fase folicular es un periodo que comprende de la regresión del cuerpo lúteo a la ovulación. Es una fase relativamente corta que representa el 20% de la duración del ciclo estral (4 – 6 días). Las estructuras primarias en el ovario son folículos en diversos estados de crecimiento que secretan estradiol (Forde *et al.*, 2011). La fase lútea es el intervalo de la ovulación a la regresión del Cuerpo lúteo, es de mayor duración que la fase folicular, pues comprende el 80% del ciclo estral (14 – 18 días). La estructura primaria es el Cuerpo lúteo y la hormona predominante es la progesterona (Forde *et al.*, 2011). El inicio de la fase folicular es dependiente a la regresión del Cuerpo lúteo. La luteólisis es el proceso de degeneración celular y apoptosis por el que pasa el Cuerpo lúteo, y está caracterizado por una marcada reducción en la concentración de progesterona (Fails y Magee, 2018). La ausencia de su retroalimentación negativa sobre el hipotálamo, permite que la GnRH sea liberada a mayores frecuencias y amplitudes. Por lo tanto, aumenta la concentración de FSH y LH, lo que promueve el desarrollo y maduración final de los folículos y el aumento en la concentración de estradiol (Senger, 2012). A medida que aumenta la concentración de esta hormona y el desarrollo folicular, se reduce la secreción de

FSH por acción conjunta con la inhibina producida por las células de la granulosa, lo que promueve la dominancia folicular (Forde *et al.*, 2011). La ovulación ocurre en respuesta a un pico pre-ovulatorio de LH y la retroalimentación positiva de estradiol sobre las neuronas del centro preovulatorio hipotalámico (Senger, 2012). Asimismo, durante la fase folicular el estradiol induce la expresión de factores de crecimiento en el endometrio bovino (Robinson *et al.*, 2000; Tasaki *et al.*, 2010) promoviendo la proliferación de las células epiteliales del endometrio al estimular la producción de factores de crecimiento en las células del estroma (Xiao y Goff, 1998). El aumento en la concentración de progesterona por parte del Cuerpo lúteo, recién formado al inicio del diestro, estimula la acumulación de fosfolípidos en las células epiteliales lamínales y glandulares, que pueden liberar ácido araquidónico para la síntesis y secreción de prostaglandina F₂α (PGF₂α) (McCracken, 1980). Durante la fase lútea, la concentración de progesterona aumenta y actúa a través de los receptores a progesterona para bloquear la expresión de receptores de tipo estradiol α y oxitocina en las células epiteliales lamínales y glandulares del endometrio (McCracken, 1980). Por lo tanto, la expresión de receptores a estradiol α y receptores a oxitocina no se detecta entre los días 5 y 11 del ciclo, es decir, durante la mayor parte del diestro, demostrando la sincronía que existe entre la fase folicular y la fase lútea para preparar al endometrio previo a la implantación (McCracken, 1980).

2.2.1 El endometrio durante la fase folicular

La concentración de estradiol previa al pico preovulatorio de LH y la ovulación parece regular cambios en el ambiente uterino en diversas especies. En humanos, por ejemplo, se ha demostrado que la estimulación con estradiol resulta en

proliferación endometrial e inducción de receptores a progesterona, necesarios para la acción posterior de la progesterona para inducir la luteinización y la ventana de implantación (Paulson, 2011). En los bovinos, el pico de estradiol ocurre 36 horas antes de la ovulación (Forde *et al.*, 2011) y el aumento preovulatorio de la concentración de estradiol se ha asociado a un incremento de la supervivencia embrionaria posterior a la implantación (Bridges *et al.*, 2012; Geary *et al.*, 2013). El acondicionamiento adecuado del endometrio con estradiol da lugar a la proliferación endometrial y a la inducción de suficientes receptores de progesterona para permitir que la posterior estimulación con esta hormona induzca la receptividad endometrial (Paulson, 2011). Histológicamente durante la fase folicular, el estroma y el epitelio glandular endometrial se encuentran en mitosis, alcanzando *plateau* y disminuyendo en su división al finalizar la etapa de estro (Ohtani *et al.*, 1993). Es así como durante esta fase, hay una estimulación estrogénica que provoca la proliferación del endometrio y la inducción en este de receptores a progesterona (PGR) (Lessey *et al.*, 1988).

2.2.2 El endometrio durante la fase lútea

En respuesta a la progesterona, el endometrio sufre cambios bioquímicos y estructurales, de un estado proliferativo a uno secretorio, con la inducción concomitante de la receptividad endometrial y la apertura de la ventana para la implantación (Lessey *et al.*, 1988). Durante el diestro temprano, la progesterona del Cuerpo lúteo recién formado, estimula la acumulación de fosfolípidos en el epitelio laminar y glandular que pueden liberar ácido araquidónico para la síntesis y secreción de PGF₂α. Durante el diestro, la concentración de progesterona aumenta

actuando a través de receptores a progesterona, y así bloqueando la expresión de receptores de estradiol α y de oxitocina en los epitelios laminar y glandular del endometrio (McCracken, 1980). Por lo tanto, la expresión de receptores a estradiol α y a oxitocina no se detecta entre los días 5 y 11 del ciclo, es decir, durante la mayor parte del diestro, demostrando la transición sincrónica de una fase proliferativa a una fase secretora. La exposición continua del útero a la progesterona durante los 8 a 10 días, disminuye la expresión de receptores de progesterona, tanto en los epitelios laminar y glandular del endometrio después de los días 11 y 12 (Spencer *et al.*, 1995), todo esto, permite un rápido aumento de la expresión de receptores a estradiol α en el día 13, seguido de receptores a oxitocina en el día 14 en los epitelios laminar y glandular del endometrio (Hixon y Flint, 1987; Spencer *et al.*, 1995). La autorregulación negativa de la expresión de los receptores de progesterona por la progesterona misma, implica una disminución de la transcripción del gen a receptores de progesterona (Alexander *et al.*, 1989; Read *et al.*, 1988). La oxitocina, secretada a partir del día 9 del ciclo estral y de la preñez desde la pituitaria posterior y/o del Cuerpo lúteo, induce la liberación de pulsos de PGF 2α con función luteolítica desde los epitelios laminar y glandular del endometrio en los días 14 a 16 (Wathes y Lamming, 1995). El Cuerpo lúteo sufre una regresión, lo que permite volver al estro y completar el ciclo estral. Así, la progesterona está paradójicamente implicada primero en la supresión y luego en la inducción del desarrollo del mecanismo luteolítico endometrial durante el ciclo estral. El momento de la regulación a la baja de receptores a progesterona por la progesterona misma, parece determinar cuándo se desarrolla el mecanismo luteolítico en el endometrio.

Así, Garret *et al.*, 1988; Johnson *et al.*, 2000 demostraron la capacidad que tiene la administración de progesterona exógena durante el metaestro para disminuir el intervalo entre estros en ovejas y bovinos.

Histológicamente, Ohtani *et al.*, (1993), documentaron los cambios en el endometrio terminando el estro y observan acumulación de la secreción glandular en el lumen uterino, así como mitosis del epitelio glandular. En el tercer día del ciclo estral, la secreción glandular comienza a ser más espesa, apreciándose células del epitelio glandular con vacuolización supranuclear, mientras que la mitosis en el epitelio glandular disminuye. Al día 4, las secreciones alcanzan un valor máximo, las células del estroma son pequeñas con un núcleo denso, sin embargo, las células del estroma periarteriales se alargan (cambios pseudodeciduales). Durante el día 5, muy pocas células del epitelio glandular que se encuentran en mitosis, aunque la presencia de secreción intraluminal y vacuolización supranuclear es todavía prominente. Las células pseudodeciduales aumentan notablemente en el endometrio entre los días 5 y 6. El estroma adquiere aspecto de una lámina sólida de células deciduales bien desarrolladas. La vacuolización basal aparece en el epitelio superficial únicamente durante estos días. En el día 7, tanto la secreción como la vacuolización supranuclear siguen siendo evidentes. La vacuolización supranuclear se produce durante los días 3 a 11. Al día 7, los leucocitos polimorfonucleares se infiltran bajo el epitelio superficial. En el día 8, se observa una reacción pseudodecidual y una vacuolización supranuclear y la secreción comienza a disminuir. Para el día 9, aparecen numerosas células en mitosis en el estroma, células pequeñas con núcleos densos bajo el epitelio superficial. Entre los días 9 y

11, las mitosis estromales son prominentes. La ausencia de secreción intraluminal distingue el día 12 del los días 9, 10 y 11. Después de la fase lútea media, los cambios no se producen lo suficiente evidentes como para hacer una distinción entre ellos. Hacia el día 13, las mitosis estromales disminuyen bruscamente, y no existen factores que permitan discernir entre el endometrio de los días 13 a 15. En los días 16 y 17 se observa vacuolización supranuclear en el epitelio glandular. En el día 18, se producen pocas mitosis glandulares, pero que se vuelven prominentes en el día 19. Durante los días 20 a 21, se comienzan a apreciar cambios histológicos que asemejan a los producidos durante la fase folicular permitiendo distinguirlo así con la fase lútea.

2.3 Cambios en el endometrio durante la implantación

El reconocimiento materno de la gestación en rumiantes (ovejas, vacas, cabras) requiere que el concepto se elongue de una forma esférica a una tubular y luego filamentosa para producir interferón tau ($IFN\tau$), que es la señal que impide el desarrollo del mecanismo luteolítico endometrial (Spencer y Bazer, 2002; Roberts *et al.*, 1999). Este efecto antiluteolítico del $IFN\tau$, resulta en el mantenimiento del Cuerpo lúteo funcional y, por lo tanto, en la secreción de progesterona que es esencial para mantener un ambiente uterino, apoyando los eventos críticos para el desarrollo exitoso del embrión hasta el término de la gestación.

Durante el reconocimiento materno de la gestación, las células mononucleares del trofotodermo del embrión sintetizan y secretan $IFN\tau$ principalmente al día 10, cesando su actividad a partir de los días 21 al 25, con una producción máxima en los días 14 a 16 (Roberts *et al.*, 1999; Bazer, 1992). El $IFN\tau$ parece ser el único

factor producido por el embrión que impide el desarrollo del mecanismo luteolítico endometrial (Bazer, 1992). El IFN τ , no actúa para estabilizar la expresión de receptores de progesterona en el epitelio endometrial durante la preñez (Spencer y Bazer, 1995, Bazer *et al.*, 2003). Más bien, el IFN τ actúa de forma paracrina sobre los epitelios laminar y glandular del endometrio para suprimir la transcripción de los genes a receptores estradiol α y receptores a oxitocina (Spencer y Bazer, 1996; Fleming *et al.*, 2011). Estos fenómenos, anulan el desarrollo del mecanismo luteolítico endometrial al inhibir el aumento de la expresión de receptores a oxitocina, el IFN τ e impidiendo la producción endometrial de pulsos luteolíticos de PGF2 α . Sin embargo, el IFN τ no inhibe la producción basal de PGF2 α , que es mayor en hembras preñadas que en las que se encuentran ciclando. Sin embargo, el embrión y el IFN τ no afectan la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2) en el epitelio endometrial (Charpigny *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2003). La evidencia científica disponible apoya fuertemente la idea de que las acciones antiestrogénicas del IFN τ previenen los aumentos en la expresión epitelial de receptores a estradiol α al inhibir directamente la transcripción del gen para receptores a estradiol α y mantener la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo (Fleming *et al.*, 2001).

La progesterona, la hormona de la preñez, desempeña un papel fundamental en el establecimiento y mantenimiento de la gestación. En todos los úteros de mamíferos, los receptores a progesterona se expresan en el epitelio y el estroma endometrial durante la fase lútea temprana, permitiendo la regulación directa de una serie de genes por la progesterona, a través de la activación estos receptores. Sin embargo, la exposición continua del endometrio a la progesterona autorregula negativamente

la expresión de estos receptores en el epitelio endometrial (Robinson *et al.*, 2001). Se ha observado que la expresión de la proteína de los receptores a progesterona no es detectable en los epitelios laminar y glandular del endometrio de ovejas después de los días 11 y 13 de gestación respectivamente (Spencer and Bazer, 1995). Además, la expresión de receptores a progesterona sólo se detecta en el estroma y el miometrio durante la mayor parte de la gestación en el útero ovino (Spencer and Bazer, 1995). El paradigma de la pérdida de los receptores a progesterona en los epitelios uterinos inmediatamente antes de la implantación es común en ovinos (Spencer and Bazer, 1995), bovinos (Kimmins y MacLaren, 2001), porcinos (Geisert *et al.*, 1994), humanos (Lessey *et al.*, 1988) y ratones (Tan *et al.*, 1999). Por lo tanto, la regulación de la función epitelial endometrial durante el período peri-implantación debe estar dirigida por factores específicos producidos por las células estromales positivas a receptores a la progesterona (Cunha *et al.*, 1985). En rumiantes, las células estromales endometriales expresan tanto el factor de crecimiento de fibroblastos 10 (FGF-10) como el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), mientras que el epitelio endometrial y el trofotodermo expresan sus respectivos receptores, a 2IIIb del FGF (FGFR2IIIb) y c-met (Chen *et al.*, 2000a; Chen *et al.*, 2000b).

En humanos como en roedores, el patrón de expresión de las glucoproteínas de mucina (MUC) MUC1 y MUC4 en el epitelio laminar uterino puede controlar la accesibilidad de los receptores de integrina del trofotodermo a sus ligandos, bloqueando estéricamente la adhesión célula-célula y célula-matriz extracelular y el acceso del trofotodermo del concepto al epitelio laminar uterino (Carson *et al.*,

2000; Chen *et al.*, 2000b). La cascada de adhesión a la implantación en roedores y ovejas se inicia tras la regulación a la baja de MUC1, que coincide con la pérdida de RP del epitelio uterino (Bowen *et al.*, 1997; Johnson *et al.*, 2001). Este patrón de expresión de MUC1 contrasta con el de los conejos y los humanos, en los que hay un aumento general de la expresión de MUC1 durante la fase receptiva bajo la influencia de la progesterona; sin embargo, MUC1 se reduce localmente en los lugares de implantación, quizá debido a las señales paracrinas de los blastocitos (Carson *et al.*, 2000).

En los rumiantes, la exposición continua del útero a la progesterona induce la expresión de proteínas en el epitelio glandular endometrial que se secretan en el lumen uterino (Stewart *et al.*, 2000; Peltier *et al.*, 2001). Los dos productos secretores del epitelio glandular mejor son las proteínas de la leche uterina, también denominadas serpinas uterinas, y la osteopontina. Las proteínas de la leche uterina miembros de la familia de las serpinas inhibidoras de la serina proteasa (Peltier *et al.*, 2001; Ulbrich *et al.*, 2009) y sirven como excelentes marcadores de la capacidad secretora del endometrio durante la gestación (Moffatt *et al.*, 1987; Spencer *et al.*, 1999; Stewart *et al.*, 2000; Ulbrich *et al.*, 2009). La expresión de ARNm de las proteínas de la leche uterina está estrechamente regulada, apareciendo en el epitelio glandular entre los días 15 y 17, y luego aumentando su abundancia durante la gestación de manera paralela al crecimiento y desarrollo fetal (Moffatt *et al.*, 1987; Spencer *et al.*, 1999; Stewart *et al.*, 2000). La osteopontina es una glicoproteína ácida fosforilada componente de la matriz extracelular detectada en los epitelios y en las secreciones de muchos tejidos, incluido el útero (Johnson *et al.*, 2003). La

osteopontina se une a los heterodímeros de integrina para promover la adhesión, la propagación y la migración celular (Johnson *et al.*, 2003). La osteopontina aumenta en las secreciones uterinas durante el periodo de peri-implantación (días 11-17), cuando se produce la adherencia y fijación del embrión al epitelio laminar del endometrio (Johnson *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 1999). La osteopontina secretada se une entonces a los heterodímeros de integrina expresados por el trofotodermo y el útero para estimular los cambios en la morfología de las membranas placentarias extraembrionarias del embrión e inducir la adhesión entre el epitelio laminar y el trofotodermo, esencial para la implantación y la placentación (Johnson *et al.*, 2003). El gen para osteopontina se expresa en el epitelio glandular durante toda la gestación y la abundancia de osteopontina es paralela al crecimiento y desarrollo fetal (Johnson *et al.*, 2003).

La pérdida de receptores a progesterona por parte del epitelio glandular parece ser necesaria para la morfogénesis y la función diferenciada de este grupo celular, así como para evitar la inhibición de estos eventos por parte de la progesterona (Musgrove *et al.*, 1998; Tong y Pollard, 1999). La ausencia de receptores de progesterona es necesaria para que los epitelios secretores inicien y mantengan la expresión de los genes que codifican las proteínas secretoras. La alteración de la morfogénesis epitelial que implica la disminución en la expresión del gen a receptores de progesterona en las glándulas endometriales, podría comprometer la supervivencia y el crecimiento del blastocisto durante la gestación temprana (Burton *et al.*, 2002).

3. La dinámica endometrial en la vaca repetidora

Ohtani y Kiyoshi, (1994), realizando una evaluación histológica del endometrio de vacas repetidoras en los días 1 y 8 del ciclo estral (día 0= estro), documentaron los cambios significativos contra vacas de fertilidad normal. Al día 1, en las vacas normales, se observan mitosis del epitelio glandular, no así vacuolización supranuclear. En las vacas repetidoras, en cambio, se observó el endometrio en etapa secretora, con exudados glandulares y vacuolización supranuclear prominente, con ausencia de mitosis glandulares. En ambos grupos, el estroma se encontraba edematizado, sin embargo, únicamente se observó mitosis en el estroma de las vacas normales. En ambos grupos, se observó un sangrado metaestral en ausencia de vacuolización basal e infiltración leucocitaria. En el día 8, el tejido glandular endometrial de vacas normales y repetidoras presentó ausencia de mitosis y acumulación de contenido secretorio prominente. El estroma en ambos grupos, presentó ausencia de mitosis, y en el endometrio de vacas normales se encontró la reacción pseudodecidual en mayor proporción que en las vacas repetidoras. De acuerdo con Ohtani *et al.*, (1993), el endometrio en las vacas repetidoras del día uno del ciclo estral presenta una morfología secretora, contrastando con la cual se espera entre los días 6 y 8 en vacas normales. Esta asincronía en la función del endometrio durante el ciclo estral, podría ser la causante de la presentación del síndrome de la vaca repetidora, ya que los bovinos y ovinos, hay una escasa flexibilidad en la asincronía uterina si los tiempos en que acurren estos eventos no ocurren en el orden cronológico normal (Pope, 1988). La función endometrial en la vaca repetidora se ha estudiado a través del ciclo estral y durante

la implantación, con el fin de determinar, si existen diferencias en la expresión de genes y proteínas que pudieran estar comprometiendo la sincronía de los eventos necesarios para el establecimiento de la gestación (Katagiri *et al.*, 2013; Hayashi *et al.*, 2017; Kasimanickam y Kasimanickam, 2021).

A pesar de la importancia que tiene estudiar el síndrome de la vaca repetidora, es bastante escasa la información para caracterizar los eventos cercanos a la fase folicular. Un estudio relacionado a los eventos en esta fase sería deseable para entender los posibles cambios en este período muy relacionados al crecimiento folicular y la ovulación.

3.1. Microambiente endometrial en la vaca repetidora

El estradiol y la progesterona regulan la expresión de una amplia variedad de factores de crecimiento y citoquinas que desempeñan un papel importante en la receptividad uterina, el crecimiento embrionario y la implantación (Brooks *et al.*, 2014). A través del uso de herramientas moleculares se han identificado diferentes genes que se expresan en el endometrio de forma diferencial en respuesta al ciclo estral (Bauersachs *et al.*, 2005; Shimizu *et al.*, 2010). Este enfoque ha sido aplicado para evaluar la función endometrial de vacas con fertilidad normal, sub-fértiles e infértiles durante el ciclo estral y la gestación temprana, demostrando que en el endometrio se expresan genes diferencialmente entre estos individuos (Minten *et al.*, 2013; Killeen *et al.*, 2014).

Así, Takagari y Takahashi, (2004), evaluaron cantidades de factor de crecimiento epidermal (EGF) en tejido endometrial, detectando una expresión alterada de este factor en la vaca repetidora. Las vacas con fertilidad normal muestran dos picos en

las concentraciones endometriales de EGF en los días 2 - 4 y 13 - 14 (Día 0 = estro) del ciclo estral, y estos picos están ausentes o son más bajos en aproximadamente el 70% de las vacas Holstein lactantes reproductoras afectadas por el síndrome de la vaca repetidora (Takagari y Takahashi, 2004, Katagari *et al.*, 2016). Las alteraciones en las concentraciones endometriales de EGF se han relacionado con la reducción de la fertilidad tras la inseminación artificial (IA) en vacas repetidoras (Takagari y Takahashi, 2006). Jaureguiberry *et al.*, (2020), compararon la expresión endometrial del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), la enzima prostaglandina-endoperoxidasa sintasa 2 (PTGS2) y el factor de crecimiento y diferenciación NODAL en vacas repetidoras durante el diestro. En sus resultados muestran diferencias en la expresión endometrial de ARNm de los genes EGFR, NODAL y PTGS2, pero no en la expresión endometrial los receptores a estradiol α y progesterona entre vacas repetidoras y normales. La expresión endometrial al EGFR fue mayor en las vacas repetidoras, lo que puede estar relacionado con cambios en los mecanismos reguladores de su expresión. El receptor a estradiol α presentó una correlación positiva con la de EGFR. Asimismo, se ha demostrado que el estradiol desempeña un papel primordial en la regulación de la expresión de EGFR (Sagsoz *et al.*, 2012). Es posible que la alteración de la concentración de estradiol y el EGF modifique la expresión de EGFR y, en consecuencia, el entorno uterino en las vacas repetidoras.

La alteración de los perfiles EGF/EGFR produce cambios importantes en el metabolismo de prostaglandinas (Takatsu *et al.*, 2018). Wagener *et al.*, (2017), obtuvieron una diferencia significativa con la disminución de la expresión de ARNm

de PTGS2 en vacas repetidoras. Por lo tanto, la disminución de la expresión de PTGS2 en vacas repetidoras puede estar relacionada con cambios en la capacidad del útero para sintetizar prostaglandinas, que son esenciales en el desarrollo embrionario y el mantenimiento del Cuerpo lúteo durante la gestación (Dorniak *et al.*, 2011). Erdem y Guzeloglu, (2010) determinaron que la inhibición de una prostaglandina sintasa durante la gestación temprana en novillas Holstein disminuía las tasas de preñez, lo que demuestra la importancia de PTGS2 para la fertilidad y aporta más pruebas de su posible papel en el síndrome de la vaca repetidora.

Las mucinas se consideran un grupo de moléculas que influyen en la implantación embrionaria (Kasimanickam *et al.*, 2014). Wagener *et al.*, (2017), observan aumentos la expresión endometrial de ARNm de dos mucinas (MUC4 y MUC12) en las vacas repetidoras en comparación con las normales. Se ha reportado que el éxito en la implantación requiere la regulación a la baja de mucinas para permitir la interacción blastocisto-endometrio (Bastu *et al.*, 2015). La regulación hormonal de la expresión de mucinas varía entre especies. En ratones (Surveyor *et al.*, 1995) y cerdos (Bowen *et al.*, 1997), la progesterona es un inhibidor y en humanos un estimulador de la expresión de MUC1 (Meseguer *et al.*, 2001). En ovejas, los niveles de expresión? más altos de MUC1 se detectan in vivo durante la fase lútea y el tratamiento in vitro de células endometriales ovinas con progesterona o estrógenos produce una regulación al alza de la expresión de ARNm y proteína de MUC1, mientras que el tratamiento con IFN γ regula a la baja la expresión de MUC1 (Raheem *et al.*, 2016). En el ganado bovino, la expresión no regulada de ARNm o proteínas MUC puede contribuir a la subfertilidad en las vacas repetidoras.

II. Justificación

De acuerdo al Council on Dairy Cattle Breeding (Norman *et al.*, 2021), se estima que el 15% de las vacas se descartan de las granjas lecheras debido a problemas reproductivos. Este trabajo está enfocado en obtener respuestas sobre la expresión genética endometrial de vacas repetidoras que no muestran problemas clínicos ni endocrinológicos aparentes, pero que no logran concebir después de repetidas inseminaciones, ocasionando su baja de las unidades de producción por cuestiones económicas. Este trabajo utiliza un enfoque de evaluación del transcriptoma endometrial durante la fase folicular y la fase lútea del ciclo estral, basado en los eventos de poliadenilación alternativa que son conocidos por afectar el fenoma. En el presente trabajo se evaluaron vacas repetidoras que fueron clasificadas como no aptas para la reproducción con vacas recién paridas que requirieron de 1 a 2 inseminaciones para concebir con el fin de identificar patrones que pudieran afectar la receptividad del endometrio y por ende la capacidad de establecer la gestación.

III. Hipótesis

El perfil de expresión genética endometrial en las vacas repetidoras será diferente a las de fertilidad normal durante las fases folicular y lútea del ciclo estral.

IV. Objetivos

4.1. Objetivo general

El objetivo de este estudio fue caracterizar el transcriptoma de la vaca repetidora durante la fase folicular y lútea del ciclo estral, utilizando el procedimiento de secuenciación de sitios terminales del transcriptoma completo (Whole Transcriptome Termini Site Sequencing, WTTS-seq).

4.2 Objetivos específicos

Comparar el tamaño del folículo dominante y el Cuerpo lúteo, la presencia de Cuerpo lúteo y de celo de las vacas repetidoras y vacas de fertilidad normal antes y 12 días después de la aplicación de PGF2 α durante un ciclo estral.

Comparar el registro de actividad de las vacas repetidoras y las vacas de fertilidad normal después de la aplicación de PGF2 α durante un ciclo estral.

Comparar las variaciones en los perfiles de expresión genética de las vacas repetidoras con las vacas de fertilidad normal durante las fases folicular y lútea del ciclo estral.

V. Material y métodos

5.1. Ubicación

El estudio se llevó a cabo durante los meses de junio a agosto del 2022 en la granja lechera Knott Dairy Center ubicada en Pullman, Washington y que pertenece a Washington State University. El comité institucional del cuidado y uso de los animales de Washington State University (Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC) evaluó los procedimientos realizados durante este experimento (ASAF#: 7109).

5.2. Animales

Se utilizaron un total de 13 vacas lecheras Holstein multíparas en lactancia clínicamente sanas. Se clasificaron en dos grupos: 1) vacas que se encontraban dentro de los primeros 100 días postparto confirmadas preñadas al finalizar el estudio a una o dos inseminaciones (Testigo, VT; n= 6) con edad de 2.7 ± 0.8 ; y 2) vacas repetidoras con más de 350 días en leche que anteriormente no lograron concebir en más de 3 inseminaciones (Vacas repetidoras, VR; n = 7) con edad de 5.7 ± 1.5 . Al comienzo del estudio las vacas testigo contaban con 18 ± 2 días y las repetidoras con 450 ± 88 días posparto. Se alimentaban dos veces al día con ración total mezclada (RTM), disponían de agua *ad libitum* y se encontraban sin enfermedades clínicas aparentes.

5.3. Manejo Reproductivo

El grupo VT recibió el manejo reproductivo habitual de la granja para una vaca posparto, el cual se compone de los protocolos de sincronización de celos presynch

y ovsynch. El presynch consistió en dos aplicaciones IM de 5ml de Dinoprost Trometamina (Lutalyse ®), la primera al día 0 del estudio y la segunda 14 días después. El ovsynch comenzó con una aplicación inicial IM de 2ml de Clorhidrato de Gonadorelina (Factrel ®) al día 26 experimental, una vez cumplidos 12 días de la segunda aplicación de Lutalyse ®. Al cumplirse 7 días de la aplicación de Factrel ®, se administró una dosis IM de 5ml de Dinoprost Trometamina (Lutalyse ®). Se administró una segunda dosis IM de 2ml de Clorhidrato de Gonadorelina (Factrel ®) transcurridas 48 horas de administrado el Lutalyse ®. La inseminación artificial se realizó a las 24 horas de aplicada la segunda dosis de Factrel ®. Se realizó un ultrasonido transrectal entre 35 y 45 días después de la inseminación para diagnosticar que las vacas se encontraran preñadas. En el grupo VR se realizó un presynch, siendo la primera aplicación IM de 5ml de Dinoprost Trometamina (Lutalyse ®) al día 7 del estudio y la segunda 14 días después.

5.4. Determinación de la fase del ciclo estral

La fase lútea en el grupo VT se consideró 11 días después de la aplicación de la segunda dosis de Lutalyse ® y se confirmó por la presencia de un Cuerpo lúteo y concentraciones en sangre >1 ng/ml de progesterona. En el grupo VR la fase lútea se determinó 11 días después de la presencia estro conductual del ciclo estral producto de la segunda aplicación del Lutalyse ® y se confirmó por la presencia de un Cuerpo lúteo y concentraciones en sangre de >1 ng/ml de progesterona. En el grupo VT para la fase folicular se consideró el día de aplicación de la segunda dosis de Factrel ® y se confirmó por concentraciones de ≤ 1 ng/ml de progesterona. En el grupo VR la fase folicular se consideró una vez comenzarán a mostrar estro

conductual producto de su segundo ciclo estral posterior a la segunda aplicación de Lutalyse ® y se confirmó por concentraciones ≤ 1 ng/ml de progesterona.

5.5. Determinación de la actividad

El estro conductual se determinó a través del monitoreo continuo del sistema Cow Manager ® (CowManager, Harmelen, Netherlands). Se evaluaron los registros de movimiento capturados por los aretes en ambos grupos, a partir del día de aplicación de la segunda dosis de Lutalyse ®. Las actividades registradas por los aretes fueron sin actividad, rumiando, comiendo, actividad y alta actividad, y se consideraron como los minutos dedicados a cada acción por cada hora/día.

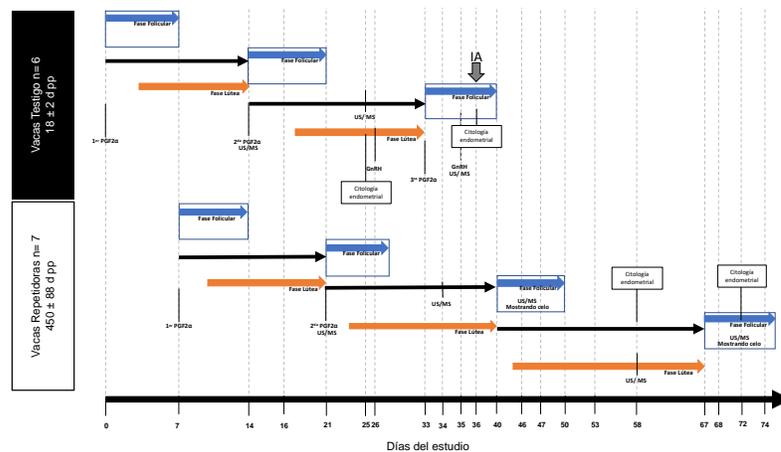


Figura 1. Esquema de actividades para las vacas testigo y las vacas repetidoras.

Ultrasonido (US), muestra de sangre (MS), Lutalyse ® (PGF2 α) y Factrel ® (GnRH).

5.6. Evaluaciones reproductivas

La actividad ovárica se evaluó mediante ecografía transrectal utilizando un aparato de ultrasonido (Aloka SSD 500, Tokio, Japón) con un transductor lineal de 7.5 MHz

de frecuencia. En el grupo VT se realizaron ultrasonidos los días experimentales 14, 25 y 35. En el grupo VR se realizaron ultrasonidos los días experimentales 21, 34 y cuando mostraron celo durante los días experimentales 67 - 74. Se registraron las principales estructuras ováricas (tamaño folicular, presencia y tamaño del Cuerpo lúteo). La muestra de sangre se tomó al momento de las evaluaciones ecográficas mediante la punción de la vena o arteria coccígea. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3500 RPM durante 20 minutos. El suero se analizó mediante la técnica de radioinmunoanálisis para determinar las concentraciones de progesterona en sangre (datos no disponibles al momento).

5.7. Perfil del transcriptoma endometrial

Las técnicas moleculares se realizaron en las instalaciones de la School of Molecular Biosciences perteneciente al College of Veterinary Medicine de Washington State University.

5.7.1. Obtención del ARN

Se obtuvieron las células endometriales los días experimentales 25 y 35 en el grupo VT, y 58 y 67 – 74 en el grupo VR, para la fase lútea y la fase folicular, respectivamente, utilizando una pipeta de uso equino (Continental Plastics, Delavan, WI) modificado con un cepillo de exfoliación histológica (CooperSurgical, Trumbull, CT) exponiéndolo y rotándolo contra la pared uterina. El cepillo se retiró cuidadosamente y se colocó inmediatamente en un tubo de microcentrífuga de 2 ml

que contenía 1.5 ml de RNAlater (Ambion, Foster City, CA). Las muestras se enfriaron a 4°C durante 24 horas y luego se colocaron a -20°C hasta su posterior extracción.

5.7.2. Extracción del ARN

El ARN se extrajo utilizando el método Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) (Sultan *et al.*, 2014). Rápidamente, las muestras pasaron de -20°C a descongelarse en hielo. Las modificaciones del protocolo fueron las siguientes: se retiraron los cepillos de exfoliación y se trasladaron a un nuevo tubo de microcentrífuga de 2 ml con 1 ml de PBS 1X (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las muestras se centrifugaron a 18,000 x g a 4°C durante 10 minutos. Se rasparon los citocepillos contra las paredes del tubo de microcentrífuga para retirar las células que pudieran haberse quedado entre las cerdas. Los citocepillos se removieron posteriormente dejando en el tubo de microcentrífuga únicamente las células con el PBS 1X. Las muestras se centrifugaron nuevamente a 21,130 x g a 4°C durante 10 minutos. Se retiró la parte líquida de las muestras y se añadió 350 µl de Trizol. Se utilizó un macerador de micro pellets (Wilmad-LabGlass) para lisar inicialmente las células durante 5 a 7 segundos. La muestra se trasladó a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.7 ml. El tubo de microcentrífuga de 2 ml que previamente contenía la muestra enjuagó con 350 µl de Trizol y se transfirió al tubo de microcentrífuga que contenía al resto de la muestra. Las células se lisaron continuamente durante 5 a 7 segundos utilizando la pipeta de 1 ml. Las células se lisaron adicionalmente durante 5 segundos con la microplaca de pellets si era necesario. Siguiendo el protocolo, las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos y se añadieron 140 µl de

cloroformo. Las muestras se centrifugaron a 12,000 x g a 4°C durante 15 minutos y la capa de precipitación se trasladó a un nuevo tubo de microcentrífuga de 1.7 ml. Se añadió un total de 350 µl de alcohol isopropílico y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, las muestras se centrifugaron a 12,000 x g a 4°C durante 10 minutos, se eliminó el alcohol isopropílico y se añadió 1 ml de etanol al 100%. Se eliminó el etanol y las muestras se suspendieron en 20-40 µl de agua libre de nucleasas, dependiendo del tamaño del pellet. Las concentraciones se evaluaron con el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

5.7.3. Tratamiento del ARN

Se trataron las muestras para eliminar todos los contaminantes de ADN con el kit DNA-free (Zymo Research, Irvine, CA). Las muestras se diluyeron a 200 ng/µl en un tubo de microcentrífuga de 0.5 ml con agua libre de nucleasas. Se añadió solución tamponada 10X Turbo DNasa a razón de 0.1 volúmenes y luego se añadió 1 µl de Turbo DNasa a la muestra. La muestra se incubó a 37°C durante 30 minutos y, a continuación, se añadió el reactivo de inactivación de DNasa a razón de 0.1 volúmenes a la muestra. La muestra se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y luego se centrifugó a 10,000 x g durante 1.5 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó la solución y en la muestra se realizó un protocolo de purificación en columna (Zymo Research, Irvine, CA). Se añadió a toda la muestra el doble de cantidad de solución tamponada de unión a ARN y 1 volumen de etanol al 100%. La muestra se trasladó a una columna zymo-spin y se centrifugó a 16,000 x g durante 30 segundos. El flujo se desechó y se añadió 400 µl de solución

tamponada de preparación de ARN; la muestra se centrifugó a 16,000 x g durante 30 segundos. Se descartó el flujo y se añadió 700 µl de solución tamponada de lavado. La muestra se centrifugó a 16,000 x g durante 2 minutos, se desechó el flujo y se volvió a centrifugar a 16,000 x g durante 30 segundos para asegurarse de que se había eliminado toda la solución tamponada de lavado. La columna zymo-spin se transfirió a un tubo de microcentrífuga de 1.7 ml, se añadió 11 µl de agua libre de nucleasas directamente a la columna y se centrifugó la muestra a 16,000 x g durante 30 segundos. Las concentraciones se evaluaron con el espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE). La calidad del ARN se analizó en el Centro de Genómica de la Universidad Estatal de Washington. La calidad del ARN se determinó por un valor 18S/21S superior a 1, y un valor RQN superior a 5.

5.7.4. Preparación de la biblioteca

Se utilizó ARN de buena calidad para la preparación de bibliotecas de ADNc utilizando el protocolo de secuenciación de sitios terminales del transcriptoma completo (WTTS-seq) (Zhou *et al.*, 2016). Se utilizó un total de 1.5 a 4 µg de ARN para la preparación de la biblioteca. El ARN total se fragmentó utilizando solución tamponada de fragmentación de ARN (Ambion, Foster City, CA). El enriquecimiento de poli(A) + ARN se realizó utilizando las perlas magnéticas Dynabeads oligo (T) (Ambion, Foster City, CA). La primera cadena de ADNc se sintetizó utilizando la transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA) y adaptadores 5' y 3' que se ajusten a la plataforma Ion Torrent. A continuación, se utilizó RNasa H (Thermo Scientific, Wilmington, DE) y I (Thermo Scientific, Wilmington, DE) para eliminar cualquier contaminante del ARN. El ADNc tratado se purificó utilizando un

kit de purificación para columna zymo-spin (Zymo Research, Irvine, CA), y a continuación se realizó la amplificación asimétrica por PCR para la síntesis del ADNc de la segunda cadena. Se utilizaron perlas de AMPure en una proporción de 0.5:1 de volumen de ADN y 0.8:1 de volumen para seleccionar tamaños de pb entre 200 y 500 nucleótidos de longitud. Se realizaron imágenes en gel para asegurar que se han seleccionado los tamaños correctos y las muestras se enviaron al Centro de Genómica de la Universidad Estatal de Washington para el análisis de calidad. Las muestras que tengan los tamaños correctos seleccionados se secuenciaron utilizando la secuenciación Ion Torrent.

5.7.5. Control de calidad, mapeo y procesamiento

Para el control de calidad de todas las muestras secuenciadas se utilizó la versión 0.0.13.1 del FASTX Toolkit. De acuerdo con las especificidades de la cadena WTTS-seq, todas las timinas (Ts) fueron recortadas del principio de cada lectura utilizando un script Perl, manteniendo las lecturas con un tamaño medio de 316 pbs para el mapeo. El genoma de referencia bovino en formato FASTA y el archivo de anotación en formato GFF se descargaron del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome?term=bos%20taurus>).

Se utilizó la versión 3.4.1 de TMAP (<https://github.com/iontorrent/TMAP>) para el mapeo de lecturas. Se llevó a cabo la agrupación de las lecturas del mapa y se consideraron aquellos sitios APA que se encontraron en la misma hebra dentro de una ventana de 24 nucleótidos (Wang *et al.*, 2018).

5.7.6. Caracterización de los sitios de poliadenilación alternativa (APA)

Se utilizó la herramienta Cuffcompare versión 2.2.1 para asignar lo siguiente a cada grupo de sitios APA: información sobre el genoma, el gen y el mapeo dentro del gen. El número de andamio, la dirección de la hebra y las coordenadas de los extremos 5' y 3' se incluyeron en la información del genoma. La información del gen incluye el número de identificación, la hebra, el biotipo, el símbolo y la identificación de la transcripción. En el biotipo de los genes, los sitios APA fueron seleccionados para ser asignados a los genes codificantes de proteínas, a los ARN largos no codificantes (ARNlnc), a los microARNs (ARNmi), a los pseudogenes y a los genes de ARN de transcripción (ARNt).

5.7.7. Análisis de secuencias

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) utilizando los 10,000 sitios APA más abundantes en las 6 librerías. Las secuencias se normalizaron para cada conjunto de datos. Se utilizaron las funciones prcomp y ggplot en R para mostrar los resultados. Se utilizó el paquete DESeq2 en R (Love *et al.*, 2014) para normalizar las lecturas en bruto entre todas las muestras, separar los perfiles del transcriptoma entre las vacas control y las vacas repetidoras para la fase folicular y la fase lútea, e identificar los sitios APA diferencialmente expresados (DE-APA) utilizando un valor ajustado de $P < 0.01$. Todos los genes codificadores de proteínas asociados a los sitios DE-APA se utilizaron en Metascape (<http://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>) para crear mapas de calor de

enriquecimiento utilizando ontología de genes (GO) para procesos biológicos (BP), componentes celulares (CC) y función molecular (MF) (Zhou *et al.*, 2019).

5.8. Análisis Estadístico

Las estructuras ováricas (tamaño del folículo dominante y tamaño del cuerpo lúteo) se compararon entre los grupos antes y después de la segunda administración de PGF2 α (Lutalyse ®) a través de la prueba ANOVA de dos vías. La presencia de Cuerpo lúteo antes y después de la aplicación de PGF2 α y la presencia de celo después de la aplicación de PGF2 α entre vacas testigo y las vacas repetidoras se comparó utilizando la prueba exacta de Fisher. El tiempo dedicado a cada acción (actividad, rumia, tiempo de alimentación, actividad y alta actividad) se comparó entre las vacas testigo y las vacas repetidoras después de la segunda aplicación de PGF2 α de acuerdo con el día a través de una prueba múltiple de t con corrección de Welch. Las pruebas se realizaron usando el software SAS ® OnDemand for Academics y se consideraron diferencias significativas con un $\alpha = 0.05$.

VI. Resultados

6.1. Estructuras ováricas y presencia de signos de estro

En la figura 2 se observa la respuesta de ambos grupos a la administración de PGF2 α , los cuales no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P>0.05$). El tamaño del folículo dominante no presentó diferencias antes y después de la aplicación de PGF2 α entre el grupo VT (Antes= 17.8 mm \pm 4.7 y Después= 18.7 mm \pm 5.5) y el grupo VR (Antes= 16.6 mm \pm 5.2 y Después= 17 mm \pm 9) ($P>0.05$) (Figura 1; Panel A). El tamaño del Cuerpo lúteo no presentó diferencias antes y después de la aplicación de PGF2 α entre el grupo VT (Antes= 22.5 mm \pm 2.9 y Después= 21.4 mm \pm 7.6) y el grupo VR (Antes= 25 mm \pm 3.5 y Después= 26.2 mm \pm 2.5) ($P>0.05$) (Figura 1; Panel B). La proporción de animales que mostraron celo no presentó diferencias después de la aplicación de PGF2 α entre el grupo VT (Después= 50%) y el grupo VR (Después= 80%) ($P>0.05$) (Figura 1; Panel C). La proporción de animales con presencia de Cuerpo lúteo no presentó diferencias antes y después de la aplicación de PGF2 α entre el grupo VT (Antes= 70% y Después= 80%) y el grupo VR (Antes= 100% y Después= 70%) ($P>0.05$) (Figura 1; Panel D).

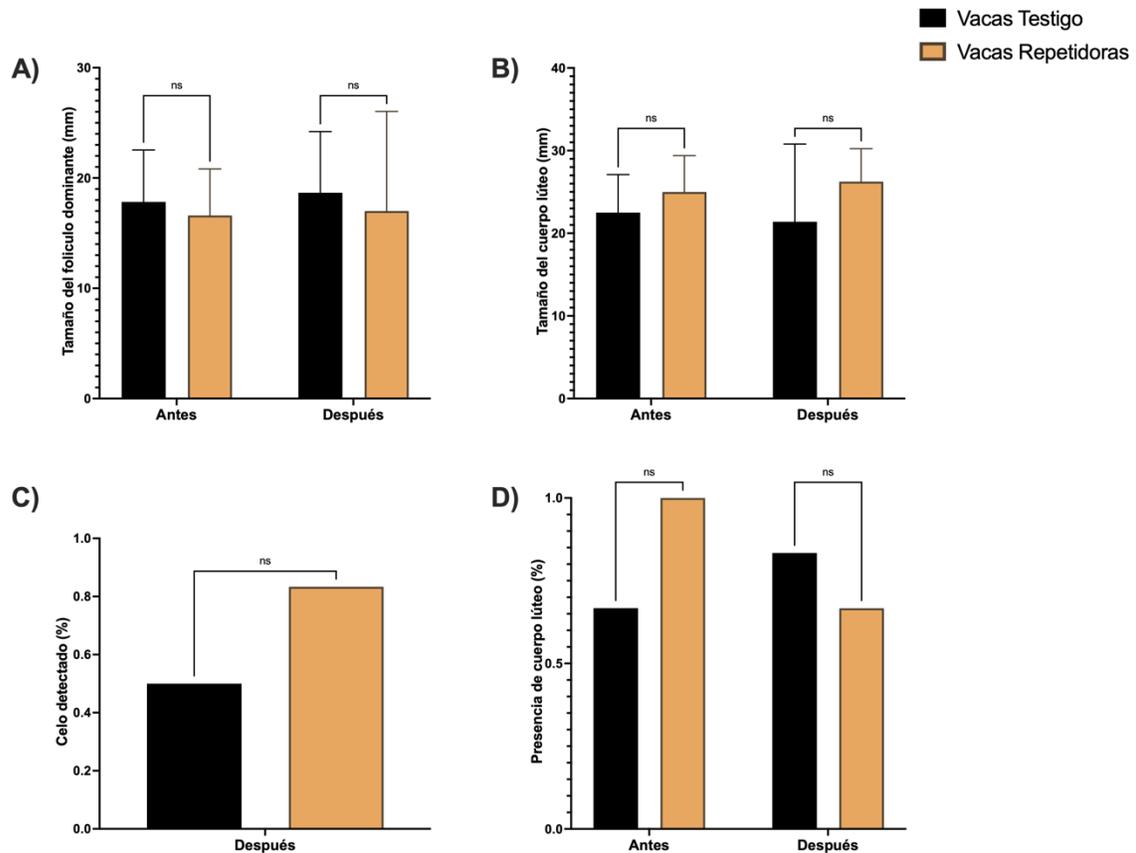


Figura 2. Comparación de las estructuras ováricas entre grupos antes y después de la aplicación de un agente luteolítico (Lutalyse – PGF2 α). Panel A) Tamaño del folículo dominante. Panel B) Tamaño del cuerpo lúteo. Panel C) Proporción de celos detectados. Panel D) Proporción de presencia de cuerpo lúteo. Las diferencias significativas se expresan como $P > 0.05$ (ns), $P < 0.05$ (*), $P < 0.002$ (**), $P < 0.001$ (***)

6.2. Actividad motriz, rumia y alimentación

Los registros de ausencia de actividad por hora al día mostraron diferencias significativas para los días 0 (VT= 16.19 minutos, VR= 21.03 minutos; $P = 0.048$), 1 (VT= 16.82 minutos, VR= 21.46 minutos; $P = 0.048$), 2 (VT= 14.80 minutos, VR= 20.35 minutos; $P = 0.007$) y 10 (VT= 15.55 minutos, VR= 20.98 minutos; $P = 0.01$)

entre el grupo VT y VR, posteriores a la segunda aplicación PGF2 α . El resto de los días no mostraron diferencias significativas ($P>0.05$) para ausencia de actividad entre los grupos VT y VR. No obstante, se observa una tendencia del grupo VR por pasar más tiempo en ausencia de actividad después de la segunda aplicación de PGF2 α (Figura 3). Los registros de rumia por hora al día no mostraron diferencias significativas entre el grupo VT y VR ($P>0.05$) después de la segunda aplicación de PGF2 α . Sin embargo, se aprecia una tendencia del grupo VT por pasar más tiempo rumiando al compararlas con el grupo VR después de la segunda aplicación de PGF2 α (Figura 4). Los registros de alimentación mostraron diferencias significativas para los días 2 (VT= 9.264 minutos, VR= 5.369 minutos; $P= 0.013$), 4 (VT= 10.01 minutos, VR= 5.815 minutos; $P= 0.005$), 5 (VT= 10.28 minutos, VR= 6.149 minutos; $P= 0.006$), 6 (VT= 9.548 minutos, VR= 5 minutos; $P= 0.002$), 7 (VT= 10.06 minutos, VR= 4.180 minutos; $P<0.001$), 8 (VT= 10.05 minutos, VR= 5.283 minutos; $P<0.001$) y 10 (VT= 9.084 minutos, VR= 5.214 minutos; $P= 0.014$) entre el grupo VT y VR, posteriores a la segunda aplicación de PGF2 α . El resto de los días no mostraron diferencias significativas ($P>0.05$) para los registros de alimentación entre los grupos VT y VR, después de la segunda aplicación de PGF2 α . Sin embargo, existe una tendencia del grupo VT por pasar mayor tiempo alimentándose en comparación al grupo VR, posterior a la segunda aplicación de PGF2 α (Figura 5). El tiempo que pasaron activas presentó diferencias estadísticamente significativas en los días 0 (VT= 5.218 minutos, VR= 7.497 minutos; $P=0.018$), 3 (VT= 5.090 minutos, VR= 8.401 minutos; $P<0.001$), 5 (VT= 4.465 minutos, VR= 7.024 minutos; $P=0.002$), 6 (VT= 5.035 minutos, VR= 8.327 minutos; $P<0.001$), 7 (VT= 5.076 minutos, VR=

8.928 minutos; $P < 0.001$), 8(VT= 5.014 minutos, VR= 8.193 minutos; $P < 0.001$) y 9(VT= 4.924 minutos, VR= 8.065 minutos; $P < 0.001$) entre el grupo VT y VR, y el resto de los días no mostraron diferencias entre los grupos ($P > 0.05$), posterior a la segunda aplicación de PGF2 α . El grupo VR muestra una tendencia de ser más activas en comparación al grupo VT después de la segunda aplicación de PGF2 α (Figura 6). Los registros de alta actividad muestran una diferencia estadísticamente significativa al día 3 (VT= 8.028 minutos, VR= 15.09 minutos; $P < 0.001$) entre el grupo VT y VR, el resto de los días no mostraron diferencias entre los grupos posterior a la segunda aplicación de PGF2 α ($P > 0.05$) (Figura 7).

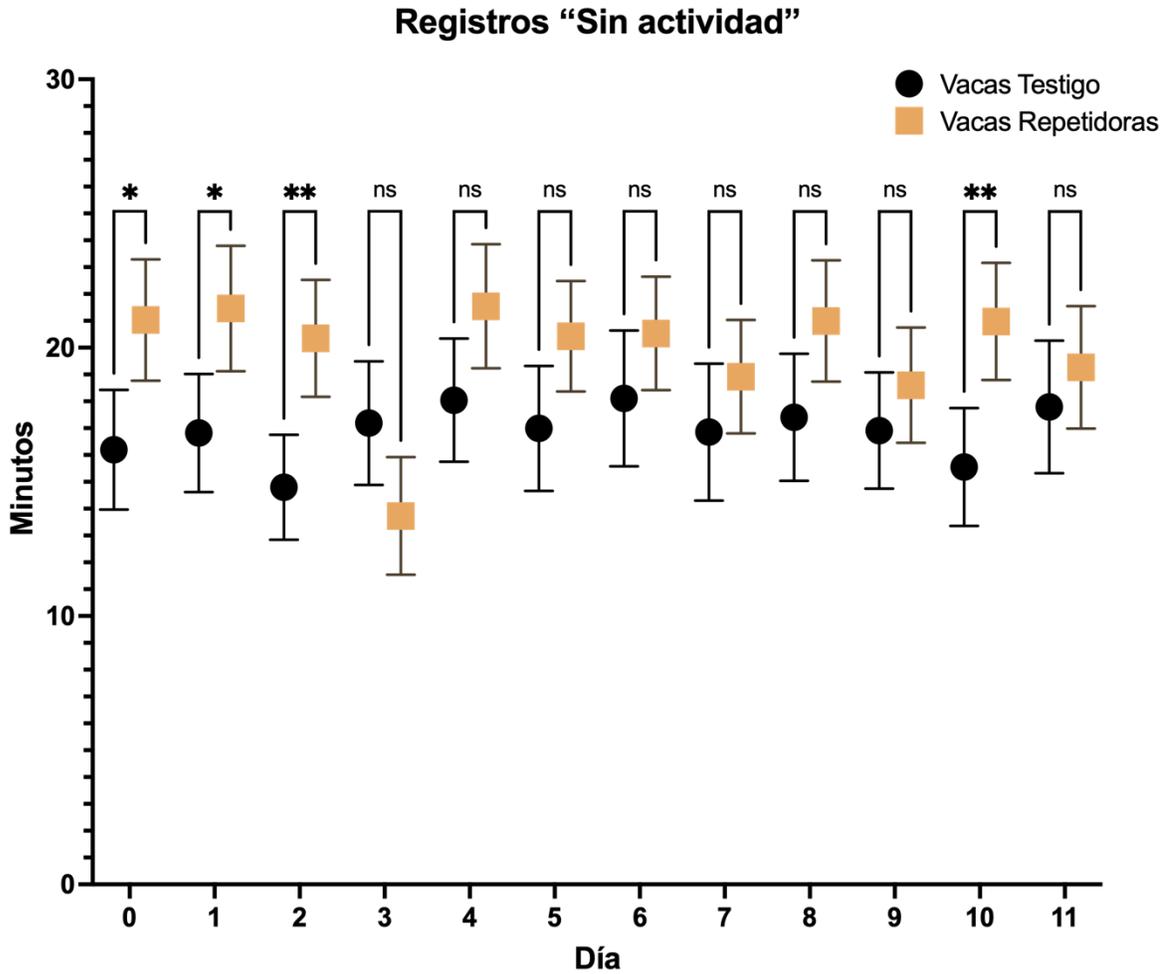


Figura 3. Comparación entre vacas normales y repetidoras considerando la media e intervalo de confianza 95% de minutos sin registro de actividad/hora por día después de la aplicación de PGF2A (día 0). Las diferencias significativas se expresan como $P > 0.05$ (ns), $P < 0.05$ (*), $P < 0.002$ (**), $P < 0.001$ (***)

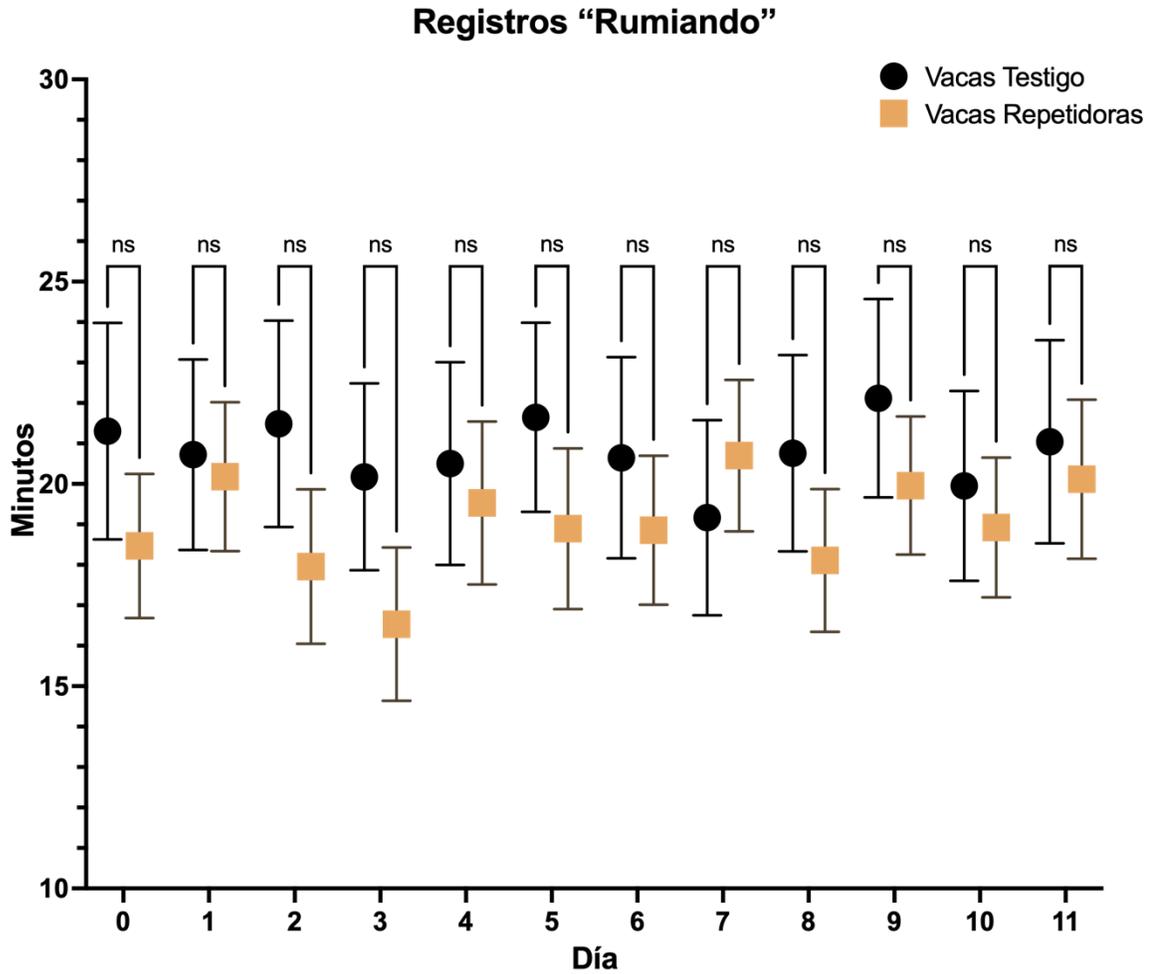


Figura 4. Comparación entre vacas normales y repetidoras considerando la media e intervalo de confianza 95% de minutos de rumia/hora por día después de la aplicación de PGF2A (día 0). Las diferencias significativas se expresan como $P > 0.05$ (ns), $P < 0.05$ (*), $P < 0.002$ (**), $P < 0.001$ (***)

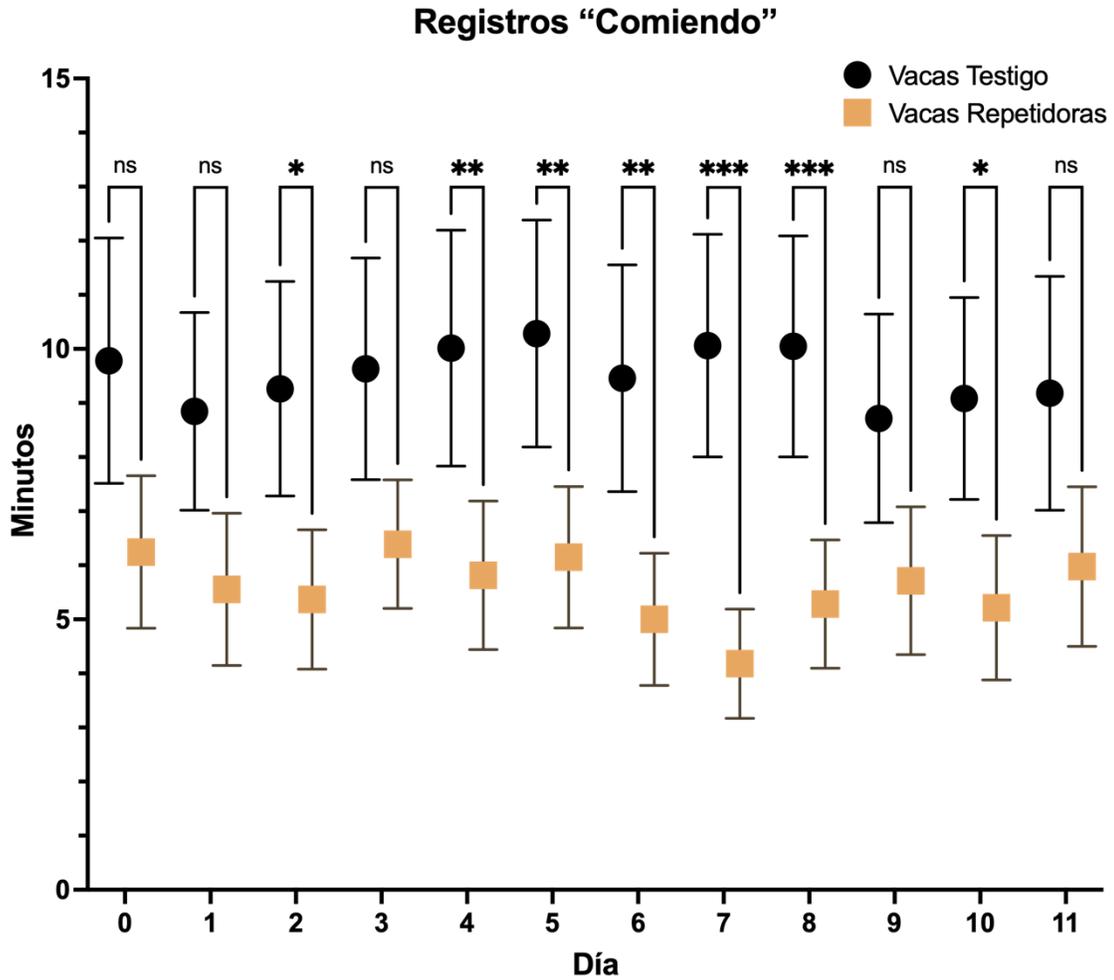


Figura 5. Comparación entre vacas normales y repetidoras considerando la media e intervalo de confianza 95% de minutos de alimentación/hora por día después de la aplicación de PGF2A (día 0). Las diferencias significativas se expresan como $P > 0.05$ (ns), $P < 0.05$ (*), $P < 0.002$ (**), $P < 0.001$ (***)

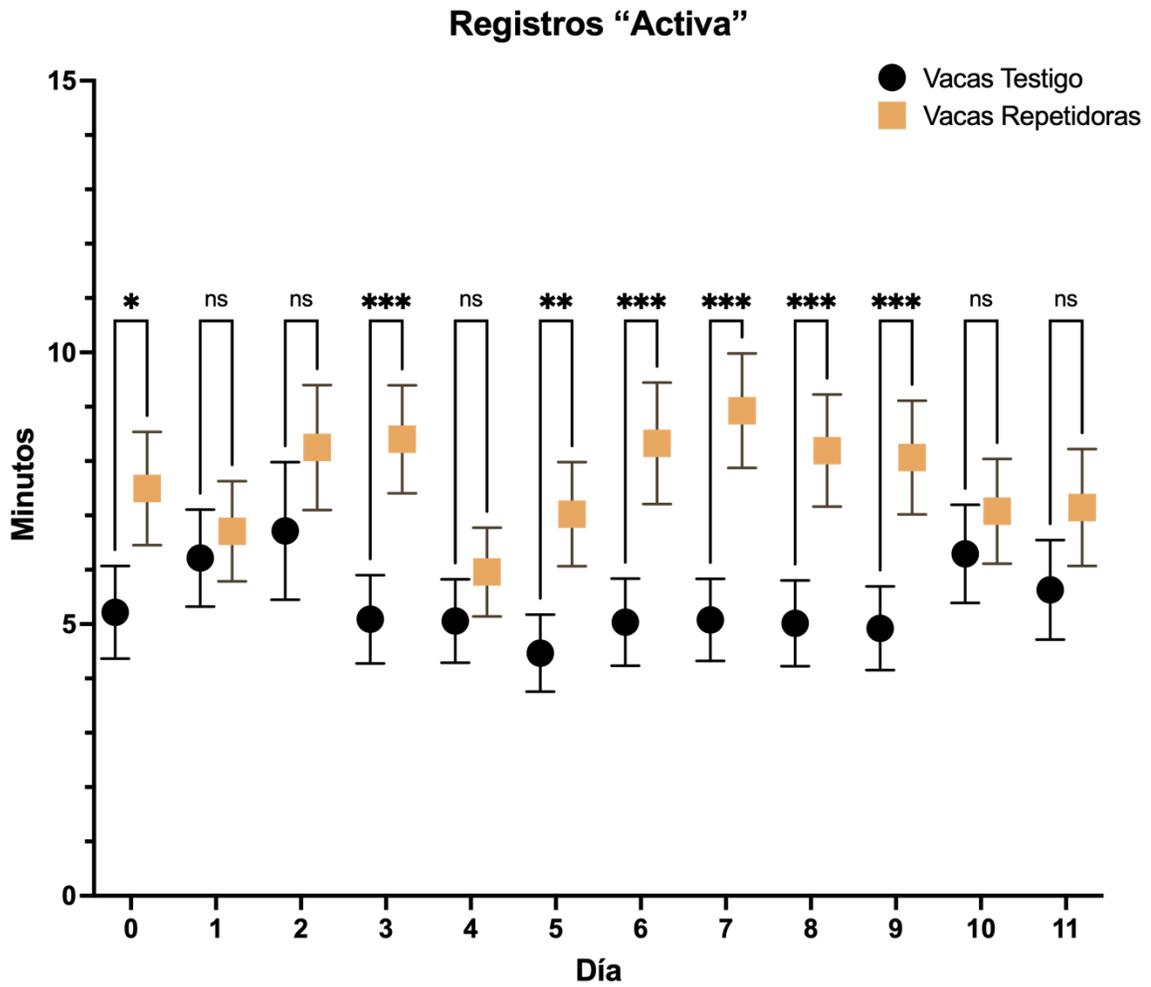


Figura 6. Comparación entre vacas normales y repetidoras considerando la media e intervalo de confianza 95% de minutos de actividad/hora por día después de la aplicación de PGF2A (día 0). Las diferencias significativas se expresan como $P > 0.05$ (ns), $P < 0.05$ (*), $P < 0.002$ (**), $P < 0.001$ (***).

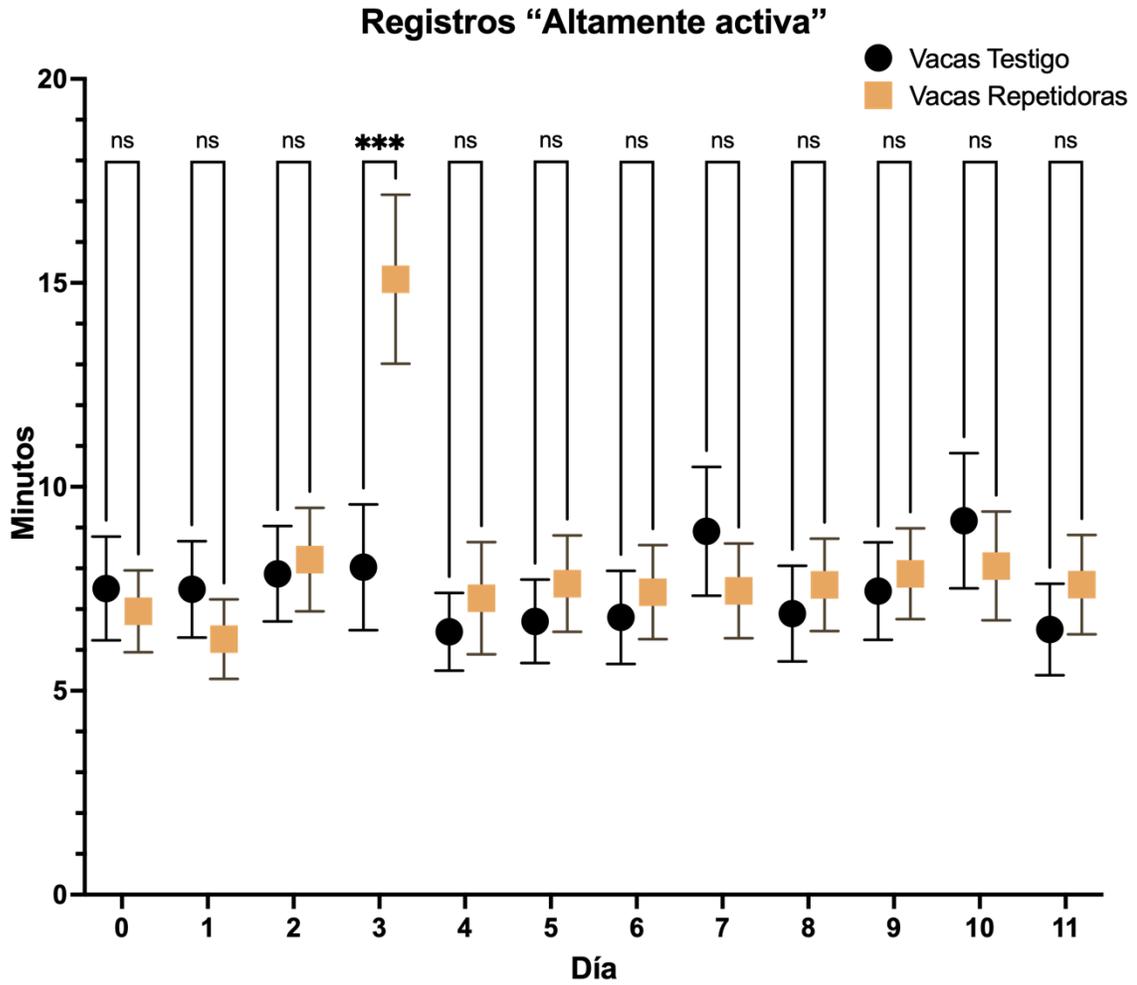


Figura 7. Comparación entre vacas normales y repetidoras considerando la media e intervalo de confianza 95% de minutos de alta actividad/hora por día después de la aplicación de PGF2A (día 0). Las diferencias significativas se expresan como $P > 0.05$ (ns), $P < 0.05$ (*), $P < 0.002$ (**), $P < 0.001$ (***)

6.3. Caracterización de los sitios APA en vacas de ambos grupos

Un total de 6 librerías (VT, 1 para la fase folicular y 1 para la fase lútea; VR, 3 en la fase folicular y 1 en la fase lútea) produjo 141,671 sitios APA que se expresaron en células endometriales cubriendo al menos 6 lecturas. De los sitios APA únicamente 94,562 fueron asignados a genes anotados en el genoma bovino. El biotipo del gen tuvo efectos significativos ($R^2= 0.115$, $P<0.0001$) en el uso de sitios APA. El 83.86% (14,563/17,365) en codificantes de proteínas, 73.06% (2,384/3,263) en ARNInc, 36.91% (547/1,482) en pseudogenes, 29.41% (10/34) en ARNmi, 71.87% (23/32) en ARNt utilizaron más de un sitio de poliadenilación alternativa (Figura 8).

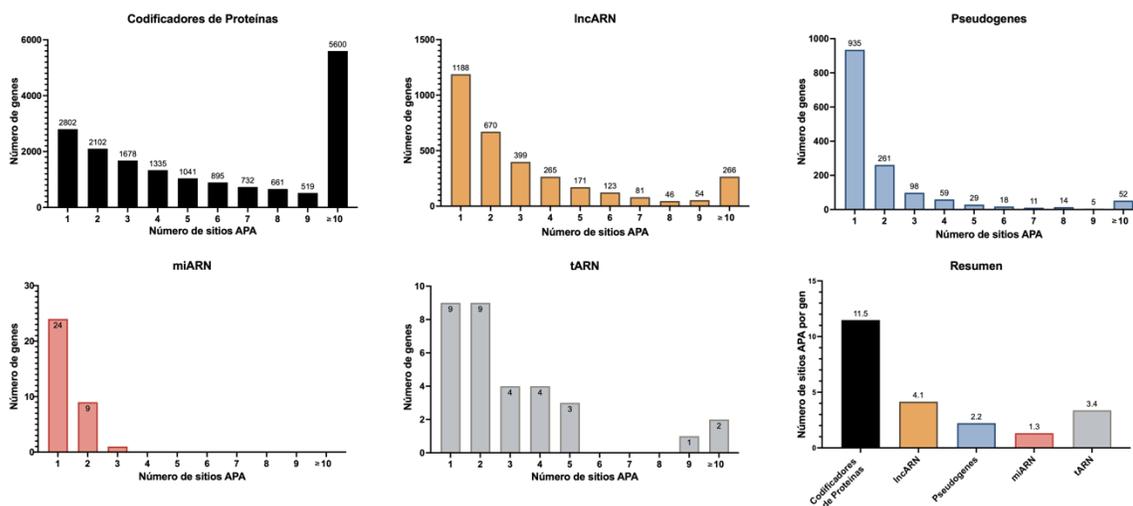


Figura 8. Caracterización de sitios APA en el endometrio de vacas normales y repetidoras organizada por biotipo.

Las distancias entre el transcriptoma de vacas testigo y de vacas repetidoras se muestran en la Figura 9. De acuerdo con el análisis de componentes principales

(PCA), las VT no difieren de las vacas repetidoras en la fase folicular. Sin embargo, las vacas repetidoras se desvían de la tendencia de progresión de las vacas normales en la fase lútea.

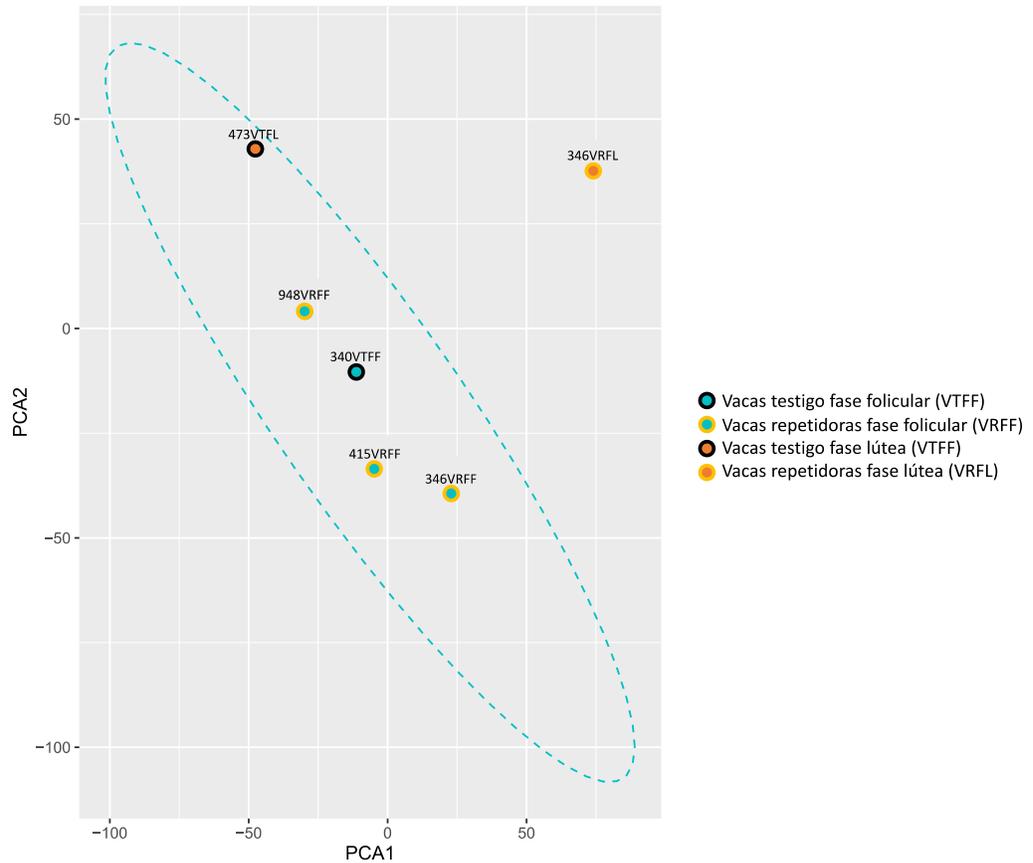


Figura 9. Distancias entre el transcriptoma de vacas testigo (VT) contra vacas repetidoras (VR) en la fase folicular (FF) y la fase lútea (FL) del ciclo estral. La posición de cada punto representa la variación dentro de una matriz de correlación de la expresión de los principales 10,000 sitios APA dentro del primer componente principal (PCA1) y el segundo componente principal (PCA2).

6.4. Sitios APA expresados diferencialmente entre las vacas testigo y las vacas repetidoras

El análisis DESeq2 (adjusted $P < 0.01$, \log_2 fold change $> |1|$) reveló 28,633 sitios APA expresados diferencialmente entre el grupo VT y el grupo VR de los cuales 11,829 estuvieron sobrerregulados y 16,804 estuvieron subregulados para la fase folicular (Figura 10; Panel A); y 20,675 sitios APA expresados diferencialmente entre el grupo VT y VR de los cuales 8,067 estuvieron sobrerregulados y 12,608 estuvieron subregulados para la fase lútea (Figura 10; Panel B). Los principales genes expresados diferencialmente entre el grupo VT y VR se muestran en el Cuadro 1 para la fase folicular y en el Cuadro 2 para la fase lútea de acuerdo con el logaritmo de fold change (logFC).

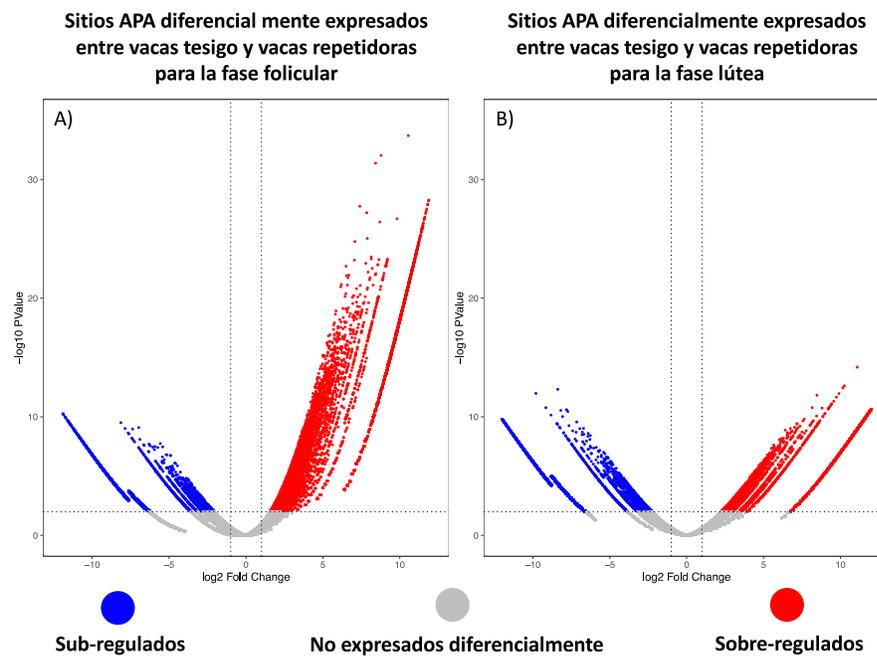


Figura 10. Sitios APA expresados diferencialmente en las células endometriales de vacas repetidoras al compararlos con los de las vacas testigo. A) Comparación entre el grupo VT y grupo VR para la fase folicular. B) Comparación entre el grupo VT y el grupo VR para la fase lútea. Sitios APA sobre-regulados (puntos rojos), sub-regulados (puntos azules) y no expresados diferencialmente (puntos grises).

Cuadro 1. Los 10 principales genes diferencialmente expresados en la fase folicular entre vacas testigo y vacas repetidoras.

Gen	Regulación	logFC	PValue
CGREF1	subregulado	-13.88795936	1.11913E-14
TFF1	subregulado	-13.38243824	9.88154E-14
TMED3	subregulado	-13.0064819	4.97605E-13
CHAD	subregulado	-12.51700894	4.06099E-12
ZNF10	subregulado	-12.3419219	8.58062E-12
ALOX15B	sobrerregulado	13.11650642	7.111E-36
HP	sobrerregulado	12.7879107	6.238E-44
SDS	sobrerregulado	12.0891194	3.78414E-30
DGKH	sobrerregulado	12.03239017	7.94896E-30
CXCR2	sobrerregulado	11.87075	6.20895E-29

Cuadro 2. Los 10 principales genes diferencialmente expresados en la fase lútea entre vacas testigo y vacas repetidoras.

Gen	Regulación	logFC	PValue
CRIM1	subregulado	-15.22750313	1.5086E-16
CAVIN3	subregulado	-14.47680948	3.85594E-15
CYSRT1	subregulado	-13.94973554	3.73398E-14
C18H19orf33	subregulado	-13.88769661	4.88555E-14
CGREF1	subregulado	-13.82823568	6.30768E-14
FOXS1	sobrerregulado	14.86055355	1.02333E-16
M-SAA3.2	sobrerregulado	13.80423188	9.80628E-15
ZBTB47	sobrerregulado	13.54653278	2.96943E-14
ID1	sobrerregulado	13.52025035	3.33357E-14
JUN	sobrerregulado	13.47687275	4.01852E-14

6.5. Ontología génica análisis usando los genes expresados diferencialmente entre las vacas testigo y las vacas repetidoras

Basado en el enriquecimiento de ontología génica, los DEG entre el grupo VT y el grupo VR de la fase folicular, se enriquecieron en 151 términos en la categoría BP, 41 en la categoría CC y 25 en la categoría MF. Los DEG entre el grupo VT y el grupo VR durante la fase lútea, se enriquecieron en 203 términos en la categoría BP, 69 en la categoría CC y 46 en la categoría MF. Los 10 términos principales enriquecidos en la ontología génica para cada categoría durante la fase folicular se muestran en la Figura 11 y el Cuadro 3; y para la fase lútea en la Figura 12 y el Cuadro 4.

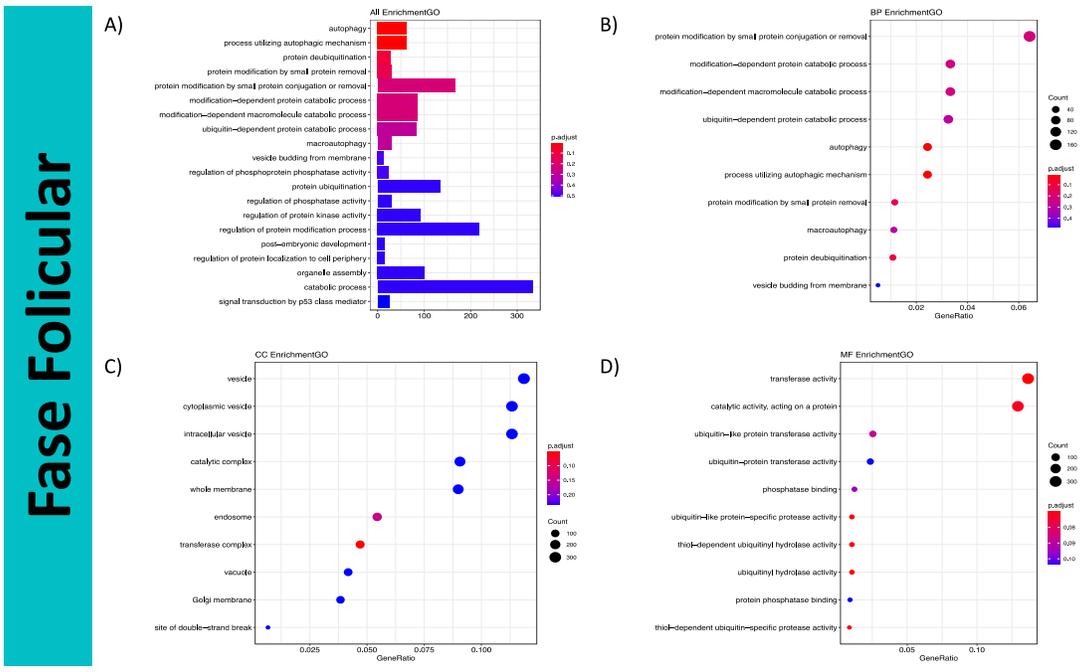


Figura 11. Principales términos enriquecidos en la ontología para los genes expresados diferencialmente en la ontología para los genes expresados diferencialmente en la fase folicular entre vacas testigo y vacas repetidoras. A) Todos los términos considerando el número de genes involucrados. B) Procesos biológicos (BP). C) Componentes celulares (CC). D) Función molecular (MF). Todos los paneles consideran una p-ajustada < 0.05 y se clasifican de acuerdo con su significancia.

Cuadro 3. Principales términos enriquecidos para los genes expresados diferencialmente en procesos biológicos (BP), componentes celulares (CC), y función molecular (MF) durante la fase folicular entre vacas testigo y vacas repetidoras.

Ontología	ID	Descripción	GeneRatio	pvalue	Conteo
BP	GO:0006914	Autofagia	63/2584	1.07E-05	63
BP	GO:0061919	Proceso que utiliza el mecanismo autofágico	63/2584	1.07E-05	63
BP	GO:0016579	Desubiquitinación de proteínas	28/2584	0.00010837	28
BP	GO:0070646	Modificación de proteínas mediante eliminación de proteínas pequeñas	30/2584	0.000208377	30
BP	GO:0070647	Modificación de proteínas mediante conjugación o eliminación de proteínas pequeñas	166/2584	0.000447708	166
BP	GO:0019941	Proceso catabólico de proteínas dependiente de la modificación	86/2584	0.000593784	86
BP	GO:0043632	Proceso catabólico de macromoléculas dependiente de la modificación	86/2584	0.000593784	86
BP	GO:0006511	Proceso catabólico de proteínas dependiente de la ubiquitina	84/2584	0.000934522	84
BP	GO:0016236	Macroautofagia	29/2584	0.001028136	29
BP	GO:0006900	Formación de vesículas a partir de una membrana	13/2584	0.002025862	13
CC	GO:1990234	Complejo de transferasas	126/2682	0.000132986	126
CC	GO:0005768	Endosoma	146/2682	0.000694704	146
CC	GO:1902494	Complejo catalítico	243/2682	0.002958881	243

CC	GO:0031410	Vesícula citoplasmática	304/2682	0.003466321	304
CC	GO:0097708	Vesícula intracelular	304/2682	0.003466321	304
CC	GO:0031982	Vesícula	318/2682	0.004234197	318
CC	GO:0098805	Toda la membrana	241/2682	0.004734188	241
CC	GO:0035861	Sitio de rotura de doble cadena	18/2682	0.004806802	18
CC	GO:0000139	Membrana del Golgi	103/2682	0.005499581	103
CC	GO:0005773	Vacuola	112/2682	0.006187427	112
MF	GO:0016740	Actividad de transferasa	300/2197	0.000716056	300
MF	GO:0019783	Actividad de proteasa específica de proteínas tipo ubiquitina	23/2197	0.000759284	23
MF	GO:0036459	Actividad de hidrolasa ubiquitinilo dependiente de tiol	23/2197	0.000759284	23
MF	GO:0101005	Actividad de hidrolasa ubiquitinilo	23/2197	0.000759284	23
MF	GO:0004843	Actividad de proteasa específica de ubiquitina dependiente de tiol	19/2197	0.000864807	19
MF	GO:0140096	Actividad catalítica, actuando sobre una proteína	284/2197	0.001072496	284
MF	GO:0019787	Actividad de transferasa específica de proteínas tipo ubiquitina	56/2197	0.001503582	56
MF	GO:0019902	Unión a fosfatasa	27/2197	0.001883222	27
MF	GO:0004842	Actividad de transferasa proteína-ubiquitina	52/2197	0.00231264	52
MF	GO:0019903	Unión a fosfatasa de proteínas	20/2197	0.002545975	20
MF	GO:0140030	Unión de proteínas dependiente de la modificación	22/2197	0.00393443	22

Fase Lútea

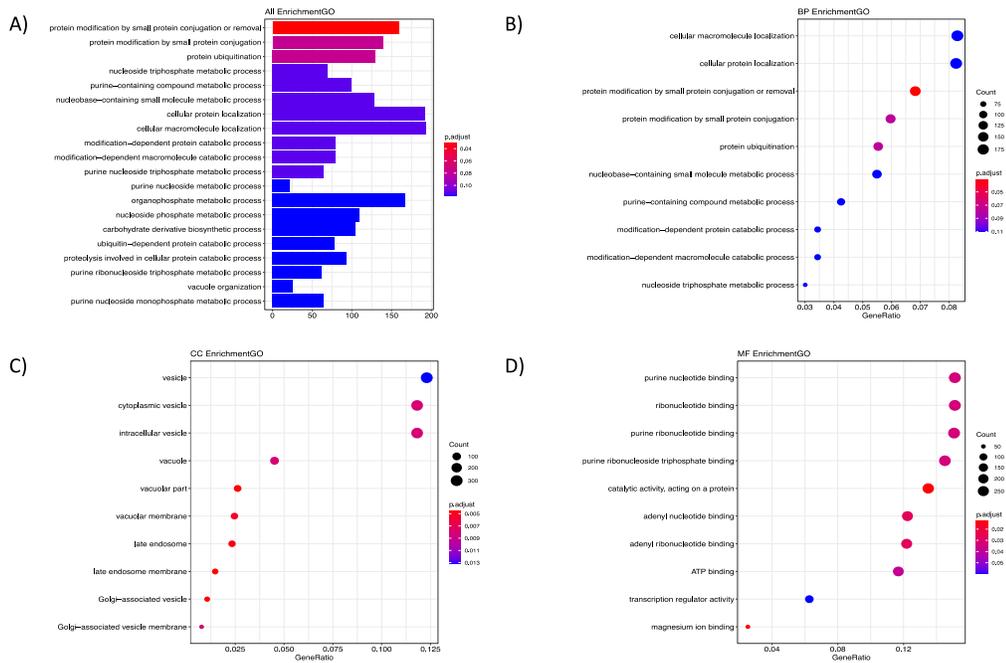


Figura 12. Principales términos enriquecidos en la ontología para los genes expresados diferencialmente en la fase lútea entre vacas testigo y vacas repetidoras. A) Todos los términos considerando el número de genes involucrados. B) Procesos biológicos (BP). C) Componentes celulares (CC). D) Función molecular (MF). Todos los paneles consideran una p-ajustada < 0.05 y se clasifican de acuerdo con su significancia.

Cuadro 4. Principales términos enriquecidos para los genes expresados diferencialmente en procesos biológicos (BP), componentes celulares (CC), y función molecular (MF) en la fase lútea entre vacas testigo y vacas repetidoras.

Ontología	ID	Descripción	GeneRatio	pvalue	Conteo
BP	GO:0070647	Modificación de proteínas mediante conjugación o eliminación de proteínas pequeñas	159/2328	1.22E-05	159
BP	GO:0032446	Modificación de proteínas mediante conjugación de proteínas pequeñas	139/2328	6.00E-05	139
BP	GO:0016567	Ubiquitinación de proteínas	129/2328	9.00E-05	129
BP	GO:0009141	Proceso metabólico de nucleótidos trifosfato de nucleósidos	70/2328	0.000237424	70
BP	GO:0072521	Proceso metabólico de compuestos que contienen purina	99/2328	0.000293217	99
BP	GO:0055086	Proceso metabólico de moléculas pequeñas que contienen nucleobases	128/2328	0.000342791	128
BP	GO:0034613	Localización de proteínas celulares	192/2328	0.000347509	192
BP	GO:0070727	Localización de macromoléculas celulares	193/2328	0.000381691	193
BP	GO:0019941	Proceso catabólico de proteínas dependiente de la modificación	80/2328	0.00047254	80
BP	GO:0043632	Proceso catabólico de macromoléculas dependiente de la modificación	80/2328	0.00047254	80
CC	GO:0005798	Vesícula asociada al Golgi	26/2438	1.85E-05	26
CC	GO:0031902	Membrana de endosoma tardío	36/2438	3.12E-05	36
CC	GO:0044437	Parte vacuolar	64/2438	3.35E-05	64
CC	GO:0005770	Endosoma tardío	57/2438	4.76E-05	57
CC	GO:0005774	Membrana vacuolar	60/2438	6.71E-05	60
CC	GO:0030660	Membrana de vesícula asociada al Golgi	19/2438	0.000132641	19
CC	GO:0005773	Vacuola	110/2438	0.000171628	110

CC	GO:0031410	Vesícula citoplasmática	288/2438	0.00017740 8	288
CC	GO:0097708	Vesícula intracelular	288/2438	0.00017740 8	288
CC	GO:0031982	Vesícula	300/2438	0.00031998 4	300
MF	GO:0140096	Actividad catalítica, actuando sobre una proteína	267/1977	4.74E-05	267
MF	GO:0000287	Unión de iones de magnesio	50/1977	6.31E-05	50
MF	GO:0030554	Unión de nucleótidos adenilato	242/1977	0.00022359 4	242
MF	GO:0032559	Unión de ribonucleótidos adenilato	241/1977	0.00026495 2	241
MF	GO:0017076	Unión de nucleótidos de purina	299/1977	0.00048007 4	299
MF	GO:0032555	Unión de ribonucleótidos de purina	298/1977	0.00055635 1	298
MF	GO:0032553	Unión de ribonucleótidos	299/1977	0.00059098 7	299
MF	GO:0035639	Unión de trifosfato de ribonucleósidos de purina	287/1977	0.00065362 1	287
MF	GO:0005524	Unión de ATP	231/1977	0.00084544 6	231
MF	GO:0140110	Actividad de regulación de la transcripción	124/1977	0.00146544 3	124

VII. Discusión

La vaca repetidora Holstein se ha evaluado para diferentes factores relacionados con la subfertilidad que presentan estos animales en granjas comerciales (Lafi *et al.*, 1992; Lafi y Kaneene, 1992). En este estudio se comparó vacas fértiles posparto después del periodo de espera voluntario con vacas repetidoras. Ambos grupos no presentaron diferencias en cuanto al tamaño de folículos dominantes y cuerpos lúteos posterior a la aplicación de PGF2 α . Como era de esperarse, los resultados están en acorde con el estudio realizado por Gustafsson y Emanuelson (2002), que demuestran que las vacas repetidoras no presentan problemas en las estructuras ováricas en comparación con sus pares de mayor fertilidad. Sin embargo, diversos autores encontraron que la baja fertilidad de las vacas repetidoras puede estar asociada a un retardo en el reinicio de la actividad ovárica posparto (Yusuf *et al.* 2010) o con factores como historial de distocias, placentas retenidas o infecciones uterinas como la endometritis subclínica (Bonneville-Hébert *et al.*, 2010; Salasel *et al.*, 2010; LeBlanc, 2012). En el presente estudio, las vacas repetidoras no tenían registros de enfermedades en el posparto, y se evaluaron un año después de que se consideraran vacas no candidatas para la reproducción, esto es, con la finalidad de reducir el error que suponen los factores mencionados anteriormente.

En cuanto al porcentaje de presencia de estros, la proporción de vacas que mostraron celo no difirió entre vacas posparto y las vacas repetidoras después de la aplicación de PGF2 α . Estudios diversos han asociado a la vaca posparto con una baja expresión de celos o problemas en su detección (Palmer *et al.*, 2010; Bordchart *et al.*, 2021; Madureira *et al.*, 2022). No obstante, esta situación no explica

completamente que una vaca no se geste después de diversas inseminaciones, cuando se cuenta con las mismas condiciones de manejo y se apoya de sistemas electrónicos de monitoreo reproductivo.

Los registros del tiempo en movimiento de las vacas experimentales, presentaron diferencias entre ambos grupos al compararlos después de la aplicación de PGF2 α . Las vacas repetidoras presentaron una tendencia en registrar mayor tiempo en ausencia de actividad cuando se comparó con las vacas posparto. Estudios demuestran que una vaca abierta suele moverse menos a medida que avanza la lactancia (Stevenson *et al.*, 2020; Piñeiro *et al.*, 2019). Los registros del tiempo en rumia no mostraron diferencias entre los grupos, sin embargo, diversos estudios han demostrado que las diferencias en su registro se pueden deberse a síndromes metabólicos o digestivos (Stangaferro *et al.*, 2016a) o enfermedades clínicas de mastitis o metritis (Stangaferro *et al.*, 2016b; Stangaferro *et al.*, 2016c). Ninguna de estas situaciones estuvo presente en los animales estudiados. Las vacas posparto registraron mayor tiempo comiendo que las vacas repetidoras. Lo anterior coincide con el aumento en el consumo de alimento ocasionado por el incremento en la demanda energética en las vacas posparto (Stevenson *et al.*, 2020). Los registros del tiempo en actividad muestran un aumento en movimiento de las vacas testigo al compararlas con las vacas repetidoras. Estas diferencias podrían estar relacionadas con la tendencia observada de las vacas posparto, por pasar mayor tiempo alimentándose. De hecho, se han reportado diferencias en la actividad de vacas posparto de acuerdo con la progresión de la lactancia (Stevenson *et al.*, 2020). Los registros del tiempo en alta actividad presentaron diferencias entre las vacas

repetidoras y las vacas posparto, demostrando que estas últimas presentan sus primeros celos de forma silenciosa y por ende con menor actividad (Palmer *et al.*, 2010; Shinpka, 2000).

En cuanto a la información genética, la proporción de biotipos con sitios APA expresados diferencialmente fue mayor para los genes codificantes de proteínas, seguido de ARNinc, ARNt, pseudogenes y ARNmi. En el estudio realizado por Stotts *et al.* (2022) utilizando WTTS-Seq para evaluar el transcriptoma de vacas Holstein posparto sanas y con diferentes grados de enfermedad uterina, se observó una distribución similar en el uso de sitios APA de acuerdo con el biotipo de los genes expresados diferencialmente. Durante la planeación de este estudio, se especuló que la fase folicular sería diferente y por ende también la fase lútea, pues se ha demostrado que la exposición al estradiol durante el proestro es crítica para la preparación del endometrio previo a la implantación (Jinks *et al.*, 2013; Perry *et al.*, 2020). El análisis de componentes principales nos muestra que la expresión de genes del endometrio mantiene mayor similitud entre los grupos para las muestras tomadas durante la fase folicular y menor similitud en aquellas durante la fase lútea. Bauersachs *et al.* (2005) evaluaron los cambios en la expresión genética del endometrio durante el ciclo estral, encontrando que la fase folicular, está caracterizada por una mayor expresión de genes relacionados con la remodelación de la matriz extra celular, indicando cambios en la composición del tejido conectivo y genes reguladores de la proliferación. Por otra parte, durante el diestro estos investigadores, encontraron transcritos de diferentes enzimas y proteínas sobrerregulados involucrados en procesos de transporte celular como son los canales

iónicos. La vía de señalización que identificaron con mayor prominencia en endometrio, durante el estro y el diestro, fue aquella asociada al factor de crecimiento transformante beta (TGFB), con ella demuestran la transición del estadio proliferativo pues los genes que inhiben esta vía se encontraban sobrerregulados, en contraste con la fase secretora donde solo 3 de estos genes permanecieron sobrerregulados.

En el presente estudio, los genes expresados diferencialmente entre las vacas testigo y las vacas repetidoras fueron 11,057 en la fase folicular y 9,673 en la fase lútea. Al analizar la fase folicular, los principales genes expresados diferencialmente en las vacas repetidoras de este estudio fueron CGREF1 (Cell growth regulator with EF-hand domain 1), TFF1 (Trefoil factor-1), TMED3 (Transmembrane p24 trafficking protein 3), CHAD (Chondoadherin), ZNF10 (Zinc finger protein 10) subregulados, y ALOX15B (Arachidonate 15-lipoxygenase type B), HP (Haptoglobina), SDS (Serine Dehydratase), DGKH (Diacylglycerol kinase eta), CXCR2 (C-X-C Motif Chemokine Receptor 2) sobrerregulados. Lédée *et al.*, 2011 identificaron el gen CGREF1 subregulado en muestras de mujeres con aborto espontáneo y problemas repetidos de implantación. Sin embargo, estas muestras fueron tomadas en la mitad de la fase lútea. El gen TFF1 se ha identificado como responsivo a 17b-E2 en el endometrio humano (Punyadeera *et al.*, 2005), este gen codifica péptidos asociados a mucina que han sido implicados en la regeneración de la mucosa después de sufrir daño (Salamonsen *et al.*, 2003). El gen TMED3 codifica para una proteína relacionada directamente con el transporte y metabolismo de proteínas (Jerome-Majewska *et al.*, 2010). Zhang y Qi (2022) estudiaron la remoción de este gen en el carcinoma

endometrial y encontraron que su delección disminuye el crecimiento y la progresión, reafirmando las capacidades proliferativas de esta molécula. El gen CHAD codifica para una proteína del mismo nombre capaz de afectar el metabolismo y la homeostasis de la matriz extracelular (Haglund *et al.*, 2013). El gen ZNF10 se ha demostrado que se subregula en presencia de estrógenos (Chang *et al.*, 2010). La subregulación de estos genes en las vacas repetidoras, podría estar relacionado a que el contraste se realizó con vacas que tuvieron un parto reciente. Es interesante notar que estos genes se encontraron subregulados en las vacas repetidoras lo que podríamos traspolar a una deficiente preparación del endometrio previo a la fase lútea.

Entre los genes sobrerregulados en las vacas repetidoras durante la fase folicular, en otras especies como el humano se ha reportado que el gen ALOX15B, se encuentra incrementado en mujeres con endometriosis y su desregulación se ha especulado pueda ser causante de subfertilidad e infertilidad (Mesen *et al.*, 2013). En vacas y novillas gestantes, el ALOX15B se encuentra subregulado (Moraes *et al.*, 2018; Sponchiado *et al.*, 2019). Estas discrepancias pueden deberse a diferencias fisiológicas en los diferentes estadios de las diversas fases de el ciclo estral y la gestación. En el presente estudio, en las vacas repetidoras, el gen que codifica para HP se encontró sobrerregulado. La haptoglobina, al ser una proteína de la fase aguda se ha descrito en vacas que incrementa en los primeros días posparto y disminuye a medida que avanza la involución uterina (Gabler *et al.*, 2010). Adicionalmente, el gen que codifica para CXCR2, responsable de la regulación de procesos inflamatorios y presente en el tejido endometrial en vacas

(Peter *et al.*, 2018). Ambos genes, se encontraron sobrerregulados en las vacas repetidoras durante el presente estudio, lo podrían sugerir procesos inflamatorios en el tejido endometrial.

Al analizar la fase lútea, los principales genes expresados diferencialmente en las vacas repetidoras de este estudio fueron CRIM1 (Cysteine Rich Transmembrane BMP Regulator 1), CAVIN3 (Caveolae-associated protein 3), CYSRT1 (Cysteine rich tail 1), C18H19orf33, CGREF1 (Cell growth regulator with EF-hand domain 1) subregulados, y FOXS1 (Forkhead box S1), M-SAA3.2 (Mammary serum amyloid A3.2), ZBTB47 (Zinc finger and BTB domain containing 47), ID1 (Inhibitor of DNA binding 1), JUN sobrerregulados. En cabras, se ha comprobado que el CRIM1 es indispensable para desarrollar receptividad endometrial, involucrada en procesos proliferativos, de adhesión y de angiogénesis (Yang *et al.*, 2021). Estos eventos están altamente relacionados con la autofagia mediada por estrógenos, progesterona e interferón- τ (Wang *et al.*, 2023). En el caso de las vacas repetidoras, este gen se encontró subregulado lo que podría sugerir que los mecanismos para lograr la receptividad endometrial se encuentren alterados en estos animales. Al igual que en la fase folicular, el CGREF1 se encontró subregulado para la fase lútea, lo cual se puede comparar a lo observado por Lédée *et al.* (2011) en mujeres con muertes embrionarias recurrentes. En las vacas repetidoras el gen FOXS1 se encontró sobrerregulado. Kusama *et al.* (2017), sugieren que el gen FOXS1 podría desempeñar un papel como regulador de retroalimentación negativa, de la señalización de interferón- τ en las células epiteliales del endometrio bovino. Crookenden *et al.* (2023) reportó una sobrerregulación del gen M-SAA3.2 en células

endometriales de bovino en condiciones de inflamación *in vitro*. Al estar sobrerregulado, en las vacas repetidoras, se podría sugerir que hay procesos inflamatorios en el tejido endometrial en ambas fases. En el estudio realizado por Pabona *et al.* (2012), el gen ZBTB47 se muestra subregulado en células endometriales obtenidas de mujeres con y sin diagnóstico de endometriosis que presentan delección para el receptor de progesterona y el Krüppel-like factor 9 (KLF9), demuestra que este gen, es responsivo a la concentración de progesterona. El gen ID1 pertenece a la familia de las proteínas inhibidoras de ADN y su función es inhibir las funciones de Factores de Transcripción con Motivo Hélice-Asa-Hélice Básico que se encargan de percibir señales ambientales y regular el ciclo celular, el ritmo circadiano y diversos procesos de desarrollo. En las vacas repetidoras, este gen se encontró sobrerregulado en la fase de diestro. Han *et al.* (2018), prueban que la expresión de proteínas ID en el endometrio de cerdas, es mayor durante el estro y sus niveles disminuyen considerablemente durante el diestro, sugiriendo su acción durante la etapa proliferativa en la fase folicular y su posible relación el mantenimiento y establecimiento de la gestación. La SERPINA14 antes conocida como UTMP, es secretada por parte de las células del epitelio glandular bovino (Leslie y Hansen, 1991) y parte de la función inmunosupresora de la progesterona se debe a esta molécula (Spence y Bazar, 2002). La SERPINA14 tiene la capacidad de inhibir la función linfocitaria *in vitro*, con esto, permitir la tolerancia inmunológica hacia el embrión (Hansen, 2005). JUN es un gen que codifica para una proteína del mismo nombre y es capaz de actuar como cofactor y a través del receptor de estradiol 1 y factores de crecimiento regular SERPINA14 (Kushner *et al.*, 2000).

Spencer *et al.* (1999) en ovejas ovariectomizadas demuestran que la aplicación exógena de estrógenos y progesterona no estimulan SERPINA14 en comparación con la aplicación única de progesterona, sugiriendo que un requisito para la estimulación de SERPINA14 es la ausencia de receptores para progesterona, que se expresan por acción de los estrógenos. En las vacas repetidoras el gen JUN se encontraba sobrerregulado lo que podría ser debido una diferencia en las concentraciones de progesterona entre los animales.

VIII. Conclusiones

Por lo tanto, se puede concluir que como era de esperarse, no existieron disparidades entre las vacas testigo y las repetidoras en cuanto a sus estructuras ováricas, presencia de signos de estro y, porcentualmente, el número de animales que formaron un Cuerpo lúteo después de la aplicación de PGF2 α . Es interesante que, en el caso de la evaluación de la actividad motriz, de rumia y de alimentación, se encontraron diferencias en su comportamiento, lo cual podemos sugerir que está relacionado con el estado fisiológico de ambos grupos. Por último, el análisis del transcriptoma demuestra que existen similitudes en la composición de los genes expresados en el endometrio durante la fase folicular. Sin embargo, la composición cambia durante la fase lútea entre las vacas testigo y las vacas repetidoras, demostrando que la expresión de genes en estas últimas, presenta una mayor variación en comparación a sus pares de mayor fertilidad que podrían modificar la fisiología del endometrio previo a la implantación, por lo tanto, se requiere mayor investigación sobre los desencadenantes de estas variaciones y su efecto en la receptividad endometrial.

Referencias

1. Ahlman, T., Berglund, B., Rydhmer, L., Strandberg, E. Culling reasons in organic and conventional dairy herds and genotype by environment interaction for longevity. *Journal of Dairy Science*, 2011, 94, 1568-1575.
2. Arai, M., Yoshioka, S., Tasaki, Y., Okuda, K. (2013). Remodeling of bovine endometrium throughout the estrous cycle. *Animal Reproduction Science*, 142, 1-9.
3. Båge, R., Gustafsson H., Larsson, B., Forsberg, M., Rodríguez-Martínez, H. (2002) Repeat breeding in dairy heifers: follicular dynamics and estrous cycle characteristics in relation to sexual hormone patterns. *Theriogenology*, 57, 2257-2269.
4. Bartlett, P. C., Kirk, J. H., Mather, E. C. (1986). Repeated insemination in Michigan Holstein-Friesian cattle: Incidence, descriptive epidemiology and estimated economic impact. *Theriogenology*, 26, 309-322.
5. Bastu, E., Mutlu, M. F., Yasa, C., Dural, O., Aytan, A. N., Celik, C., Yeh, J. (2015). Role of Mucin 1 and Glycodelin A in recurrent implantation failure. *Fertility and Sterility*, 103, 1059-1064.
6. Bauersachs, S., Ulbrich, S. E., Gross, K., Schmidt, S. E. M., Meyer, H. H. D., Einspanier, R., Wolf, E. (2005). Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrous cycle: detection of molecular pathways involved in functional changes. *Journal of Molecular Endocrinology*, 34, 889-908.

7. Bauersachs, S., Ulbrich, S. E., Gross, K., Schmidt, S. E. M., Meyer, H. H. D., Einspanier, R., Wolf, E. (2005). Gene expression profiling of bovine endometrium during the oestrous cycle: detection of molecular pathways involved in functional changes. *Journal of Molecular Endocrinology*, *34*, 889-908.
8. Bauersachs, S., Wolf, E. (2012). Transcriptome analyses of bovine, porcine and equine endometrium during the pre-implantation phase. *Animal Reproduction Science*, *134*, 84-94.
9. Bazer, F. W. (1992). Mediators of maternal recognition of pregnancy in mammals. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *199*, 373-384.
10. Bazer, F. W., Fleming, J. A. G. W., Safe, S. H., Spencer, T. E. (2003). The ovine oxytocin receptor promoter/enhancer region is responsive to estrogen receptor alpha. *Biology of Reproduction*, *68*, 131-131.
11. Bedere, N., Cutullic, E., Delaby, L., Garcia-Launay, F., Disenhaus, C. (2018). Meta-analysis of the relationships between reproduction, milk yield and body condition score in dairy cows. *Livestock Science*, *210*, 73-84.
12. Billhaq, D. H., Lee, S. H., Lee, S. (2020). The potential function of endometrial-secreted factors for endometrium remodeling during the estrous cycle. *Animal Science Journal*, *91*, e13333
13. Bonneville-Hébert, A., Bouchard, E., Tremblay, D. D., Lefebvre, R. (2011). Effect of reproductive disorders and parity on repeat breeder status and

- culling of dairy cows in Quebec. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 75, 147-151.
14. Borchardt, S., Tippenhauer, C. M., Plenio, J. L., Bartel, A., Madureira, A. M. L., Cerri, R. L. A., Heuwieser, W. (2021). Association of estrous expression detected by an automated activity monitoring system within 40 days in milk and reproductive performance of lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 104, 9195-9204.
 15. Borsberry, S., Dobson, H. (1989). Periparturient diseases and their effect on reproductive performance in five dairy herds. *The Veterinary Record*, 124, 217-219.
 16. Bowen, J. A., Bazer, F. W., Burghardt, R. C. (1997). Spatial and temporal analyses of integrin and Muc-1 expression in porcine uterine epithelium and trophectoderm in vitro. *Biology of Reproduction*, 56, 409-415.
 17. Braga Paiano, R., Becker Birgel, D., Harry Birgel Junior, E. (2019). Uterine involution and reproductive performance in dairy cows with metabolic diseases. *Animals*, 9, 93.
 18. Bridges, G. A., Mussard, M. L., Pate, J. L., Ott, T. L., Hansen, T. R., Day, M. L. (2012). Impact of preovulatory estradiol concentrations on conceptus development and uterine gene expression. *Animal Reproduction Science*, 133, 16-26.
 19. Brooks, K., Burns, G., Spencer, T. E. (2014). Conceptus elongation in ruminants: roles of progesterone, prostaglandin, interferon tau and cortisol. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 5, 1-12.

20. Burnett, T. A., Madureira, A. M., Silper, B. F., Fernandes, A. C. C., Cerri, R. L. (2017). Integrating an automated activity monitor into an artificial insemination program and the associated risk factors affecting reproductive performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 100, 5005-5018.
21. Burton, G. J., Watson, A. L., Hempstock, J., Skepper, J. N., Jauniaux, E. (2002). Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87, 2954-2959.
22. Butler, W. R. (2003). Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livestock Production Science*, 83, 211-218.
23. Cai, Z., Guldbrandtsen, B., Lund, M. S., Sahana, G. (2019). Prioritizing candidate genes for fertility in dairy cows using gene-based analysis, functional annotation and differential gene expression. *BMC Genomics*, 20, 1-9.
24. Carson, D. D., Bagchi, I., Dey, S. K., Enders, A. C., Fazleabas, A. T., Lessey, B. A., Yoshinaga, K. (2000). Embryo implantation. *Developmental Biology*, 223, 217-237.
25. Carvalho, M. R., Peñagaricano, F., Santos, J. E. P., DeVries, T. J., McBride, B. W., Ribeiro, E. S. (2019). Long-term effects of postpartum clinical disease on milk production, reproduction, and culling of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102, 11701-11717.

26. Carvalho, P. D., Souza, A. H., Amundson, M. C., Hackbart, K. S., Fuenzalida, M. J., Herlihy, M. M., Wiltbank, M. C. (2014). Relationships between fertility and postpartum changes in body condition and body weight in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, *97*, 3666-3683.
27. Chang, K. C., Wang, Y., Bodine, P. V., Nagpal, S., Komm, B. S. (2010). Gene expression profiling studies of three SERMs and their conjugated estrogen combinations in human breast cancer cells: insights into the unique antagonistic effects of bazedoxifene on conjugated estrogens. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *118*, 117-124.
28. Charpigny, G., Reinaud, P., Tamby, J. P., Créminon, C., Martal, J., Maclouf, J., Guillomot, M. (1997). Expression of cyclooxygenase-1 and-2 in ovine endometrium during the estrous cycle and early pregnancy. *Endocrinology*, *138*, 2163-2171.
29. Chen, C., Spencer, T. E., Bazer, F. W. (2000a). Expression of hepatocyte growth factor and its receptor c-met in the ovine uterus. *Biology of Reproduction*, *62*, 1844-1850.
30. Chen, C., Spencer, T. E., Bazer, F. W. (2000b). Fibroblast Growth Factor-10: A stromal mediator of epithelial function in the ovine uterus. *Biology of Reproduction*, *63*, 959-966.
31. Cheong, S. H., Filho, O. G. S., Absalón-Medina, V. A., Pelton, S. H., Butler, W. R., Gilbert, R. O. (2016). Metabolic and endocrine differences between dairy cows that do or do not ovulate first postpartum dominant follicles. *Biology of Reproduction*, *94*, 18-1.

32. Cochran, S. D., Cole, J. B., Null, D. J., Hansen, P. J. (2013). Discovery of single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with fertility and production traits in Holstein cattle. *BMC Genetics*, *14*, 1-23.
33. Crookenden, M. A., Lake, A. V. R., Burke, C. R., Pratt, J. T., Mitchell, M. D., Phyn, C. V. C., Heiser, A. (2023). Effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the inflammatory response of bovine endometrial epithelial cells in vitro. *Journal of Dairy Science*, *106*, 2651-2666.
34. Dalton, J. C., Nadir, S., Bame, J. H., Noftsinger, M., Nebel, R. L., Saacke, R. G. (2001). Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, *84*, 2413-2418.
35. Dickson, M. J., Piersanti, R. L., Ramirez-Hernandez, R., De Oliveira, E. B., Bishop, J. V., Hansen, T. R., Bromfield, J. J. (2020). Experimentally induced endometritis impairs the developmental capacity of bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, *103*, 508-520.
36. Dobson, H., Walker, S. L., Morris, M. J., Routly, J. E., Smith, R. F. (2008). Why is it getting more difficult to successfully artificially inseminate dairy cows?. *Animal*, *2*, 1104-1111.
37. Dorniak, P., Bazer, F. W., Spencer, T. E. (2011). Prostaglandins regulate conceptus elongation and mediate effects of interferon tau on the ovine uterine endometrium. *Biology of Reproduction*, *84*, 1119-1127.

38. Erdem, H., Guzeloglu, A. (2010). Effect of meloxicam treatment during early pregnancy in Holstein heifers. *Reproduction in Domestic Animals*, 45, 625-628.
39. Esposito, G., Irons, P. C., Webb, E. C., Chapwanya, A. (2014). Interactions between negative energy balance, metabolic diseases, uterine health and immune response in transition dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 144, 60-71.
40. Estrada-Cortés, E., Ortiz, W. G., Chebel, R. C., Jannaman, E. A., Moss, J. I., de Castro, F. C., Hansen, P. J. (2019). Embryo and cow factors affecting pregnancy per embryo transfer for multiple-service, lactating Holstein recipients. *Translational Animal Science*, 3, 60-65.
41. Fails, A. D., Magee, C. (2018). *Anatomy and physiology of farm animals*. John Wiley & Sons. 8th edition
42. Ferguson, J. D., Skidmore, A. (2013). Reproductive performance in a select sample of dairy herds. *Journal of Dairy Science*, 96, 1269-1289.
43. Fetrow, J.; Nordlund, K. V.; Norman, H. D. (2006). Invited review: Culling: Nomenclature, definitions, and recommendations. *Journal of Dairy Science*, 89, 1896-1905.
44. Fischer, C., Drillich, M., Oda, S., Heuwieser, W., Einspanier, R., Gabler, C. (2010). Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis. *Reproduction, Fertility and Development*, 22, 818-829.

45. Fleming, J. A. G., Choi, Y., Johnson, G. A., Spencer, T. E., Bazer, F. W. (2001). Cloning of the ovine estrogen receptor- α promoter and functional regulation by ovine interferon- τ . *Endocrinology*, 142, 2879-2887.
46. Forde, N., Beltman, M. E., Duffy, G. B., Duffy, P., Mehta, J. P., O'gaora, P., Crowe, M. A. (2011). Changes in the endometrial transcriptome during the bovine estrous cycle: effect of low circulating progesterone and consequences for conceptus elongation. *Biology of Reproduction*, 84, 266-278.
47. Forde, N., Beltman, M. E., Lonergan, P., Diskin, M., Roche, J. F., Crowe, M. A. (2011). Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 124, 163-169.
48. Forde, N., Lonergan, P. (2012). Transcriptomic analysis of the bovine endometrium: what is required to establish uterine receptivity to implantation in cattle?. *Journal of Reproduction and Development*, 58, 189-195.
49. Gabler, C., Fischer, C., Drillich, M., Einspanier, R., Heuwieser, W. (2010). Time-dependent mRNA expression of selected pro-inflammatory factors in the endometrium of primiparous cows postpartum. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8, 1-9.
50. Garrett, J. E., Geisert, R. D., Zavy, M. T., Gries, L. K., Wettemann, R. P., Buchanan, D. S. (1988). Effect of exogenous progesterone on prostaglandin F $_{2\alpha}$ release and the interestrus interval in the bovine. *Prostaglandins*, 36, 85-96.

51. Geary, T. W., Smith, M. F., MacNeil, M. D., Day, M. L., Bridges, G. A., Perry, G. A., Madsen, C. A. (2013). Triennial Reproduction Symposium: influence of follicular characteristics at ovulation on early embryonic survival. *Journal of Animal Science*, 91, 3014-3021.
52. Geisert, R. D., Pratt, T. N., Bazer, F. W., Mayes, J. S., Watson, G. H. (1994). Immunocytochemical localization and changes in endometrial progesterin receptor protein during the porcine oestrous cycle and early pregnancy. *Reproduction, Fertility and Development*, 6, 749-760.
53. Ghosh, R. K. (2021). *Essentials of veterinary histology and embryology*. Lolkata, India: Current Conceptions, Inc. 4th edition
54. Gilbert, R. O. (2019). Symposium review: Mechanisms of disruption of fertility by infectious diseases of the reproductive tract. *Journal of Dairy Science*, 102, 3754-3765.
55. Gilbert, R. O.; Shin, S. T.; Guard, C. L.; Erb, H. N.; Frajblat, M. (2005). Prevalence of endometritis and its effects on reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology*, 64, 1879-1888.
56. Gustafsson, H., Emanuelson, U. (2002). Characterisation of the repeat breeding syndrome in Swedish dairy cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 43, 1-11.
57. Han, J., Seo, H., Choi, Y., Lee, C., Kim, M. I., Jeon, Y., Ka, H. (2018). Expression and regulation of inhibitor of DNA binding proteins ID1, ID2, ID3, and ID4 at the maternal-conceptus interface in pigs. *Theriogenology*, 108, 46-55.

58. Hansen, P. J. (2005). Pregnancy-associated immunoregulatory molecules discovered in ruminants and their possible relevance to other species. *Immunology of Gametes and Embryo Implantation*, 88, 109-116.
59. Hayashi, K. G., Hosoe, M., Kizaki, K., Fujii, S., Kanahara, H., Takahashi, T., Sakumoto, R. (2017). Differential gene expression profiling of endometrium during the mid-luteal phase of the estrous cycle between a repeat breeder (RB) and non-RB cows. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 15, 1-18.
60. Hayirli, A., Grummer, R. R., Nordheim, E. V., Crump, P. M. (2002). Animal and dietary factors affecting feed intake during the prefresh transition period in Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 85, 3430-3443.
61. Heidari, M., Kafi, M., Mirzaei, A., Asaadi, A., Mokhtari, A. (2019). Effects of follicular fluid of preovulatory follicles of repeat breeder dairy cows with subclinical endometritis on oocyte developmental competence. *Animal Reproduction Science*, 205, 62-69.
62. Hixon, J. E., Flint, A. P. F. (1987). Effects of a luteolytic dose of oestradiol benzoate on uterine oxytocin receptor concentrations, phosphoinositide turnover and prostaglandin F-2 α secretion in sheep. *Reproduction*, 79, 457-467.
63. Hopper, R. M. (2021). *Bovine Reproduction*. John Wiley & Sons. 1st edition
64. Horlock, A. D., Piersanti, R. L., Ramirez-Hernandez, R., Yu, F., Ma, Z., Jeong, K. C., Sheldon, I. M. (2020). Uterine infection alters the

- transcriptome of the bovine reproductive tract three months later. *Reproduction*, 160, 93-107.
65. Horlock, A. D., Piersanti, R. L., Ramirez-Hernandez, R., Yu, F., Ma, Z., Jeong, K. C., Sheldon, I. M. (2020). Uterine infection alters the transcriptome of the bovine reproductive tract three months later. *Reproduction*, 160, 93-107.
66. Hunter, M. G., Robinson, R. S., Mann, G. E., Webb, R. (2004). Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. *Animal Reproduction Science*, 82, 461-477.
67. Inchaisri, C., Jorritsma, R., Vos, P. L. A. M., Van der Weijden, G. C., Hogeveen, H. (2011). Analysis of the economically optimal voluntary waiting period for first insemination. *Journal of Dairy Science*, 94, 3811-3823.
68. Jaureguiberry, M., Madoz, L. V., Quintana, S., Marín, M., Burucúa, M., Tizzano, M., de la Sota, R. L. (2020). Endometrial expression of key genes related to fertility in repeat breeder and non-repeat breeder cows. *Reproduction in Domestic Animals*, 55, 1660-1664.
69. Jerome-Majewska, L. A., Achkar, T., Luo, L., Lupu, F., Lacy, E. (2010). The trafficking protein Tmed2/p24 β 1 is required for morphogenesis of the mouse embryo and placenta. *Developmental Biology*, 341, 154-166.
70. Jinks, E. M., Smith, M. F., Atkins, J. A., Pohler, K. G., Perry, G. A., MacNeil, M. D., Geary, T. W. (2013). Preovulatory estradiol and the

establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows. *Journal of Animal Science*, 91, 1176-1185.

71. Johnson, G. A., Bazer, F. W., Jaeger, L. A., Ka, H., Garlow, J. E., Pfarrer, C., Burghardt, R. C. (2001). Muc-1, integrin, and osteopontin expression during the implantation cascade in sheep. *Biology of Reproduction*, 65, 820-828.
72. Johnson, G. A., Burghardt, R. C., Bazer, F. W., Spencer, T. E. (2003). Osteopontin: roles in implantation and placentation. *Biology of Reproduction*, 69, 1458-1471.
73. Johnson, G. A., Burghardt, R. C., Joyce, M. M., Spencer, T. E., Bazer, F. W., Gray, C. A., Pfarrer, C. (2003). Osteopontin is synthesized by uterine glands and a 45-kDa cleavage fragment is localized at the uterine-placental interface throughout ovine pregnancy. *Biology of Reproduction*, 69, 92-98.
74. Johnson, G. A., Burghardt, R. C., Spencer, T. E., Newton, G. R., Ott, T. L., Bazer, F. W. (1999). Ovine osteopontin: II. Osteopontin and $\alpha\beta 3$ integrin expression in the uterus and conceptus during the periimplantation period. *Biology of Reproduction*, 61, 892-899.
75. Johnson, G. A., Spencer, T. E., Burghardt, R. C., Bazer, F. W. (1999). Ovine osteopontin: I. Cloning and expression of messenger ribonucleic acid in the uterus during the periimplantation period. *Biology of Reproduction*, 61, 884-891.

76. Johnson, G. A., Spencer, T. E., Burghardt, R. C., Taylor, K. M., Gray, C. A., Bazer, F. W. (2000). Progesterone modulation of osteopontin gene expression in the ovine uterus. *Biology of Reproduction*, 62, 1315-1321.
77. Kasimanickam, R. K., Kasimanickam, V. R. (2021). mRNA Expressions of Candidate Genes in Gestational Day 16 Conceptus and Corresponding Endometrium in Repeat Breeder Dairy Cows with Suboptimal Uterine Environment Following Transfer of Different Quality Day 7 Embryos. *Animals*, 11, 1092.
78. Kasimanickam, R., Kasimanickam, V., Grende, K. (2020). Endometrial expression of various genes (ISGs, PPARs, RXRs and MUC1) on day 16 post-ovulation in repeat breeder cows, with or without subclinical endometritis. *Theriogenology*, 142, 251-259.
79. Katagiri, S., Moriyoshi, M. (2013). Alteration of the endometrial EGF profile as a potential mechanism connecting the alterations in the ovarian steroid hormone profile to embryonic loss in repeat breeders and high-producing cows. *Journal of Reproduction and Development*, 59, 415-420.
80. Katagiri, S., Moriyoshi, M., Yanagawa, Y. (2016). Endometrial epidermal growth factor profile and its abnormalities in dairy cows. *Journal of Reproduction and Development*, 62, 465-470.
81. Katagiri, S., Takahashi, Y. (2004). Changes in EGF concentrations during estrous cycle in bovine endometrium and their alterations in repeat breeder cows. *Theriogenology*, 62, 103-112.

82. Katagiri, S., Takahashi, Y. (2006). Potential relationship between normalization of endometrial epidermal growth factor profile and restoration of fertility in repeat breeder cows. *Animal reproduction science*, 95, 54-66.
83. Kim, S., Choi, Y., Spencer, T. E., Bazer, F. W. (2003). Effects of the estrous cycle, pregnancy and interferon tau on expression of cyclooxygenase two (COX-2) in ovine endometrium. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 1, 1-9.
84. Kimmins, S., MacLaren, L. A. (2001). Oestrous cycle and pregnancy effects on the distribution of oestrogen and progesterone receptors in bovine endometrium. *Placenta*, 22, 742-748.
85. Knight, C. H., Sorensen, A. (2001). Windows in early mammary development: critical or not?. *Reproduction*, 122, 337-345.
86. Kong, B. W., Hudson, N., Seo, D., Lee, S., Khatri, B., Lassiter, K., Bottje, W. (2017). RNA sequencing for global gene expression associated with muscle growth in a single male modern broiler line compared to a foundational Barred Plymouth Rock chicken line. *BMC Genomics*, 18, 1-19.
87. Kusama, K., Bai, R., Nakamura, K., Okada, S., Yasuda, J., Imakawa, K. (2017). Endometrial factors similarly induced by IFNT2 and IFNTc1 through transcription factor FOXS1. *PloS One*, 12, e0171858.

88. Kushner, P. J., Agard, D. A., Greene, G. L., Scanlan, T. S., Shiau, A. K., Uht, R. M., Webb, P. (2000). Estrogen receptor pathways to AP-1. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 74, 311-317.
89. Lafi, S. Q., Kaneene, J. B. (1992). Epidemiological and economic study of the repeat breeder syndrome in Michigan dairy cattle. I. Epidemiological modeling. *Preventive Veterinary Medicine*, 14, 87-98.
90. Lafi, S. Q., Kaneene, J. B., Black, J. R., Lloyd, J. W. (1992). Epidemiological and economic study of the repeat breeder syndrome in Michigan dairy cattle. II. Economic modeling. *Preventive Veterinary Medicine*, 14, 99-114.
91. LeBlanc, S. J. (2014). Reproductive tract inflammatory disease in postpartum dairy cows. *Animal*, 8, 54-63.
92. LeBlanc, S. J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Bateman, K. G., Keefe, G. P., Walton, J. S., Johnson, W. H. (2002). Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 85, 2223-2236.
93. LeBlanc, S. J., Osawa, T., Dubuc, J. (2011). Reproductive tract defense and disease in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, 76, 1610-1618.
94. Lédée, N., Munaut, C., Aubert, J., Sérazin, V., Rahmati, M., Chaouat, G., Foidart, J. M. (2011). Specific and extensive endometrial deregulation is present before conception in IVF/ICSI repeated implantation failures (IF) or recurrent miscarriages. *The Journal of Pathology*, 225, 554-564.

95. Leslie, M. V., Hansen, P. J. (1991). Progesterone-regulated secretion of the serpin-like proteins of the ovine and bovine uterus. *Steroids*, 56, 589-597.
96. Lessey, B. A., Killam, A. P., Metzger, D. A., Haney, A. F., Greene, G. L., Mccarty Jr, K. S. (1988). Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 67, 334-340.
97. Liebich, H. G. (2020). *Veterinary Histology of Domestic Mammals and Birds: Textbook and Colour Atlas*. 5th edition
98. Love M. I., Huber W., Anders S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15, 550.
99. Lów, P., Molnár, K., Kriska, G. (2016). *Atlas of animal anatomy and histology*. Springer. 1st edition
100. Lucy, M. C. (2001). Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end?. *Journal of Dairy Science*, 84, 1277-1293.
101. Madureira, A. M. L., Burnett, T. A., Carrelli, J. E., Gobikrushanth, M., Cerri, R. L. A., Ambrose, D. J. (2022). Anogenital distance is associated with postpartum estrous activity, intensity of estrous expression, ovulation, and progesterone concentrations in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 105, 8523-8534.
102. Madureira, A. M. L., Silper, B. F., Burnett, T. A., Polsky, L., Cruppe, L. H. Veira, D. M., Vasconcelos, J. L. M., Cerr, R. L. A. (2015). Factors affecting

- expression of estrus measured by activity monitors and conception risk of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98, 7003–7014.
103. Mann, S., Yepes, F. L., Overton, T. R., Wakshlag, J. J., Lock, A. L., Ryan, C. M., Nydam, D. V. (2015). Dry period plane of energy: Effects on feed intake, energy balance, milk production, and composition in transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 98, 3366-3382.
 104. McCracken, J. A. (1980). Hormone receptor control of prostaglandin F2 alpha secretion by the ovine uterus. *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research*, 8, 1329-1344.
 105. Melendez, P., Risco, C. A. (2005). Management of transition cows to optimize reproductive efficiency in dairy herds. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 21, 485-501.
 106. Mellado, M., Sepulveda, E., Meza-Herrera, C., Veliz, F. G., Arevalo, J. R., Mellado, J., De Santiago, A. (2013). Effects of heat stress on reproductive efficiency of high yielding Holstein cows in a hot-arid environment. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 26, 193-200.
 107. Meseguer, M., Aplin, J. D., Caballero-Campo, P., O'Connor, J. E., Martín, J. C., Remohí, J., Simón, C. (2001). Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biology of Reproduction*, 64, 590-601.
 108. Mesen, T. B., Lessey, B. A., Canny, G. O., Yuan, L., Fazleabas, A. T., Young, S. L. (2013). Marked stimulation of the lipoxin A4 synthesis pathway during endometrial stromal decidualization in women with and

- without endometriosis suggests a role in early pregnancy. *Fertility and Sterility*, 100, S136-S137.
109. Miller, R. H., Norman, H. D., Kuhn, M. T., Clay, J. S., Hutchison, J. L. (2007). Voluntary waiting period and adoption of synchronized breeding in dairy herd improvement herds. *Journal of Dairy Science*, 90, 1594-1606.
 110. Minten, M. A., Bilby, T. R., Bruno, R. G., Allen, C. C., Madsen, C. A., Wang, Z., Spencer, T. E. (2013). Effects of fertility on gene expression and function of the bovine endometrium. *PLoS One*, 8, e69444.
 111. Moffatt, J., Bazer, F. W., Hansen, P. J., Chun, P. W., Michael Roberts, R. (1987). Purification, secretion and immunocytochemical localization of the uterine milk proteins, major progesterone-induced proteins in uterine secretions of the sheep. *Biology of Reproduction*, 36, 419-430.
 112. Moraes, J. G., Behura, S. K., Geary, T. W., Hansen, P. J., Neiberghs, H. L., Spencer, T. E. (2018). Uterine influences on conceptus development in fertility-classified animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115, E1749-E1758.
 113. Moss, N., Lean, I. J., Reid, S. W. J., Hodgson, D. R. (2002). Risk factors for repeat-breeder syndrome in New South Wales dairy cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 54, 91-103.
 114. Motta, J. C., Madureira, G., Silva, L. O., Alves, R. L., Silvestri, M., Drum, J. N., Sartori, R. (2020). Interactions of circulating estradiol and progesterone on changes in endometrial area and pituitary responsiveness to GnRH. *Biology of Reproduction*, 103, 643-653.

115. Musgrove, E. A., Swarbrick, A., Lee, C. S., Cornish, A. L., Sutherland, R. L. (1998). Mechanisms of cyclin-dependent kinase inactivation by progestins. *Molecular and Cellular Biology*, 18, 1812-1825.
116. Norman, H. D., Guinan, F. L., Megonigal, J. H., Dürr, J. W. Reasons that cows in Dairy Herd Improvement programs exited the milking herd in 2021. Council on Dairy Cattle Breeding (CDCB); 2021. <https://queries.uscdcb.com/publish/dhi/current/cullall.html>
117. Ntallaris, T., Humblot, P., Båge, R., Sjunnesson, Y., Dupont, J., Berglund, B. (2017). Effect of energy balance profiles on metabolic and reproductive response in Holstein and Swedish Red cows. *Theriogenology*, 90, 276-283.
118. O'Hara, E. A., Båge, R., Emanuelson, U., Holtenius, K. (2019). Effects of dry period length on metabolic status, fertility, udder health, and colostrum production in 2 cow breeds. *Journal of Dairy Science*, 102, 595-606.
119. Ohtani, S., Okuda, K. (1995). Histological observation of the endometrium in repeat breeder cows. *Journal of Veterinary Medical Science*, 57, 283-286.
120. Ohtani, S., Okuda, K., Nishimura, K., Mohri, S. (1993). Histological changes in bovine endometrium during the estrous cycle. *Theriogenology*, 39, 1033-1042.
121. Pabona, J. M. P., Simmen, F. A., Nikiforov, M. A., Zhuang, D., Shankar, K., Velarde, M. C., Simmen, R. C. (2012). Krüppel-like factor 9 and progesterone receptor coregulation of decidualizing endometrial stromal

- cells: implications for the pathogenesis of endometriosis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 97, 376-392.
122. Palmer, M. A., Olmos, G., Boyle, L. A., Mee, J. F. (2010). Estrus detection and estrus characteristics in housed and pastured Holstein–Friesian cows. *Theriogenology*, 74, 255-264.
 123. Pascottini, O. B., LeBlanc, S. J. (2020). Modulation of immune function in the bovine uterus peripartum. *Theriogenology*, 150, 193-200.
 124. Paulson, R. J. (2011). Hormonal induction of endometrial receptivity. *Fertility and Sterility*, 96, 530-535.
 125. Pawlina, W., Ross, M. H. (2018). *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. Lippincott Williams & Wilkins. 1st edition
 126. Peltier, M. R., Hansen, P. J. (2001). Immunoregulatory activity, biochemistry, and phylogeny of ovine uterine serpin. *American Journal of Reproductive Immunology*, 45, 266-272.
 127. Perry, G. A., Cushman, R. A., Perry, B. L., Schiefelbein, A. K., Northrop, E. J., Rich, J. J., Perkins, S. D. (2020). Role of preovulatory concentrations of estradiol on timing of conception and regulation of the uterine environment in beef cattle. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 66, 12-25.
 128. Peter, S., Gärtner, M. A., Michel, G., Ibrahim, M., Klopffleisch, R., Lübke-Becker, A., Gabler, C. (2018). Influence of intrauterine administration of *Lactobacillus buchneri* on reproductive performance and pro-inflammatory

- endometrial mRNA expression of cows with subclinical endometritis. *Scientific Reports*, 8, 1-13.
129. Piñeiro, J. M., Menichetti, B. T., Barragan, A. A., Relling, A. E., Weiss, W. P., Bas, S., Schuenemann, G. M. (2019). Associations of pre-and postpartum lying time with metabolic, inflammation, and health status of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102, 3348-3361.
 130. Pope, W. F. (1988). Uterine asynchrony: a cause of embryonic loss. *Biology of Reproduction*, 39, 999-1003.
 131. Puglisi, R., Cambuli, C., Capoferri, R., Giannino, L., Lukaj, A., Duchi, R., Bongioni, G. (2013). Differential gene expression in cumulus oocyte complexes collected by ovum pick up from repeat breeder and normally fertile Holstein Friesian heifers. *Animal Reproduction Science*, 141, 26-33.
 132. Puglisi, R., Cambuli, C., Capoferri, R., Giannino, L., Lukaj, A., Duchi, R., Bongioni, G. (2013). Differential gene expression in cumulus oocyte complexes collected by ovum pick up from repeat breeder and normally fertile Holstein Friesian heifers. *Animal Reproduction Science*, 141, 26-33.
 133. Punyadeera, C., Dassen, H., Klomp, J., Dunselman, G., Kamps, R., Dijcks, F., Groothuis, P. (2005). Oestrogen-modulated gene expression in the human endometrium. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62, 239-250.

134. Raheem, K. A., Marei, W. F., Campbell, B. K., Fouladi-Nashta, A. A. (2016). In vivo and in vitro studies of MUC1 regulation in sheep endometrium. *Theriogenology*, 85, 1635-1643.
135. Ranasinghe, R., Nakao, T., Kobayashi, A. (2009). Incidence of Error in Oestrus Detection Based on Secondary Oestrus Signs in a 24-h Tie- Stalled Dairy Herd with Low Fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, 44, 643-646.
136. Rizos, D., Carter, F., Besenfelder, U., Havlicek, V., Lonergan, P. (2010). Contribution of the female reproductive tract to low fertility in postpartum lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93, 1022-1029.
137. Roberts, R. M., Ealy, A. D., Alexenko, A. P., Han, C. S., Ezashi, T. (1999). Trophoblast interferons. *Placenta*, 20, 259-264.
138. Robinson, R. S., Mann, G. E., Gadd, T. S., Lamming, G. E., Wathes, D. C. (2000). The expression of the IGF system in the bovine uterus throughout the oestrous cycle and early pregnancy. *Journal of Endocrinology*, 165, 231-244.
139. Robinson, R. S., Mann, G. E., Lamming, G. E., Wathes, D. C. (2001). Expression of oxytocin, oestrogen and progesterone receptors in uterine biopsy samples throughout the oestrous cycle and early pregnancy in cows. *Reproduction*, 122, 965-979.
140. Roche, J. F. (2006). The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Animal Reproduction Science*, 96, 282-296.

141. Sağsöz, H., Ketani, M. A., Saruhan, B. G. (2012). 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. *Biotechnic & Histochemistry*, 87, 105-116.
142. Salamonsen, L. A. (2003). Tissue injury and repair in the female human reproductive tract. *Reproduction*, 125, 301-311.
143. Salasel, B., Mokhtari, A., Taktaz, T. (2010). Prevalence, risk factors for and impact of subclinical endometritis in repeat breeder dairy cows. *Theriogenology*, 74, 1271-1278.
144. Senger, P. L. (2012). *Pathways to pregnancy and parturition*. Redmond, OR: Current Conceptions, Inc. 3rd edition
145. Sheldon, I. M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio, G., Schuberth, H. J. (2009). Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biology of Reproduction*, 81, 1025–1032.
146. Shimizu, T., Krebs, S., Bauersachs, S., Blum, H., Wolf, E., Miyamoto, A. (2010). Actions and interactions of progesterone and estrogen on transcriptome profiles of the bovine endometrium. *Physiological Genomics*, 42, 290-300.
147. Spencer, T. E., Bazer, F. W. (1995). Temporal and spatial regulation of uterine receptors for estrogen and progesterone during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biology of Reproduction*, 53, 1527-1544.

148. Spencer, T. E., Bazer, F. W. (2002). Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 7, 1879-1898.
149. Spencer, T. E., Becker, W. C., George, P., Mirando, M. A., Ogle, T. F., Bazer, F. W. (1995). Ovine interferon-tau inhibits estrogen receptor up-regulation and estrogen-induced luteolysis in cyclic ewes. *Endocrinology*, 136, 4932-4944.
150. Spencer, T. E., Becker, W. C., George, P., Mirando, M. A., Ogle, T. F., Bazer, F. W. (1995). Ovine interferon- τ regulates expression of endometrial receptors for estrogen and oxytocin but not progesterone. *Biology of Reproduction*, 53, 732-745.
151. Spencer, T. E., Gray, A., Johnson, G. A., Taylor, K. M., Gertler, A., Gootwine, E., Bazer, F. W. (1999). Effects of recombinant ovine interferon tau, placental lactogen, and growth hormone on the ovine uterus. *Biology of Reproduction*, 61, 1409-1418.
152. Sponchiado, M., Gonella-Diaza, A. M., Rocha, C. C., Turco, E. G. L., Pugliesi, G., Leroy, J. L., Binelli, M. (2019). The pre-hatching bovine embryo transforms the uterine luminal metabolite composition in vivo. *Scientific Reports*, 9, 1-14.
153. Stangaferro, M. L., Wijma, R., Caixeta, L. S., Al-Abri, M. A., Giordano, J. O. (2016). Use of rumination and activity monitoring for the identification of dairy cows with health disorders: Part I. Metabolic and digestive disorders. *Journal of Dairy Science*, 99, 7395-7410.

154. Stangaferro, M. L., Wijma, R., Caixeta, L. S., Al-Abri, M. A., Giordano, J. O. (2016). Use of rumination and activity monitoring for the identification of dairy cows with health disorders: Part II. Mastitis. *Journal of Dairy Science*, 99, 7411-7421.
155. Stangaferro, M. L., Wijma, R., Caixeta, L. S., Al-Abri, M. A., Giordano, J. O. (2016). Use of rumination and activity monitoring for the identification of dairy cows with health disorders: Part III. Metritis. *Journal of Dairy Science*, 99, 7422-7433.
156. Stelwagen, K., Phyn, C. V. C., Davis, S. R., Guinard-Flament, J., Pomies, D., Roche, J. R., Kay, J. K. (2013). Invited review: Reduced milking frequency: Milk production and management implications. *Journal of Dairy Science*, 96, 3401–3413.
157. Stevenson, J. S., Banuelos, S., Mendonça, L. G. (2020). Transition dairy cow health is associated with first postpartum ovulation risk, metabolic status, milk production, rumination, and physical activity. *Journal of dairy science*, 103, 9573-9586.
158. Stewart, M. D., Johnson, G. A., Gray, C. A., Burghardt, R. C., Schuler, L. A., Joyce, M. M., Spencer, T. E. (2000). Prolactin receptor and uterine milk protein expression in the ovine endometrium during the estrous cycle and pregnancy. *Biology of Reproduction*, 62, 1779-1789.
159. Stotts, M. J., Zhang, Y., Zhang, S., Michal, J. J., Velez, J., Bothe, H., Maquivar, M., Jiang, Z. (2022). Alternative polyadenylation events in

- epithelial cells sense endometritis progression in dairy cows. *Journal of Integrative Agriculture*. In press.
160. Su, G., Morris, J. H., Demchak, B., Bader, G. D. (2014). Biological network exploration with Cytoscape 3. *Current Protocols in Bioinformatics*, 47, 8-13.
 161. Sultan, M., Amstislavskiy, V., Risch, T., Schuette, M., Dökel, S., Ralser, M., Yaspo, M. L. (2014). Influence of RNA extraction methods and library selection schemes on RNA-seq data. *BMC Genomics*, 15, 1-13.
 162. Takatsu, K., Kuse, M., Yoshioka, S., Acosta, T. J. (2018). 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 (AR)*, 12, 328-335.
 163. Tan, J., Paria, B. C., Dey, S. K., Das, S. K. (1999). Differential uterine expression of estrogen and progesterone receptors correlates with uterine preparation for implantation and decidualization in the mouse. *Endocrinology*, 140, 5310-5321.
 164. Tasaki, Y., Nishimura, R., Shibaya, M., Lee, H. Y., Acosta, T. J., Okuda, K. (2010). Expression of VEGF and its receptors in the bovine endometrium throughout the estrous cycle: effects of VEGF on prostaglandin production in endometrial cells. *Journal of Reproduction and Development*, 56, 223-229.
 165. Tong, W., Pollard, J. W. (1999). Progesterone inhibits estrogen-induced cyclin D1 and cdk4 nuclear translocation, cyclin E-and cyclin A-cdk2

- kinase activation, and cell proliferation in uterine epithelial cells in mice. *Molecular and Cellular Biology*, 19, 2251-2264.
166. Ulbrich, S. E., Frohlich, T., Schulke, K., Englberger, E., Waldschmitt, N., Arnold, G. J., Bauersachs, S. (2009). Evidence for estrogen-dependent uterine serpin (SERPINA14) expression during estrus in the bovine endometrial glandular epithelium and lumen. *Biology of Reproduction*, 81, 795-805.
 167. VanRaden, P. M., Sanders, A. H., Tooker, M. E., Miller, R. H., Norman, H. D., Kuhn, M. T., Wiggans, G. R. (2004). Development of a national genetic evaluation for cow fertility. *Journal of Dairy Science*, 87, 2285-2292.
 168. Verme, L. J., Ozoga, J. J. (1981): Sex ratio of white-tailed deer and the estrous cycle. *Journal of Wildlife Management*, 45; 710-715.
 169. Veronese, A., Marques, O., Moreira, R., Belli, A. L., Bisinotto, R. S., Bilby, T. R., Chebel, R. C. (2019). Genomic merit for reproductive traits. I: Estrous characteristics and fertility in Holstein heifers. *Journal of Dairy Science*, 102, 6624-6638.
 170. Wagener, K., Pothmann, H., Prunner, I., Peter, S., Erber, R., Aurich, C., Gabler, C. (2017). Endometrial mRNA expression of selected pro-inflammatory factors and mucins in repeat breeder cows with and without subclinical endometritis. *Theriogenology*, 90, 237-244.
 171. Walsh, S. W., Williams, E. J., Evans, A. C. O. (2011). A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science*, 123, 127-138.

172. Wang R., Nambiar R., Zheng D., Tian B. (2018). PolyA DB 3 catalogs cleavage and polyadenylation sites identified by deep sequencing in multiple genomes. *Nucleic Acids Research*, 46, 315-319.
173. Wang, W., Zang, X., Li, Y., Liu, D., Hong, L., Liu, G. (2023). Integrating Analysis to Identify Differential circRNAs Involved in Goat Endometrial Receptivity. *International Journal of Molecular Sciences*, 24, 1531.
174. Wathes, D. C., Cheng, Z., Chowdhury, W., Fenwick, M. A., Fitzpatrick, R., Morris, D. G., Murphy, J. J. (2009). Negative energy balance alters global gene expression and immune responses in the uterus of postpartum dairy cows. *Physiological Genomics*, 39, 1-13.
175. Windig, J. J., Calus, M. P. L., Veerkamp, R. F. (2005). Influence of herd environment on health and fertility and their relationship with milk production. *Journal of Dairy Science*, 88, 335-347.
176. Xiao, C. W., Goff, A. K. (1998). Differential effects of oestradiol and progesterone on proliferation and morphology of cultured bovine uterine epithelial and stromal cells. *Reproduction*, 112, 315-324.
177. Yusuf, M., Nakao, T., Ranasinghe, R. B. K., Gautam, G., Long, S. T., Yoshida, C., Hayashi, A. (2010). Reproductive performance of repeat breeders in dairy herds. *Theriogenology*, 73, 1220-1229.
178. Zhou, X., Li, R., Michal, J., Wu, X. L., Liu, Z., Zhao, H., Xia, Y., Du, W., Wildung, M., Pouchnik, D., Harland, R., Jiang, Z. (2016). Accurate profiling of gene expression and alternative polyadenylation with whole

transcriptome termini site sequencing (WTTS-Seq). *Genetics*, 203, 683-97.

179. Zhou, Y., Zhou, B., Pache, L., Chang, M., Khodabakhshi, A. H., Tanaseichuk, O., Chanda, S. K. (2019). Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. *Nature Communications*, 10, 1-10.