



Programa de Doctorado en SALUD PÚBLICA, CIENCIAS  
MÉDICAS Y QUIRÚRGICAS

**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL  
MICROBIOMA VAGINAL Y ENDOMETRIAL  
SOBRE LOS RESULTADOS DE LAS  
TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA.**



---

**María del Carmen Díaz Martínez**

Directora de la tesis

**Prof<sup>a</sup>. Dra. María Concepción Carratalá Munuera**

Codirectores de la tesis

**Prof<sup>o</sup>. Dr. José Antonio Quesada Rico**

**Dra. Andrea Bernabeu García**

Universidad Miguel Hernández de Elche

## **MODALIDAD DE TESIS: COMPENDIO DE PUBLICACIONES**

---

La presente Tesis Doctoral, titulada “Estudio de la influencia del microbioma vaginal y endometrial sobre los resultados de las técnicas de reproducción asistida” cuya publicación se encuadra en el primer cuartil (Q1) de SCIMAGO se presenta bajo la modalidad de tesis por compendio de las siguientes publicaciones:

*Díaz-Martínez MDC, Bernabeu A, Lledó B, Carratalá-Munuera C, Quesada JA, Lozano FM, Ruiz V, Morales R, Llácer J, Ten J, Castillo JC, Rodríguez A, Nouni-García R, López-Pineda A, Moliner B, Bernabeu R. **Impact of the Vaginal and Endometrial Microbiome Pattern on Assisted Reproduction Outcomes.** J Clin Med. 2021 Sep 8;10(18):4063. doi: 10.3390/jcm10184063. PMID: 34575174; PMCID: PMC8465380.*

Este trabajo fue aceptado el día 2 de septiembre de 2021 para su publicación en la revista Journal of Clinical Medicine (JCM) as part of the Special Issue Updates in Diagnosis and Treatment of Infertility and is available online. Open Access. Published online: September 16,2021. Q1 Medicine (miscellaneous) SCIMAGO. SJR 2021 1.04.

### Información completa de la revista:

Título completo de la revista Revista de medicina clínica

Título abreviado ISO4J. Clin. Medicina. ISSN (electrónico) 2077-0383

CODEN: JCMOHK

Editor: MDPI

Ubicación del editor: Basel, Suiza

Dirección postal: MDPI, St. Alban-Anlage 66, 4052 Basilea, Suiza

Editores: ver Comité Editorial

Medio de publicación: electrónico

Sitio web de publicación: <https://www.mdpi.com/journal/jcm>

Primer año publicado 2012

Bases de datos de indexación: ver Indexación y resúmenes

Cubierto por Science Citation Index Expanded (SCIE, Web of Science).



## INFORME DE LA DIRECTORA Y CODIRECTOR DE LA TESIS.

---

La Prof<sup>ª</sup>. Dra. María Concepción Carratalá Munuera, director/a, y el Prof. Dr. José Antonio Quesada Rico y la Dra. Andrea Bernabeu García codirector/a de la tesis doctoral titulada “Estudio de la influencia del microbioma vaginal y endometrial sobre los resultados de las técnicas de reproducción asistida”.

INFORMA/N:

Que Dña. María del Carmen Díaz Martínez ha realizado bajo nuestra supervisión el trabajo titulado “*Estudio de la influencia del microbioma vaginal y endometrial sobre los resultados de las técnicas de reproducción asistida*” conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo/firmamos para los efectos oportunos, en Sant Joan d’ Alacant a ..... de enero de 2023

Prof<sup>ª</sup>. Dra. María Concepción Carratalá Munuera

*Directora de la tesis*

Prof. Dr. José Antonio Quesada Rico

Dra. Andrea Bernabeu García

*Codirectores de la tesis*



## INFORME DEL COORDINADOR/A DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO

---

La Prof<sup>a</sup> María del Mar Masiá Canuto, Coordinador/a del Programa de Doctorado en Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas de la Universidad Miguel Hernández de Elche (UMH).

INFORMA:

Que Dña. María del Carmen Díaz Martínez ha realizado bajo la supervisión de nuestro Programa de Doctorado el trabajo titulado *Estudio de la influencia del microbioma vaginal y endometrial sobre los resultados de las técnicas de reproducción asistida* conforme a los términos y condiciones definidos en su Plan de Investigación y de acuerdo al Código de Buenas Prácticas de la Universidad Miguel Hernández de Elche, cumpliendo los objetivos previstos de forma satisfactoria para su defensa pública como tesis doctoral.

Lo que firmo para los efectos oportunos, en Sant Joan d' Alacant a 16 de enero de 2023

Firmado: Prof<sup>a</sup> María del Mar Masiá Canuto

Coordinadora del Programa de Doctorado en Salud Pública, Ciencias Médicas y Quirúrgicas.

## **BECA ASOCIADA A LA REALIZACIÓN DE LA TESIS DOCTORAL**

---

Para la realización del proyecto, la doctoranda obtuvo una beca de la Junta Rectora del Instituto Alicantino de Cultura Juan Gil-Albert en sesión extraordinaria (en régimen de concurrencia competitiva) celebrada el día veinticuatro de noviembre de dos mil veinte, de Ayudas a la Investigación 2020, valorada en 4.000€ (3.400€ netos), con el objeto de contribuir al desarrollo de la investigación en la provincia de Alicante y de apoyar las experiencias complementarias a la formación docente y al desarrollo de actitudes investigadoras.



“La satisfacción radica en el esfuerzo, no en el logro.

El esfuerzo total es la victoria total”.

(Gandhi)



# ÍNDICE





## ÍNDICE

---

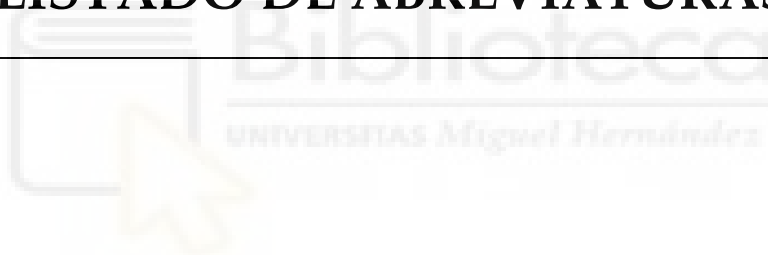
LISTADO DE ABREVIATURAS	11
LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS	13
RESUMEN-ABSTRACT	17
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	20
2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	30
3. HIPÓTESIS	33
4. OBJETIVOS	33
4.1. Objetivos principales	34
4.2. Objetivos secundarios	34
5. MATERIAL Y MÉTODOS	35
5.1. Diseño y tipo de estudio	36
5.2. Población de estudio y ámbito	36
5.3. Selección de la muestra: criterios de inclusión y criterios de exclusión	37
5.4. Tamaño muestral y muestreo	37
5.5. Toma de muestras y método de análisis de muestras	37
5.6. Definición de variables y recogida de datos	41
5.7. Estrategia de análisis bioinformático y estadístico	42
6. RESULTADOS	44
6.1 Diferencias entre los patrones de microbioma vaginal y endometrial	46
6.2 Evolución del microbioma vaginal	51
6.3 Patrones de microbioma asociados con el embarazo clínico después de FET	53
6.3.1 Patrón de microbioma vaginal	53
6.3.2 Patrón de microbioma endometrial	56
6.4 Patrones de microbioma asociados con el diagnóstico de RIF	57
6.4.1. Patrón de microbioma vaginal	57
6.4.2. Patrón de microbioma endometrial	61
6.5 Pruebas de modelos lineales de efectos mixtos por resultado del embarazo y diagnóstico de RIF	63

7. DISCUSIÓN	65
8. FORTALEZAS Y LIMITACIONES	70
9. CONCLUSIONES	72
10. BIBLIOGRAFÍA	74
ANEXO-PUBLICACIONES	80
APROBACIÓN CEIC	98
APÉNDICE-FIGURAS SUPLEMENTARIAS	99
AGRADECIMIENTOS	107



## **LISTADO DE ABREVIATURAS**

---



## LISTADO DE ABREVIATURAS

---

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

rRNA: Ácido ribonucleico ribosómico.

HMP: Human Microbiome Project.

NGS: Next Generation Sequencing. Secuenciación masiva.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

TRA: Técnicas de reproducción asistida.

FIV: Fecundación in vitro.

QIIME: Quantitative Insights Into Microbial Ecology.

OTU: Unidad taxonómica operacional.

ICSI: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

CST: Community State Types

NLDM: microbiota no dominada por Lactobacillus

LDM: microbiota dominada por Lactobacillus

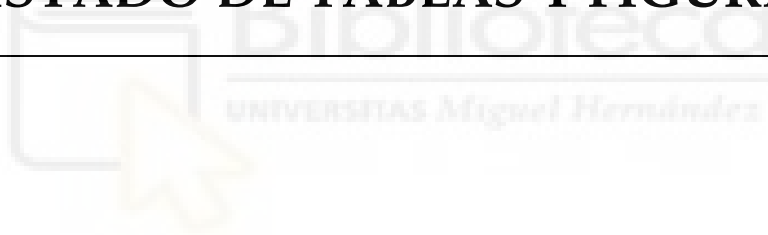
OTA: Oligoastenoteratozoospermia

THS: Tratamiento hormonal sustitutivo

CEIC: Comité Ético de Investigación Clínica

## **LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS**

---



## LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

### FIGURAS PRINCIPALES

---

**Figura 1.** Diagrama de flujo del estudio.

**Figura 2.** Patrones microbianos vaginales y endometriales durante la fase secretora del ciclo anterior al FET (días 18-22 del ciclo). (a) Análisis comparativo del índice de diversidad de Shannon y el índice de diversidad de Simpson para las mujeres del estudio en relación con el estudio de la diversidad alfa. (b) Gráfico de barras de MicrobiomeAnalyst MDP de las frecuencias relativas de los géneros más abundantes, agrupados por tipo de muestra.

**Figura 3.** MicrobiomeAnalyst MDP gráfico de barras de la frecuencia relativa de los más abundantes (a) géneros y (b) especies, agrupadas por punto de tiempo en el ciclo.

**Figura 4.** Asociación de las muestras vaginales tomadas en diferentes momentos con la tasa de gestación. (a) Análisis univariante representado con un diagrama de caja que muestra la abundancia relativa de *Lactobacillus spp.* (0,045) y *L. reuteri* ( $p=0,040$ ) para la tasa de gestación durante la fase secretora del ciclo anterior a la transferencia de embriones congelados (días 18-22 del ciclo). (b) Análisis univariante representado con un diagrama de caja que muestra la abundancia relativa del género *Lactobacillus spp.* (0,027) para la tasa de gestación el día de la transferencia del embrión. (c) Análisis univariado representado con un diagrama de caja que muestra la abundancia relativa de *Lactobacillus spp.* ( $p=0,049$ ) y *L. reuteri* ( $p=0,059$ ) para la tasa de gestación el día de la prueba de embarazo.

**Figura 5.** Asociación de la muestra de endometrio con la tasa de gestación: gráfico de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes, agrupados por tasa de gestación.

**Figura 6.** Patrones de microbioma por diagnóstico de fallo repetido de implantación (RIF). (a) Análisis comparativo del índice de diversidad de Shannon ( $p = 0,285$ ) y el índice de diversidad de Simpson ( $p=0,276$ ) para las mujeres con y sin RIF en relación al estudio de diversidad alfa. MicrobiomeAnalyst MDP. (b) Análisis univariante representado con un diagrama de caja que muestra las diferencias en el índice de diversidad alfa para el grupo de estudio en las muestras endometriales. Análisis del índice de diversidad de Shannon,  $p = 0,021$  y Simpson,  $p = 0,021$ ; Mann-Whitney U.

**Figura 7.** Pruebas de modelos lineales de efectos mixtos por (a) resultado clínico del embarazo y (b) diagnóstico de falla repetida de implantación (RIF).

## FIGURAS SUPLEMENTARIAS

---

**Figura S1:** El UniFrac PCoA no ponderado, basado en la matriz de distancia UniFrac, que representa las muestras de estudio con diferentes colores según las muestras: vaginal (rojo) o endometrial (azul), QIIME2.

**Figura S2:** Gráfico circular de la frecuencia relativa de las especies más abundantes para cada tipo de muestra.

**Figura S3:** Gráfico de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes, agrupados por tasa de gestación durante la fase secretora del ciclo anterior a la transferencia de embriones congelados (días 18-22 del ciclo), MicrobiomeAnalyst MDP.

**Figura S4:** Gráfico de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes, agrupados por tasa de gestación para el segundo momento, MicrobiomeAnalyst MDP.

**Figura S5:** Gráfico de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes, agrupados por tasa de gestación el día de la prueba de embarazo, MicrobiomeAnalyst MDP.

**Figura S6:** El UniFrac PCoA no ponderado, basado en la matriz de distancia UniFrac, que representa las muestras del estudio con diferentes colores según el diagnóstico de RIF: vaginal (rojo) o endometrial (azul), QIIME2.

**Figura S7:** Gráfico de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes, agrupados por diagnóstico de RIF, en las muestras vaginales, MicrobiomeAnalyst MDP.

**Figura S8:** Gráfico de barras de la frecuencia relativa de las especies más abundantes, agrupadas por diagnóstico de RIF, en las muestras vaginales, MicrobiomeAnalyst MDP.

**Figura S9:** UniFrac PCoA no ponderado, que representa a las mujeres con y sin diagnóstico de RIF utilizando diferentes colores, sin RIF (rojo) o con RIF (azul), QIIME2.

**Figura S10:** Gráfico de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes, agrupados por diagnóstico RIF, MicrobiomeAnalyst MDP.

**Figura S11:** Gráfico de barras de las frecuencias relativas de las especies más abundantes, agrupados por diagnóstico RIF, MicrobiomeAnalyst MDP (*L. iners*, *L. helveticus*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *S. amnii*; V3 representa especies no identificadas).

## TABLAS

---

**Tabla 1.** Características basales en mujeres que lograron y no lograron un embarazo clínico.

**Tabla 2.** Diferencias en los géneros presentes en los perfiles del microbioma en muestras vaginales y endometriales.





**RESUMEN**

---

**ABSTRACT**



## RESUMEN

---

La microbiota uterina puede estar involucrada en la salud y las enfermedades reproductivas. Este estudio tiene como objetivo describir y comparar los patrones de microbioma vaginal y endometrial entre mujeres que quedaron embarazadas y mujeres que no lo hicieron después de la fertilización in vitro. También comparamos los patrones de microbioma vaginal y endometrial entre mujeres con y sin antecedentes de fallos repetidos de implantación (RIF). Este estudio piloto de cohorte prospectivo incluyó a 48 mujeres que se presentaron en la clínica de fertilidad para FIV desde mayo de 2017 hasta mayo de 2019. Las mujeres que lograron un embarazo clínico presentaron una mayor abundancia relativa de *Lactobacillus spp.* en sus muestras vaginales que las que no lo hicieron (97,69% versus 94,63%;  $p = 0,027$ ). La diversidad alfa y beta de las muestras vaginales y endometriales no fue estadísticamente diferente entre mujeres embarazadas y no embarazadas. El índice de diversidad alfa de Faith en muestras vaginales fue más bajo en mujeres con RIF que en aquellas sin RIF ( $p = 0,027$ ). La diversidad alfa del microbioma endometrial fue significativamente mayor en mujeres sin RIF ( $p = 0,021$ ). No hubo diferencias significativas en los microbiomas vaginales y endometriales entre mujeres embarazadas y no embarazadas. La abundancia relativa de los géneros en mujeres con RIF fue diferente de aquellas sin RIF. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el microbioma endometrial entre mujeres con y sin RIF.

*Palabras clave:* microbioma, tasas de embarazo, fallos repetidos de implantación, medicina reproductiva.

## ABSTRACT

---

Uterine microbiota may be involved in reproductive health and disease. This study aims to describe and compare the vaginal and endometrial microbiome patterns between women who became pregnant and women who did not after in vitro fertilization. We also compared the vaginal and endometrial microbiome patterns between women with and without a history of repeated implantation failures (RIF). This pilot prospective cohort study included 48 women presenting to the fertility clinic for IVF from May 2017 to May 2019. Women who achieved clinical pregnancy presented a greater relative abundance of *Lactobacillus spp.* in their vaginal samples than those who did not (97.69% versus 94.63%;  $p=0.027$ ). The alpha and beta diversity of vaginal and endometrial samples were not statistically different between pregnant and non-pregnant women. The Faith alpha diversity index in vaginal samples was lower in women with RIF than those without RIF ( $p=0.027$ ). The alpha diversity of the endometrial microbiome was significantly higher in women without RIF ( $p=0.021$ ). There were no significant differences in the vaginal and endometrial microbiomes between pregnant and non-pregnant women. The relative abundance of the genera in women with RIF was different from those without RIF. Statistically significant differences in the endometrial microbiome were found between women with and without RIF.

Keywords: microbiome, pregnancy rates, repeated implantation failure, reproductive medicine

# INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---



## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

---

Durante más de un siglo, la cavidad uterina se ha considerado un sitio estéril mantenido por el tapón cervical. En la era de la medicina de precisión, el factor endometrial y específicamente la visión microbiológica se han descuidado durante mucho tiempo en el campo de la reproducción. En la última década, se han realizado importantes descubrimientos, liderados por la mejora de la tecnología como la secuenciación masiva, en el estudio de las comunidades microbianas, no solo en la vagina sino también en la cavidad endometrial y su implicación en la salud y la enfermedad reproductiva. A partir de estos estudios, hemos aprendido que la microbiota interactúa con las células huésped a lo largo del tracto reproductivo femenino y generan el entorno físico, químico y biológico con el que se encontrará el embrión durante el período de periimplantación y durante todo el embarazo (1).

El cuerpo humano está constituido por células especializadas que componen los diferentes órganos y sistemas que se hayan acompañados por bacterias, que, aunque de menor tamaño, se encuentran en un número muy superior. Se puede decir, que aproximadamente un 90% de la vida de nuestro cuerpo corresponde a bacterias, hongos y otros microorganismos, encontrándose en una proporción 10 a 1 con respecto a las células (2). La definición del término microbioma humano es la totalidad de los microorganismos y su material genético presente en o sobre el cuerpo humano y se atribuyó al biólogo molecular americano Joshua Lederberg en 2001, según lo discutido por Mor et al. (3).

La gran mayoría de estos microorganismos presentes en el cuerpo humano son beneficiosos para salud. Se cree que actúan principalmente en la regulación del homeostasis del sistema inmunitario, y, por tanto, en la etiopatogenia de diversas enfermedades. Cualquier alteración en el equilibrio del microbioma, puede alterar gravemente su funcionalidad, dando lugar a las conocidas infecciones u otras enfermedades (4). Hasta hace poco, el enfoque principal de las caracterizaciones de la microbiota humanas ha sido en el contexto de un estado de enfermedad; sin embargo, ahora se reconoce que la microbiota también es necesaria para mantener un estado de salud (5).

Si bien es conocida la presencia de microbioma en nuestro organismo, nuestra comprensión del papel fisiológico y fisiopatológico del microbioma sigue siendo limitada. Antes de la llegada de la secuenciación de ADN de alto rendimiento, se emplearon métodos basados en

cultivos para identificar las especies bacterianas que se encuentran en el cuerpo humano. Sin embargo, la secuenciación completa de microbiomas a gran escala se ha facilitado por los avances en la secuenciación de genes en las últimas dos décadas (6). El uso de tecnologías basadas en el cultivo tiene limitaciones, ya que muchos microorganismos no son detectados fácilmente por las técnicas de cultivo tradicionales. El 50% de los patógenos clasificados como "dominantes" y el 85% de los patógenos "principales" en las infecciones de heridas no se identifican mediante técnicas de cultivo estándar (7). Sin embargo, las nuevas tecnologías han cambiado la forma en que pensamos en el microbioma. Se ha sugerido que el microbioma humano puede considerarse como el "segundo genoma humano", y los datos recientes publicados en este campo han revelado que es igual de complejo (8,9).

Al interpretar los datos en la literatura, es importante comprender cómo se obtuvieron y analizaron las muestras metagenómicas. En general, los datos de los microbiomas se obtienen de una de las dos formas siguientes: tecnología basada en cultivo o en secuenciación. Gran parte del trabajo inicial que describe el microbioma humano provino de enfoques basados en cultivos que utilizan el análisis 16S rRNA de genes altamente conservados como una forma de identificar organismos (10, 11). Los datos de técnicas independientes del cultivo demuestran que las técnicas basadas en cultivos subestiman ampliamente la diversidad microbiana (12, 13).

Teniendo esto en cuenta, proyectos como el HMP (proyecto de microbioma humano) utilizaron secuenciación de alto rendimiento del gen 16S rRNA. Específicamente, la secuenciación se enfoca en regiones hipervariables dentro del gen 16S rRNA, que sirve como una huella digital molecular específica para cada género y especie (14, 15). Este enfoque de la caracterización del tracto reproductivo se está generalizando (16).

En relación con la categorización de los distintos tipos de microbiomas utilizados en las publicaciones sobre microbioma en las distintas áreas de la biomedicina, los estudios más recientes categorizan los grupos de microorganismo en OTUs (Unidades Taxonómicas Operacionales), pero estudios anteriores han caracterizado estas comunidades de microbiomas en tipos de CST (*Community State Types*). Las CST I, II, III y V están dominadas por varias especies de *Lactobacillus*, y las CST IV-A y IV-B tienen bacterias predominantemente anaeróbicas (17,18,19). En el presente proyecto, se estima la diversidad mediante agrupación de las secuencias en OTUs, con un porcentaje de similitud del 97%.

Es importante destacar que la implantación endometrial del embrión es el evento singular más importante que determina el éxito de la transferencia de embriones por FIV (20). La transferencia exitosa de embriones depende de muchos factores, incluida la presencia de colonización microbiana del tracto genital superior (21). Se ha sospechado que la colonización microbiana uterocervical influye en las tasas de concepción (22). De hecho, se ha demostrado que la naturaleza de la colonización uterocervical es un factor independiente y significativo que determina el éxito de los tratamientos de reproducción asistida (23).

En una reciente revisión sistemática y metanálisis publicado Haahr et al.,2019 (24) analizaron un total de 12 estudios, con 2980 pacientes, y concluyeron que, la vaginosis bacteriana, está asociada con la infertilidad de factor tubárico y el aborto espontáneo en etapas tempranas. Sin embargo, la calidad de la evidencia fue muy baja y los resultados justifican la necesidad de mayor investigación al respecto (24).

El examen del papel de la microbiota vaginal en la reproducción y los procedimientos de tecnología de reproducción asistida se encuentra en sus inicios; Si bien hay una creciente literatura que respalda su relevancia, muchas preguntas siguen sin respuesta. Varios estudios han apoyado la hipótesis de que el microbioma del tracto reproductivo en el día de la transferencia de embriones afecta el resultado del embarazo. Recientemente, Franasiak et al., publicaron un estudio alentador utilizando la secuenciación de ribosomas 16S de mediante NGS (25). Después de la transferencia de embriones euploides la porción más distal de 5 mm del catéter de transferencia se colocó en un tubo libre de ADN en condiciones estériles. La secuenciación por NGS se realizó en 35 muestras de 33 pacientes. De los 33 pacientes, 18 (54.5%) tuvieron embarazos en curso y 15 (45.5%) no tuvieron embarazos. A diferencia de este estudio, en este estudio, se propone la toma de las muestras vaginales mediante torunda seca y la de las muestras endometriales mediante el dispositivo Tao Brush, para poder discernir el microbioma proveniente del endometrio y de la vagina, evitando así la contaminación entre ambas. Se caracterizó el microbioma en el momento de la transferencia para aquellos pacientes con embarazo en curso en comparación con aquellos sin embarazo en curso. Las especies de *Lactobacillus* fueron las especies principales para ambos resultados. Estos datos muestran que el microbioma en el momento de la transferencia de embriones se puede caracterizar con éxito sin alterar la práctica clínica estándar. Este nuevo enfoque, es el primer paso hacia el objetivo de determinar la microbiota fisiológica a partir de la fisiopatología en el momento de la transferencia de embriones y su impacto en el resultado del embarazo (25).

Los lactobacilos son las bacterias vaginales más abundantes en las mujeres. Inhiben la unión de otras bacterias a las células epiteliales y producen ácido láctico que inhibe el crecimiento de muchas otras bacterias. El ácido láctico bloquea las histonas desacetilasas, mejorando así la transcripción de genes y la reparación del ADN. El ácido láctico induce la autofagia en las células epiteliales para degradar los microorganismos intracelulares y promover la homeostasis. Los lactobacilos son tolerados por las células epiteliales vaginales e inhiben la inducción de citoquinas proinflamatorias. El estrés emocional puede reducir la abundancia de lactobacilos en la microbiota vaginal y aumentar la inflamación. La capacidad de los lactobacilos para inhibir la infección sin inducir inflamación puede maximizar la fecundidad y el resultado exitoso del embarazo en las mujeres (26).

Un estudio reciente de Moreno et al (27), examinó si la composición de la microbiota endometrial influye en los resultados de embarazo en mujeres sometidas a TRA. Se evaluó el impacto reproductivo de una microbiota endometrial alterada en el fluido endometrial a través de los parámetros de implantación, embarazo evolutivo y tasa de nacidos vivos en 35 pacientes infértiles que se sometieron a fertilización in vitro con un endometrio receptivo. Basándose en su composición, la microbiota en el líquido endometrial, que comprende hasta 191 unidades taxonómicas operativas (OTU), se definió como una microbiota dominada por *Lactobacillus* (> 90% de *Lactobacillus* spp.) o una microbiota no dominada por *Lactobacillus* (<90% de *Lactobacillus* spp. con > 10% de otras bacterias). Los autores encontraron una correlación entre los resultados de embarazo negativos y una microbiota endometrial deficiente en las especies de *Lactobacillus* (27). Los autores concluyeron que el efecto negativo de la microbiota endometrial no dominada por *Lactobacillus* debe considerarse como una de las causas de resultados reproductivos deficientes, fallo de implantación y aborto.

Por todo lo anteriormente citado, en este proyecto nos embarcamos en el estudio del microbioma vaginal y endometrial debido a la relevancia que se está demostrando en los distintos estudios y muestra de ello es que a finales de 2007 el Instituto de Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH) se embarcó en el Proyecto Microbioma Humano (HMP) y en 2008 (28) la Comisión Europea y China crearon su homólogo, MetaHIT (*Metagenomics of the human intestinal tract*). Estos proyectos han mostrado que además de la variedad que presentan las diferentes partes del cuerpo humano, cada persona tiene su propio mapa de microorganismos y este puede verse alterado por cambios ambientales, por la dieta, por los hábitos de limpieza, etc (28).



En este estudio, proponemos el análisis de muestras mediante NGS (*Next Generation Sequencing*) puesto que la metagenómica revela que la mayoría de la diversidad microbológica no se puede identificar mediante los cultivos convencionales, y menos del 1% de las bacterias crecen y forman colonias. El empleo de las técnicas de secuenciación masiva (NGS) empleando un gen marcador como el rRNA 16S se ha convertido en una herramienta poderosa para el estudio de poblaciones microbianas (29).

Las principales bacterias comprenden el género *Lactobacillus*, productores de ácido láctico que permiten mantener el pH ácido propio de la vagina, que actúa como una barrera defensiva contra patógenos (30). La asociación entre la flora vaginal y fertilidad está ampliamente establecida desde hace años. La flora normal del tracto reproductivo incluye una variedad de especies *Lactobacillus* que promueven un ambiente saludable para el embrión, durante el periodo preimplantatorio, de modo que se considera que *Lactobacillus* spp promueve un ambiente idóneo para la implantación. La tasa de recién nacido vivo se correlaciona directamente con la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por parte de *Lactobacillus* e inversamente relacionado con la existencia de una vaginosis bacteriana. De modo, que alteraciones de la flora vaginal como vaginosis bacteriana (*Gardnerella vaginalis*) se relaciona con un mayor riesgo de aborto (31,32). Otros microorganismos patógenos como la *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Mycoplasma tuberculosis* se ha relacionado con una menor tasa de gestación, causando cambios subclínicos relacionados con factores de riesgo para subfertilidad (33).

Respecto a los estudios sobre microbioma vaginal e infertilidad femenina son escasos y recientes. El primer estudio longitudinal que analiza el microbioma de gestantes sanas con parto a término, comparado con la microbiota de mujeres sanas no gestantes demuestra que el microbioma entre ambos grupos es diferente, con una mayor estabilidad del microbioma en las pacientes gestantes (34).

Otro aspecto relevante entre la asociación de la infertilidad y el microbioma consiste en determinar si en el lugar donde se producirá la implantación embrionaria, el útero, existe un microbioma específico o asociado al microbioma vaginal. Se consideraba como paradigma que el útero era un órgano estéril. Sin embargo, en el 2016 mediante estudios de NGS se pudo caracterizar el microbioma del útero en mujeres no embarazadas concluyendo que se encuentra constituido principalmente por una comunidad diversa de *Lactobacillus* concretamente *L. iners* y *L. crispatus* (35). En este sentido, se ha intentado observar si existe cierta correlación entre el microbioma vaginal y endometrial para poder de esta manera

simplificar el estudio del microbioma del tracto reproductor femenino. Se ha podido evidenciar que el microbioma vaginal y cervical es bastante consistente con el endometrial, a pesar de que las proporciones relativas de los microorganismos pueden variar (36). Por lo tanto, la evidencia actual parece apuntar a que el microbioma podría ser un factor influyente en la infertilidad. Un paso más allá sería valorar si este no solo afecta a la fertilidad asociada a la dificultad de conseguir una gestación espontánea, si no que empeora los resultados de los tratamientos de fecundación in vitro. Hay pocos estudios en la bibliografía que evidencian que el microbioma afecta a la implantación embrionaria tras un ciclo de FIV y han sido publicados recientemente. La presencia de un microbioma no dominado por *Lactobacillus* se asocia a una menor tasa de implantación, tasa de embarazo, embarazo evolutivo y nacido vivo (27).

Un estudio piloto reciente, presenta el análisis retrospectivo de 65 muestras del tracto reproductivo de 31 mujeres se analizaron con éxito mediante la secuenciación del amplicón del gen 16S rRNA (16 controles y 15 casos). Los miembros dominantes de la comunidad microbiana eran constantes en la vagina y el cuello uterino, aunque las proporciones relativas variaban. Hubo una tendencia a que las mujeres infértiles con mayor frecuencia tuvieran *Ureaplasma* en la vagina y *Gardnerella* en el cuello uterino (37).

Otro estudio piloto (Kyono et al.,2018) (38) tuvo como objetivo analizar el microbioma endometrial y vaginal entre la población infértil japonesa mediante la secuenciación y el impacto del entorno endometrial y vaginal en la implantación embrionaria. En total, se reclutaron 102 pacientes infértiles (79 fecundación in vitro FIV y 23 pacientes sin FIV) y siete voluntarios sanos. Se recogieron muestras de flujo endometrial y de flujo vaginal para secuenciación mediante el uso de un catéter de inseminación intrauterina. Se analizó el estado bacteriano del endometrio y la vagina. La microbiota dominada por *Lactobacillus* (> 90% de *Lactobacillus* spp.) en el endometrio versus vagina fue de 38% versus 44.3% en los pacientes con FIV, 73.9% vs 73.9% en los pacientes sin IVF, y 85.7% vs 85.7% en los voluntarios sanos. El porcentaje de *Lactobacillus* endometrial en voluntarios sanos fue altamente estable dentro del mismo ciclo menstrual e incluso en el ciclo siguiente. Las principales taxonomías fueron *Gardnerella*, *Streptococcus*, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Sneathia*, *Prevotella* y *Staphylococcus*. Quince pacientes lograron el embarazo en una sola transferencia de blastocistos desvitrificados durante este estudio; el porcentaje medio de *Lactobacillus* en mujeres embarazadas fue de  $96.45 \pm 33.61\%$ . Un porcentaje considerable de microbiota no dominada por *Lactobacillus* (NLD) se encontró en el endometrio de mujeres infértiles japonesas. Aumentar el nivel endometrial de los Lactobacilos a más de un 90% podría favorecer el

resultado de la implantación de pacientes infértiles con LND (38)

Un estudio piloto posterior del mismo grupo (Kyono et al.,2019) (39), tuvo como objetivo analizar los resultados del embarazo en pacientes con FIV que presentaban microbiota dominada por *Lactobacillus* (LDM) o microbiota no dominada por *Lactobacillus* (NLDM) de su endometrio y reportar casos que fueron tratados para NLDM simultáneamente con antibióticos y suplementos prebióticos / probióticos En una población infértil japonesa. Se reclutaron 92 pacientes con FIV fueron y se recogieron muestras de líquido endometrial para secuenciar utilizando un catéter IUI. Se analizó la composición bacteriana del endometrio y los resultados del embarazo. Para los casos con NLDM, los antibióticos y los prebióticos / probióticos se administraron de acuerdo con sus condiciones microbianas individuales. 47 casos (51.1%) presentaron LDM y 45 casos (48.9%) presentaron NLDM en el análisis inicial. Nueve pacientes con NLDM fueron tratados con antibióticos y prebióticos / probióticos, y se convirtieron en *Lactobacillus*-dominante con éxito. Los resultados de este estudio no pudieron demostrar el beneficio claro de establecer un endometrio dominado por *Lactobacillus* en términos de resultados del embarazo, pero es importante el conocimiento del estado microbiano endometrial de pacientes infértiles y la recuperación del endometrio dominado por *Lactobacillus* podría beneficiar la implantación (39)

En este estudio preliminar, el predominio de *Lactobacillus* fue favorable en términos de tasa de embarazo, pero el resultado no fue tan significativo como en el estudio de piloto anterior (27); las razones de esto pueden deberse a los limitados números de casos, cortos período de seguimiento, diferencias étnicas o razones específicas en la medicina reproductiva japonesa actual (no se permite el uso de pruebas genéticas de preimplantación para la aneuploidía u donaciones de ovocitos), y el cumplimiento de la transferencia de un solo embrión. Moreno et al (27) informaron que el resultado del embarazo podría predecirse por la abundancia relativa de *Lactobacillus* spp. en fluido endometrial, y <90% de *Lactobacillus* ssp. en el endometrio tuvo un efecto adverso sobre el embarazo. En este estudio, los pacientes clasificados como NLDM, pero con más de 80% de lactobacilos en el endometrio, mostraron buenos resultados de embarazo; por lo tanto, el porcentaje de lactobacilos endometriales > 80% podría ser suficiente para la implantación de embriones. Además, incluso si se clasifica como NLDM, el endometrio dominante de *Bifidobacterium* también podría ser un ambiente aceptable para la implantación (39).

El estudio del microbioma puede llevarse a cabo analizando muestras tomadas en el

endometrio o en la vagina; esta es una de las cuestiones que quedan pendientes de resolver, puesto que los estudios publicados difieren en la localización de las muestras y todavía se hace necesario un consenso para establecer dónde el microbioma nos facilita un valor pronóstico de éxito de los TRA. En relación con esto, se ha publicado un reciente un trabajo (Moreno et al., 2018) concluyen que la microbiota en la cavidad uterina parece ser un continuo de la microbiota en la vagina, pero varios trabajos han reportado diferencias significativas entre la microbiota vaginal y endometrial, destacando la relevancia de evaluar la microbiota del tracto genital superior para comprender mejor los posibles roles de las bacterias en los procesos fisiológicos y patológicos que tienen lugar en la cavidad uterina, incluidos la implantación de embriones, el mantenimiento del embarazo y otras enfermedades ginecológicas. Sin embargo, el estudio de la microbiota endometrial, al igual que con otra microbiota de baja biomasa, presenta importantes obstáculos porque, debido a la pequeña cantidad de material de partida, se contaminan fácilmente con el ADN bacteriano exógeno. Por esta razón, la investigación cuidadosa y apropiada de la microbiota endometrial es de una importancia excepcional para detectar la disbiosis uterina que puede afectar la función reproductiva (40).

En el estudio de Singer et al. (2019) concluyen que las mujeres con una microbiota vaginal anormal tienen aproximadamente 1,4 veces menos probabilidades de embarazo después del tratamiento de FIV en comparación con las mujeres con microbiota normal (41).

Otro aspecto importante, es la valoración tanto de la diversidad, como de la caracterización taxonómica para el grupo de estudio, que, en nuestro caso, incluía pacientes en dos ramas, una, pacientes con antecedentes de fallos repetidos de implantación (RIF) y, por otra parte, las pacientes del grupo sin fallos de implantación, sin fallos repetidos de implantación (NO RIF). En relación con esto, podemos citar el estudio de Kitaya et al., (2019), donde caracterizaron la microbiota en el líquido endometrial (EF) y las secreciones vaginales (VS) en mujeres con RIF. Veintiocho mujeres infértiles con antecedentes de RIF y dieciocho mujeres infértiles sin antecedentes de RIF, que se sometieron al primer intento de transferencia de embriones y fertilización in vitro (el grupo de control). La microbiota del EF tenía una mayor diversidad  $\alpha$  y más especies bacterianas, que la microbiota de las VS, tanto en el grupo RIF como en el control. El análisis de las matrices de distancia UniFrac entre EF y VS también reveló una agrupación significativamente diferente. Además, la microbiota del EF, pero no la microbiota de las VS, mostró una variación significativa en la composición de la comunidad bacteriana, entre el grupo RIF y el grupo control. Las especies de *Burkholderia* spp. no se detectaron en la microbiota del EF de ninguna muestra en el grupo de control, pero fueron detectadas en una

cuarta parte de las pacientes del grupo RIF (42). Si ahondamos en las interrelaciones del microbioma con otros sistemas como el endocrino que pueden modularlo, se ha observado que los factores de fertilidad asociados con el sistema endocrino reproductivo y el ambiente del tracto genital afectan el microbioma vaginal en mujeres en edad reproductiva. Las especies *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Prevotella intermedia*, etc. podrían usarse como biomarcadores para reflejar el estado patológico del aparato reproductor y endocrino reproductivo (43).

Por todo ello, en el marco del presente proyecto, partimos de la hipótesis de que alteraciones en el microbioma vaginal influyen negativamente en la fertilidad de la mujer, más concretamente en la implantación embrionaria. Determinar que microbioma puede considerarse normal o que microorganismos pueden limitar en mayor medida la fertilidad femenina, puede ser la clave para mejorar el pronóstico de los tratamientos de fertilidad.



# JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

---



## 2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

---

A pesar de los conocimientos en la fertilidad humana, así como los tratamientos de reproducción asistida (TRA), todavía existe un gran desconocimiento en relación con el proceso de fecundación, implantación uterina y gestación. En muchas ocasiones, los pacientes no son diagnosticados de forma correcta y se realizan TRA de forma empírica. Esto es así, especialmente en las pacientes con diagnóstico de fallo de implantación. El microbioma vaginal posee un papel muy importante en el mantenimiento de la salud integral de la mujer y se especula que pueda influir en su fertilidad, estando comprendido básicamente por bacterias del género *Lactobacillus spp.* Hasta ahora, ha sido difícil identificar la diversidad de microorganismos empleando técnicas de microbiología convencional. Si bien es conocida la presencia de microbioma en nuestro organismo, la mayoría de los microorganismos de nuestro cuerpo no han podido ser aislados. El empleo de las técnicas de secuenciación masiva junto con el desarrollo de herramientas bioinformáticas que permitan el análisis de datos ha supuesto un gran avance en el conocimiento de la diversidad microbiológica. El objetivo principal del presente estudio es identificar los patrones de microbioma vaginal y endometrial asociados a la tasa de gestación en mujeres sometidas a tratamientos de reproducción asistida.

Este proyecto, se enmarca en un estudio un estudio piloto observacional descriptivo longitudinal de seguimiento de una cohorte, en el cual se incluyen 48 pacientes sometidas a tratamientos de reproducción asistida, con criotransferencia de embriones euploides en fase de blastocisto. Para ello se toman muestras vaginales y endometriales. Las muestras vaginales, en 4 momentos distintos del tratamiento de fertilidad, y una única muestra endometrial, siempre en el ciclo anterior al tratamiento al que se realiza la transferencia. Las muestras vaginales se obtienen mediante torunda seca en fondo de saco posterior mediante visualización directa, y la endometrial mediante el dispositivo *Tao Brush™ IUMC Endometrial Sampler*. A partir de las muestras de exudado vaginal y endometrial, se obtendrá el ADN, empleando el kit de extracción *PureLink microbiome kit® (Thermo Fisher)*. El rRNA16S posee nueve regiones hipervariables (V1-V9) flanqueadas por regiones conservadas. Para el presente trabajo se va a analizar la región hipervariable V3V4. Se obtendrán las librerías de amplicones y para poder secuenciarlas se utilizará el kit *NexteraXT (Illumina)*. Parte del análisis será realizado por el equipo *Miseq* con su *workflow* de trabajo *Metagenomics*. El análisis se completará empleando herramientas como *QIIME2*, *microbiome Analyst* o diferentes paquetes de R. A partir de los resultados anteriores se realizará una comparativa entre pacientes para poder identificar patrones de microorganismos

asociados al embarazo.

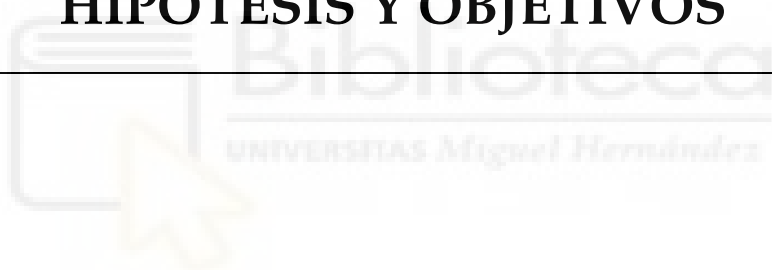
Como resultados del estudio, se espera poder establecer patrones de microbioma vaginal y endometrial que se correlacionen con las tasas de gestación en pacientes sometidas a TRA. Por otra parte, se podrían concretar si determinados patrones de microbioma pueden servir como herramienta para el pronóstico y/o tratamiento de las pacientes diagnosticadas de fallo de implantación recurrente.





## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---



### 3. HIPÓTESIS

---

Existen diferentes patrones de microbioma vaginal y endometrial que se asocian con un peor pronóstico con respecto a las tasas de gestación en mujeres sometidas a tratamientos de reproducción asistida.

### 4. OBJETIVOS

---

#### 4.1 *Principal:*

Identificar los patrones de microbioma vaginal y endometrial asociados a la tasa de gestación en mujeres sometidas a tratamientos de reproducción asistida.

#### 4.2 *Secundarios:*

4.2.1. Comparar los patrones de microbioma vaginal y endometrial en pacientes con diagnóstico de fallo de implantación y sin fallo de implantación.

4.2.2. Analizar en las cuatro muestras la evolución de microbioma vaginal durante un ciclo de tratamiento hormonal sustitutivo en mujeres receptoras de embriones euploides.

4.2.3. Comparar los patrones obtenidos a nivel vaginal y endometrial en la primera muestra.

4.2.4. Identificar la muestra del microbioma que se asocia en mayor medida con la tasa de gestación.

## MATERIAL Y MÉTODO

---

## 5. MATERIAL Y MÉTODO

---

### 5.1 Diseño y tipo de estudio:

Diseño observacional descriptivo longitudinal, tipo de estudio seguimiento de una cohorte, que tienen como objetivo estudiar la evolución natural de una enfermedad para conocer la estabilidad o el cambio de ciertas características, describiendo los resultados observados en un grupo de pacientes que han recibido un tratamiento o una prueba dentro del proceso habitual de atención y/o estimar la incidencia. Estos estudios tienen 2 características comunes. La primera es que la información sobre la enfermedad o la aparición, de cualquier fenómeno se recoge en el tiempo, por lo que se puede relacionar. Y la segunda es que se describe la evolución de la muestra de sujetos de estudio que tienen o presentan una característica común (44).

Se trata de un estudio innovador, debido a que el análisis de las muestras se lleva a cabo mediante una técnica de genética molecular basada en la secuenciación masiva, mediante NGS (*Next Generation Sequencing*). Por ello, esta herramienta nos permite conocer la composición completa de microorganismos. Debido a que el coste del análisis por muestra es muy elevado, la gran mayoría de estudios publicados, tienen tamaño muestral similar o menor a la que abarcamos en este proyecto. Por todo lo anteriormente citado, se ha optado por diseñar un estudio preliminar o piloto, con la finalidad de analizar en una primera fase, los datos obtenidos y valorar si sería viable y pertinente realizar un proyecto más amplio, abarcando un mayor tamaño muestral.

### 5.2 Población de estudio y ámbito:

La población de estudio está formada por pacientes mayores de edad que acudieron a la clínica de fertilidad, Instituto Bernabeu, en su sede de Alicante (Avda. Albufereta, 31) para realizarse un tratamiento con transferencia de embriones euploides, desde mayo del 2017 hasta mayo del 2019.

### **5.3 Selección de la muestra: criterios de inclusión y criterios de exclusión:**

#### Criterios de inclusión:

- Mujeres con edad comprendida entre 18 y 50 años (ley 14/2006 de reproducción humana) (45).
- Tratamiento con análisis genético de embriones por biopsia embrionaria por láser
- Análisis cromosómico mediante NGS (secuenciación masiva).
- Ovocitos propios o donados.
- ICSI (inyección intracitoplasmática de espermatozoides).
- Embriones euploides criopreservados.
- Transferencia de un único embrión euploide en fase de blastocisto.
- Menos de 3 meses previos sin tratamiento antibiótico.
- Aceptación y firma del consentimiento informado.

#### Criterios de exclusión:

- Malformaciones uterinas.
- Hidrosalpinx no tratado.
- Factores conocidos de fallo de implantación.

### **5.4 Tamaño muestral y muestreo:**

Debido al alto coste de la obtención de las muestras, este estudio se enmarca en el contexto de un estudio preliminar o piloto. Se estima un tamaño muestral de 48 pacientes, con el que se puede estimar una proporción de embarazos del 50% con una precisión del 15% y un nivel de confianza del 95%.

#### Muestreo:

La estrategia de muestreo es de tipo no probabilístico consecutivo.

### **5.5 Toma de muestras y método de análisis de muestras:**

#### *- Muestras vaginales:*

Las muestras vaginales se toman obteniendo el flujo vaginal con torunda seca en fondo

de saco posterior mediante visualización directa; la paciente en posición de litotomía, exactamente igual que durante una revisión ginecológica habitual mediante visualización con espéculo vaginal. Se toman 2 muestras vaginales. Resaltar la conveniencia de no utilizar lubricante/gel en el espéculo (posiblemente será preferible usar un espéculo virginal).

La toma se realiza en el día de la transferencia embrionaria antes de la preparación para la misma con el objetivo de que ningún procedimiento pudiera interferir con la toma de muestra. Tras la toma de muestra se realiza la transferencia siguiendo los protocolos establecidos para ello. Todas las muestras se conservaron a -80°C hasta continuar con su análisis posterior.

- *Muestras endometriales:*

Las muestras endometriales se toman mediante el dispositivo *Tao Brush™ IUMC Endometrial Sampler*, ([https://www.cookmedical.com/products/wh\\_es\\_webds/](https://www.cookmedical.com/products/wh_es_webds/)) en fase secretora (día 18-22 del ciclo) en el ciclo anterior. Con este dispositivo se minimiza el riesgo de contaminación durante la obtención de la muestra endometrial. Todas las muestras se conservaron a -80°C hasta continuar con su análisis posterior.

Se resumen la toma de muestras en las distintas etapas del tratamiento de fecundación in vitro:

- 1ª Muestra: Fase secretora el ciclo anterior del tratamiento (muestra vaginal y endometrial)
- 2ª Muestra: Día de la transferencia embrionaria (muestra vaginal)
- 3ª Muestra: Día de la determinación de prueba de embarazo (muestra vaginal)

	<b>MUESTRA 1</b>	<b>MUESTRA 2</b>	<b>MUESTRA 3</b>
	<b>2º Fase ciclo anterior</b>	<b>Día transferencia</b>	<b>Día bhCG</b>
VAGINAL (Torunda vaginal)	X2	X2	X2
ENDOMETRIAL (Tao Brush)	X1	NO	NO

**Tabla 1:** toma de muestras durante el estudio. Las muestras vaginales se toman por duplicado (X2).

Existen diferentes enfoques dentro de los estudios de metagenómica para conocer la diversidad microbiológica de una comunidad: secuenciación de genomas completos o secuenciación de genes marcadores como por ejemplo el rRNA 16S. La secuenciación de genomas completos permite obtener gran cantidad de información, permitiendo la identificación taxonómica y la caracterización de la diversidad microbiana; se puede llegar a conocer la información funcional y genética de cada microorganismo; también proporciona información de las funciones potenciales en las comunidades microbianas. Sin embargo, su principal limitación es que la profundidad de secuenciación no es suficiente para detectar las especies menos representadas en la población (46).

Por otro lado, el empleo de genes marcadores como el rRNA 16S supone importantes ventajas puesto que es más sensible que la secuenciación del genoma completo debido a que la cantidad de material para secuenciar es menor y se puede alcanzar mayor profundidad en la secuencia que permiten identificar microorganismos cuya presencia en la muestra de estudio es pequeña. Además, el rRNA 16S se encuentra presente en todas las especies de los dominios Bacteria y Archaea, posee regiones altamente variables útiles para la clasificación taxonómica y por último es el único marcador taxonómico lo suficientemente informativo del que se disponen bases de datos calidad contrastada. Permite evaluar los microorganismos presentes en las comunidades microbianas, pero no aporta información funcional o genética. La secuenciación de los genes 16S rRNA es el principal método para hacer un censo de una comunidad porque permite la identificación de microorganismos poco abundantes (47)

Los datos generados por la secuenciación deben procesarse y organizarse en grupos denominados unidades taxonómicas operativas (OTU) mediante el mapeo de la secuencia 16S a las bases de datos taxonómicas disponibles públicamente. Las OTU se utilizan para determinar la composición y diversidad de la muestra. Varios paquetes de software de fuente abierta ayudan con el procesamiento y análisis de la bioinformática. Las lecturas mapeadas resultantes permitirán determinar la presencia o ausencia de material genético microbiano.

En el presente trabajo vamos a seleccionar como método a seguir el empleo de la metagenómica, estudiando el gene marcador rRNA16S de las muestras incluidas en el estudio y serán analizadas mediante NGS. El análisis de muestras del estudio será llevado a cabo en el laboratorio de genética molecular de IB Biotech perteneciente a

Instituto Bernabeu en su sede de Alicante.

### **Extracción de ADN**

La extracción de ADN se realizó utilizando el *PureLink Microbiome DNA Purification Kit* (Thermo Fisher, *PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit*, Darmstadt, Alemania y / o sus filiales). El ADN se cuantificó usando un fluorómetro *Qubit 2.0* (Thermo Fisher). El ADN extraído se almacenó a -20 ° C para su uso posterior.

### **Amplificación de la región V3V4 del gen de rRNA 16S**

La amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la región variable V3V4 del gen del rRNA 16S se realizó utilizando Taq DNA polimerasa (2 × KAPA HiFi HotStart, Roche, Rotkreuz, Suiza) en presencia de dNTP, así como oligonucleótidos 357F y 806R, a una concentración final de 1 µM y un promedio de 100 ng de ADN, y a un volumen de reacción final de 25 µL, siguiendo las recomendaciones de Illumina (Preparación de biblioteca de secuenciación metagenómica 16S). La PCR se llevó a cabo en un termociclador (*Verity, Applied Biosystems*, San Francisco, CA, EE. UU.). Para la validación de la técnica de PCR, todas las reacciones de amplificación incluyeron controles positivos y negativos sin moldes de ADN. Los productos de la PCR se visualizaron mediante electroforesis en agarosa, verificando que la banda de ADN amplificado fuera del tamaño correcto (449 pares de bases).

### **Secuenciación de la región V3V4 del gen de rRNA 16S**

Una vez obtenido y purificado el amplicón V3V4, generamos la biblioteca con los índices identificativos de cada muestra utilizando el kit de secuenciación *Nextera XT* (Illumina). Después de la purificación de las bibliotecas, las muestras, que fueron previamente diluidas a una concentración de 4 nM antes de ser mezcladas y preparadas para secuenciación, se cuantificaron utilizando un Fluorómetro *Qubit 2.0* (Thermo Fisher). La concentración final de la biblioteca fue de 15 pM. La biblioteca se secuenció utilizando reactivos *MiSeq Reagent Kit v3* (Illumina). Utilizamos *MiSeq* (Illumina) como equipo de secuenciación y para la metagenómica del flujo de trabajo.



## 5.6 Definición de variables.

La variable exposición es el microbioma y la variable respuesta es el resultado de la ecografía post-fiv (primera ecografía tras el tratamiento de fertilidad). A continuación, se muestran todas las variables recogidas en el estudio:

Variable	Medición	Descripción	Codificación
Código	Cuantitativa discreta	Código asignado a cada paciente	
Número de muestra	Cuantitativa discreta	Número asignado a cada muestra del estudio.	
Historia codificada	Cuantitativa discreta	Número de historia clínica de cada paciente	
Visita	Cualitativa categórica ordinal	Número de visita (1 al 4) en la cual se toma dicha muestra	1=visita 1 2=visita 2 3=visita 3 4=visita 4
RIF	Cualitativa dicotómica	Si la paciente tiene o no diagnóstico de fallo recurrente de implantación	0=No RIF 1=RIF
Raza	Cualitativa	Raza (Etnia) de la paciente	
Edad	Cuantitativa continua	Edad en años de la paciente	
Peso	Cuantitativa continua	Peso en kilos de la paciente	
Altura	Cuantitativa E continua	Altura en metros de la paciente.	
Fumadora	Cualitativa Dicotómica	Si tiene o no hábitos tóxicos de tabaquismo la paciente	0=no 1=si
Gestación previa	Cualitativa E. Nominal	Si ha gestado o no la paciente previo al tratamiento del estudio.	0=no 1=si
Aborto previo	Cualitativa E. Nominal	Si ha sufrido algún aborto previo al tratamiento del estudio.	0=no 1=si
N.º abortos previos	Cuantitativa discreta	Número de abortos previos a ser incluida en el estudio.	
Origen ovocitario	Cuantitativa discreta	Origen de los ovocitos. Si proceden de donación o son propios de la paciente.	0=propio 1=donado
Origen seminal	Cualitativa dicotómica	Origen de la muestra seminal. Si procede de banco de semen o del cónyuge.	0=propio 1=donado
Tratamientos previos	Cualitativa E. Nominal	Si se ha sometido o no a tratamientos de TRA previos	0=no 1=si
Calidad seminal	Cualitativa E. Ordinal	Calidad seminal de la muestra utilizada en el tratamiento del estudio.	0=normo 1=Oligozoospermia 2=Astenozoospermia 3=Teratozoospermia 4=Necrozoospermia 5=Criptozoospermia 6=OTA

THS/CN	Cualitativa E. Nominal	Preparación endometrial con tratamiento hormonal sustitutivo o ciclo natural.	0=THS 1=Ciclo natural
Grosor endometrial	Cuantitativa continua	Grosor endometrial en milímetros del endometrio previo a la transferencia en el tratamiento de estudio.	
$\beta$ -hCG	Cualitativa dicotómica	Resultado positivo o negativo de la prueba de embarazo ( $\beta$ -hCG (hormona coriónica humana))	0=negativa 1=positiva
Valor de la $\beta$ -hCG	Cuantitativa continua	Valor del resultado del análisis en sangre de la $\beta$ -hCG (hormona coriónica humana) en mUI/ml	
Embarazo	Cualitativa E. Nominal	Embarazo clínico	0=no 1=si
Eco post-fiv (variable respuesta)	Cualitativa E. Nominal	Si se visualiza o no saco/s gestacional en la primera ecografía tras el tratamiento de fertilidad.	0=no 1=si
Nº sacos	Cuantitativa discreta	Número de sacos que se observan en la primera ecografía después del tratamiento.	
Aborto tras tratamiento	Cualitativa E. Nominal	Si se produce aborto tras el tratamiento del estudio	0=no 1=si
Tipo de aborto	Cualitativa E. Nominal	Tipo de aborto (si se produce) tras el tratamiento del estudio	0=bioquímico 1=clínico
MICROBIOMA (variable exposición)	Cuantitativa	Composición (%) de microorganismo de una determinada muestra vaginal/endometrial.	

## 5.7 Estrategia de análisis bioinformático y estadístico:

### Análisis bioinformático de las secuencias:

El análisis principal de las secuencias obtenidas consistió en demultiplexación, utilizando el software *MiSeq Reporter* (Illumina). Las secuencias de extremos emparejados no indexadas de cada muestra se exportaron desde el sistema MiSeq en formato FASTQ para el análisis. El análisis bioinformático de las secuencias se realizó mediante el paquete QIIME2. También se realizaron más análisis de datos con el software *MicrobiomeAnalyst*. Deblur se utilizó para filtrar y eliminar los ruidos de las secuencias con QIIME2. Las secuencias se agruparon en unidades taxonómicas operativas (OTU) con un porcentaje de similitud del 97%. Para estimar la diversidad alfa, es decir, el número de especies diferentes presentes en la muestra, se realizó un análisis de rarefacción en 1000 secuencias por muestra, seguido de un análisis de diversidad alfa. Para ayudar en las comparaciones de la diversidad alfa, las diferencias en los tamaños de las bibliotecas entre las muestras se ajustaron mediante el método de rarefacción. Se utilizaron tres índices diferentes: Shannon, Simpson y Faith. Dado que estos índices no siguieron una distribución normal, se utilizó el método no paramétrico U de Mann-Whitney.

El índice de Shannon cuantifica los diferentes tipos de taxones presentes en la comunidad y considera la riqueza y equidad de las especies. Sin embargo, si dos sitios son igualmente ricos en especies, con un sitio dominado por una sola especie y el otro mostrando más uniformidad, el segundo claramente se consideraría más diverso.

Los resultados para la diversidad beta se visualizaron con QIIME2 utilizando los gráficos generados por el análisis de coordenadas principales (PCoA), obtenidos con EMPEROR. Realizamos el análisis de la diversidad beta utilizando el índice UniFrac no ponderado. La diversidad beta expresa la composición en términos de la abundancia de diferentes taxones entre las muestras. UniFrac es una medida de diversidad beta que usa información filogenética para comparar muestras pertenecientes a los grupos de interés, en este caso, cuatro; la versión no ponderada es cualitativa. Por lo tanto, UniFrac mide la concordancia en función de la abundancia de OTU en cada muestra, incluidas las distancias filogenéticas. Las matrices con medidas de diversidad beta se analizaron utilizando PERMANOVA para las diferencias de composición según el grupo al que pertenecían (tipo de muestra). La asignación taxonómica se realizó utilizando una clasificación basada en un filtrado de la secuencia 99\_otus de la base de datos de Greengenes a la región V3V4. Finalmente, realizamos el análisis univariado de cada taxón o grupo especificado de acuerdo con los resultados que obtuvimos, utilizando la corrección para pruebas múltiples.

#### Análisis estadístico:

Se realizó un análisis descriptivo de todas las variables mediante el cálculo de frecuencias para los parámetros cualitativos y mínimos, máximos, medias y desviaciones estándar (DE) para las variables cuantitativas. Para compararlas, utilizamos la prueba t de Student paramétrica o la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica, según corresponda. Los patrones de microbioma, así como las muestras vaginales y endometriales, se compararon entre los grupos de acuerdo con las variables de resultado, utilizando tablas de doble entrada para las variables cualitativas y la prueba de chi-cuadrado. Para variables cuantitativas, la prueba t de Student se utilizó para evaluar la asociación entre los patrones del microbioma y los resultados clínicos del embarazo. Se construyó un modelo lineal de efectos mixtos para determinar la evolución del patrón del microbioma vaginal y su asociación con la tasa de embarazo clínico y el diagnóstico de RIF. Los análisis se realizaron utilizando R v.3.5.1.

## **RESULTADOS**

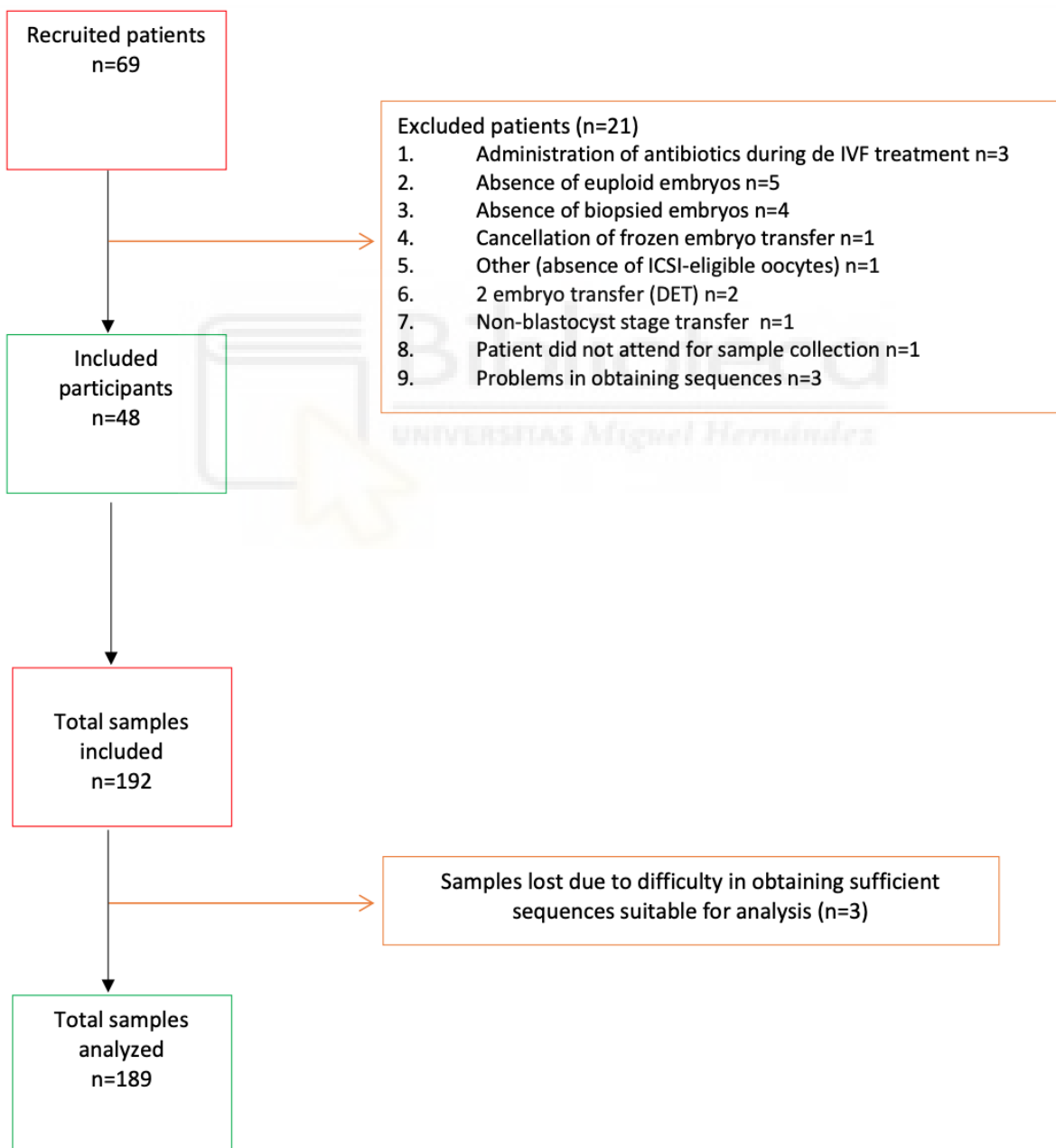
---



## 6. RESULTADOS

---

El estudio incluyó a 48 participantes, que proporcionaron 192 muestras, de las cuales se obtuvieron 189 secuencias aptas para el análisis. La Figura 1, detalla el número de mujeres y muestras incluidas inicialmente en el estudio, junto con las pérdidas y los datos y análisis de inclusión neta.



**Figura 1.** Diagrama de flujo del estudio.

La Tabla 1 muestra las características basales de los participantes del estudio, cuya edad media fue de 39,44 años. Un total de 26 mujeres (54,2%) dieron positivo en la prueba de embarazo de  $\beta$ -hCG durante el estudio, y 21 lograron un embarazo clínico (43,8%); de estas, el 38,9% (n=8) tenían antecedentes de abortos espontáneos, en comparación con el 70,0% (n=19) de las que no quedaron embarazadas ( $p=0,034$ ). Las tasas de aborto espontáneo bioquímico y clínico fueron 10,4% (n = 5) y 14,28% (n=7), respectivamente.

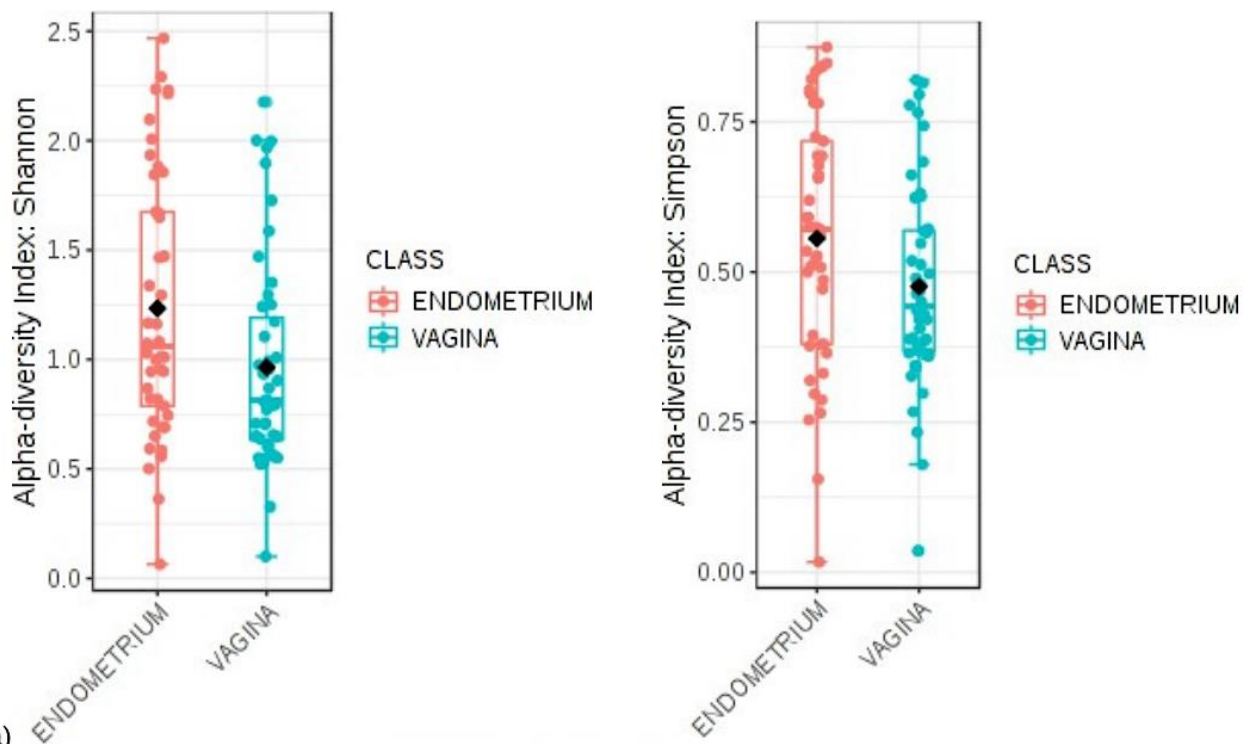
Variables	Total Women N = 48	Pregnancy N = 21	No Pregnancy N = 27	p-Value
Age, years, mean (SD)	39.44 (3.82)	38.28 (3.39)	40.13 (3.95)	0.092
Weight, kg, mean (SD)	63.41 (9.79)	59.57 (7.98)	64.69 (10.16)	0.194
Height, cm, mean (SD)	162.33 (6.89)	160.25 (10.41)	163.09 (5.22)	0.481
Tobacco user, n (%)	7 (14.29)	4 (16.7)	3 (11.1)	0.598
N of previous pregnancies, mean (SD)	0.67 (0.60)	0.56 (0.51)	0.73 (0.64)	0.296
Previous miscarriages, n (%)	28 (58.33)	9 (38.90)	19 (70.0)	0.034
N of previous miscarriages, mean (SD)	1.44 (1.80)	1.11 (1.79)	1.63 (1.81)	0.334
Previous treatments, n (%)	37 (77.08)	15 (72.20)	22 (80.0)	0.535
Semen analysis, normozoospermia, n (%)	37 (77.08)	17 (83.30)	20 (73.30)	0.617
Donated semen, n (%)	10 (20.83)	5 (22.20)	5 (20.0)	0.854
Endometrial thickness, mm, mean (SD)	8.40 (2.04)	8.54 (2.01)	8.32 (2.09)	0.725
Repeated implantation failures, n (%)	23 (47.9)	5 (23.81)	18 (66.66)	

SD: standard deviation.

**Tabla 1.** Características basales en mujeres que lograron y no lograron un embarazo clínico.

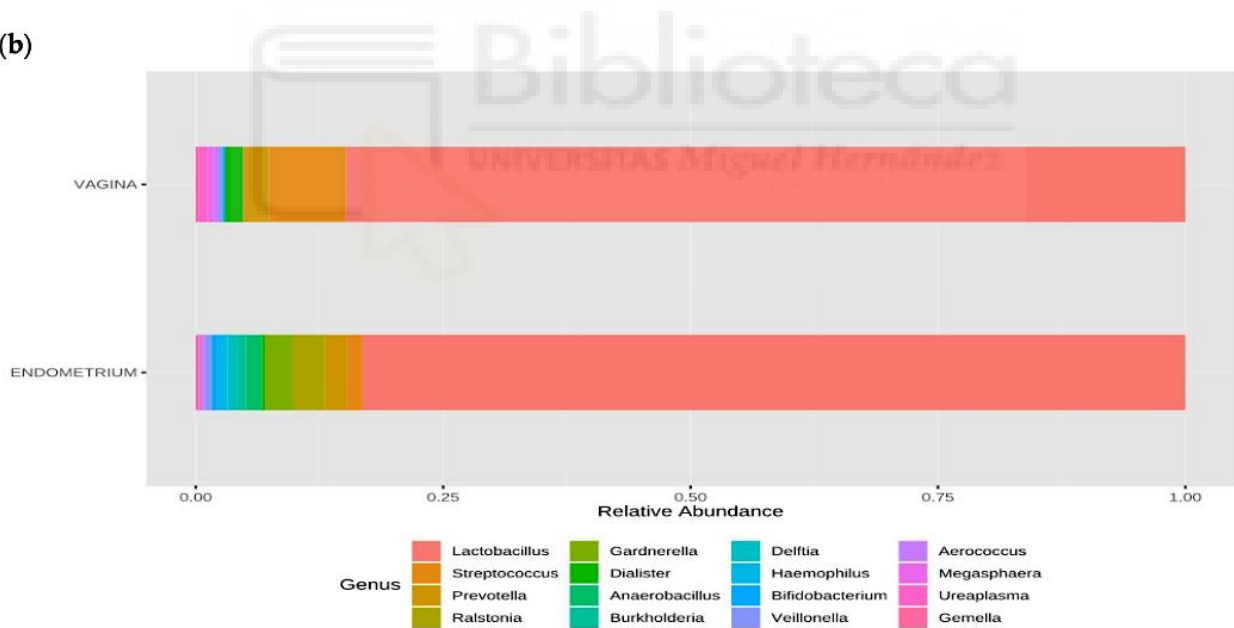
### 6.1 Diferencias entre los patrones de microbioma vaginal y endometrial.

Encontramos diferencias estadísticamente significativas en la diversidad alfa de microbiomas endometriales versus vaginales ( $p=0.014$  para el índice de Shannon  $p=0.046$  para el índice de Simpson), con valores más altos en las muestras de endometrio (Figura 2a). Utilizando PERMANOVA, la diversidad beta de las muestras mostró diferencias estadísticas en la composición entre los microbiomas vaginales y endometriales ( $p = 0,001$ ).



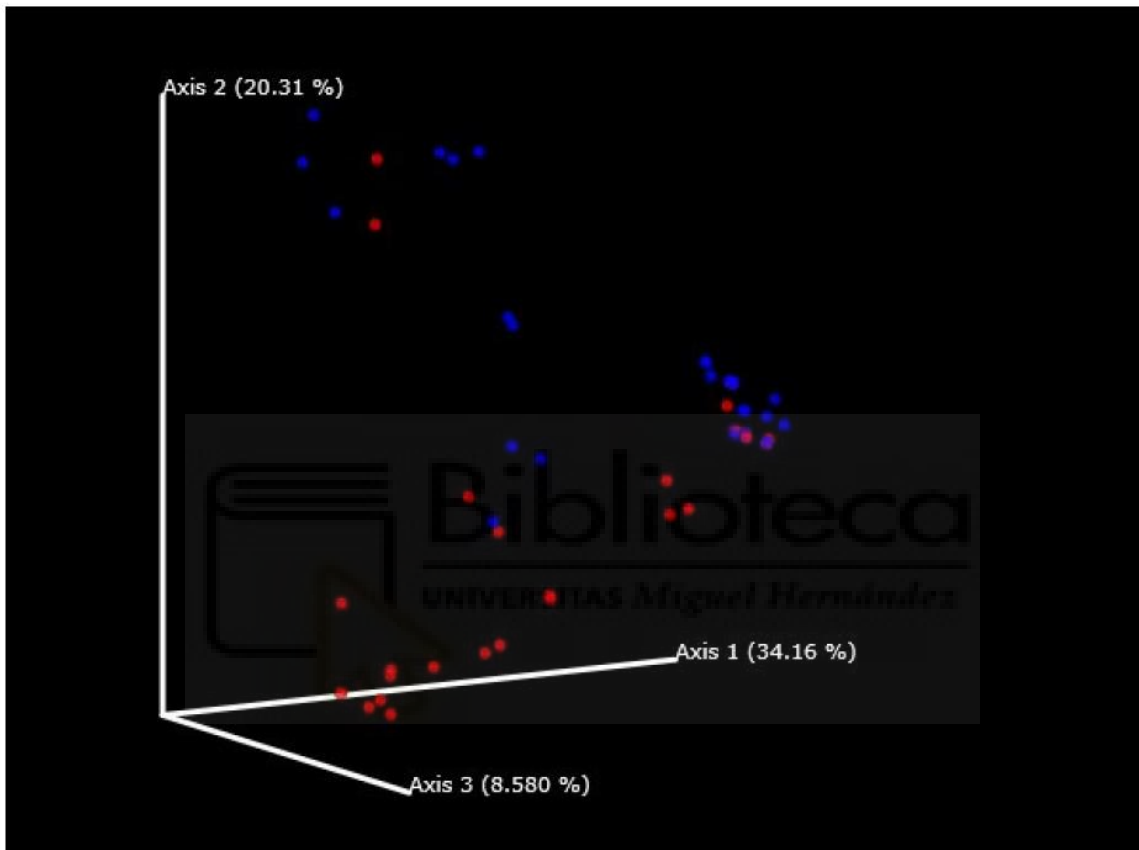
(a)

(b)



**Figura 2.** Patrones microbianos vaginales y endometriales durante la fase secretora del ciclo anterior al FET (días 18-22 del ciclo). (a) Análisis comparativo del índice de diversidad de Shannon y el índice de diversidad de Simpson para las mujeres del estudio en relación con el estudio de la diversidad alfa. (b) Gráfico de barras de MicrobiomeAnalyst MDP de las frecuencias relativas de los géneros más abundantes, agrupados por tipo de muestra.

El UniFrac PCoA no ponderado reveló un patrón claro de separación entre las muestras vaginales y endometriales (Figura S1). Las muestras de endometrio se agrupan en el extremo derecho del gráfico. El porcentaje de la varianza explicada por cada componente se muestra en los ejes (componente principal (PC) 1: 34,16%; PC2: 20,31%; PC3: 8,58%). Los componentes primero y segundo podrían explicar juntos más del 50% de la variabilidad entre las muestras.



**Figura S1:** El UniFrac PCoA no ponderado, basado en la matriz de distancia UniFrac, que representa las muestras de estudio con diferentes colores según las muestras: vaginal (rojo) o endometrial (azul), QIIME2.



En cuanto a la caracterización taxonómica de las muestras durante la fase secretora del ciclo previo a la FET, hubo una clara dominancia del género *Lactobacillus* tanto en el microbioma vaginal como en el endometrial.

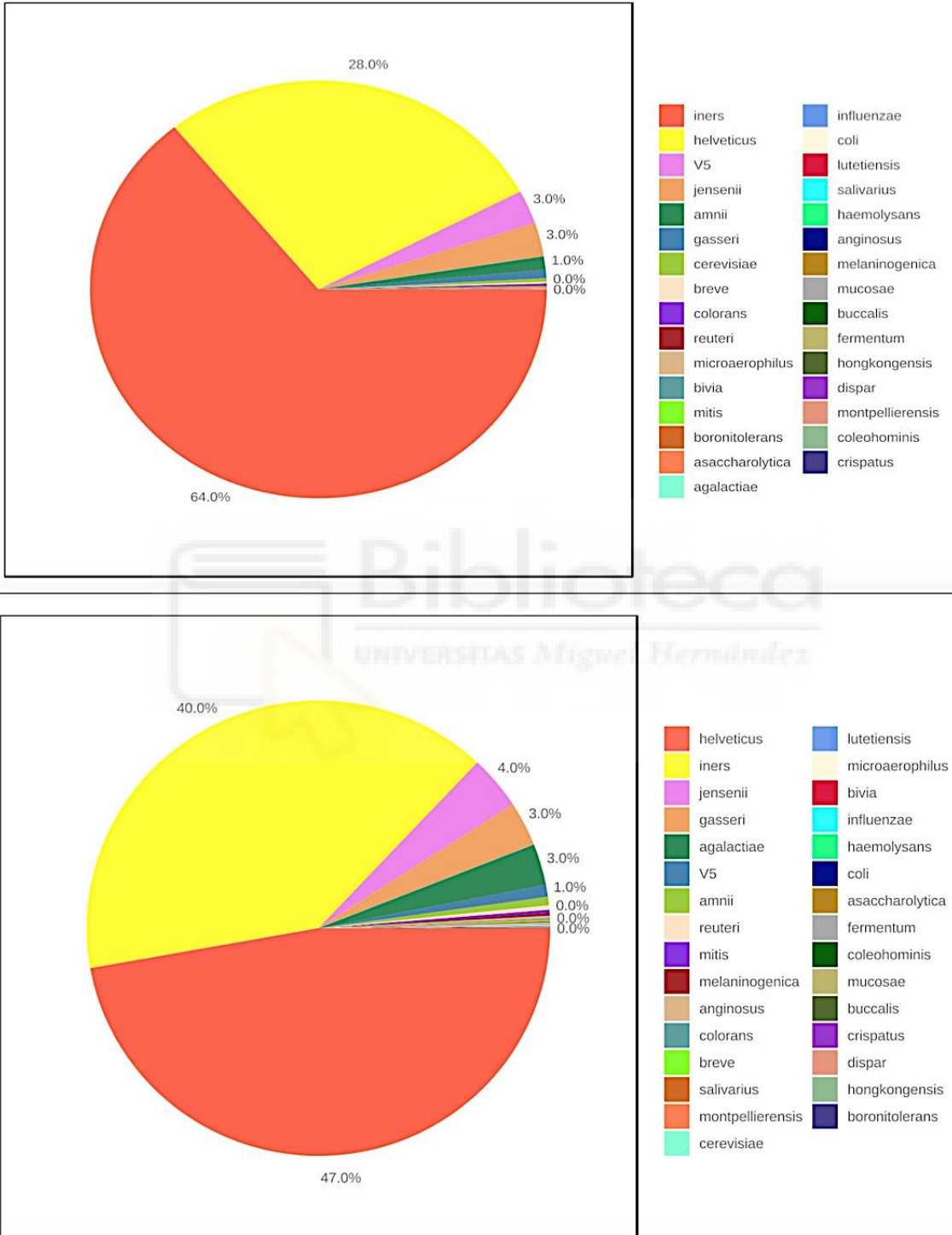
Las frecuencias relativas de los géneros más abundantes agrupados por tipo de muestra (vaginal/endometrial) se muestran en la Figura 2b. Los perfiles de microbioma mostraron diferencias relativas en géneros y especies presentes en las muestras vaginales y endometriales.

El análisis univariado alcanzó significación estadística para *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Ureaplasma* spp., *Delftia* spp., *Anaerobacillus* spp. Y *L. helveticus*. Varios géneros fueron más abundantes en la vagina que en el endometrio: *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Ureaplasma*.

Los géneros restantes fueron más abundantes en el endometrio (Tabla 2).

Genus	Endometrium	Vagina	p-Value
<i>Lactobacillus</i> spp.	83.17%	84.82%	0.003
<i>Delftia</i> spp.	0.95%	0.00%	0.004
<i>Anaerobacillus</i> spp.	1.59%	0.00%	0.004
<i>Ralstonia</i> spp.	3.17%	0.00%	0.004
<i>Ureaplasma</i> spp.	0.00%	0.89%	0.006
<i>Streptococcus</i> spp.	1.59%	7.74%	0.019

**Tabla 2.** Diferencias en los géneros presentes en los perfiles del microbioma en muestras vaginales y endometriales.



**Figura S2:** Gráfico circular de la frecuencia relativa de las especies más abundantes para cada tipo de muestra.

La Figura S2 muestra la frecuencia relativa de las especies más abundantes para cada tipo de muestra. *Lactobacillus iners* presenta una mayor abundancia relativa en muestras de endometrio, sin diferencia significativa (64% versus 40% en muestras vaginales).

Hubo una diferencia significativa en la abundancia de *L. helveticus* : 28% en el endometrio versus 47% en la vagina ( $p = 0.013$ ).

## 6.2 Evolución del microbioma vaginal

No hubo diferencias estadísticamente significativas en la diversidad alfa o beta entre las muestras en los diferentes puntos de tiempo.

Con respecto a la caracterización taxonómica, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre puntos de tiempo para la composición de géneros o especies (figura 3).

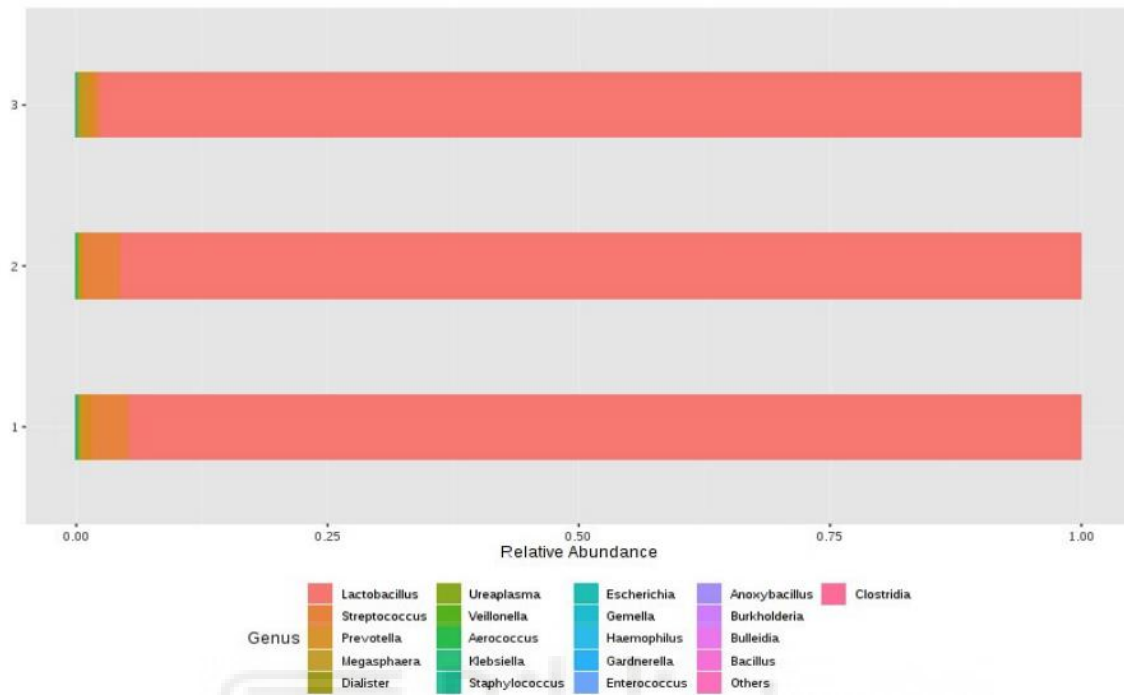
Hubo algunos cambios aparentes en la abundancia de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Prevotella*: tanto *Lactobacillus* como *Streptococcus* fueron más abundantes en las muestras vaginales recolectadas durante la fase secretora del ciclo y el día de la transferencia embrionaria, mostrando una disminución en el día de la prueba de embarazo; por otro lado, *Prevotella* mostró una alta abundancia durante la fase secretora del ciclo, e incluso mayor el día de la prueba de embarazo.

Sin embargo, el análisis univariado no mostró diferencias estadísticamente significativas. A nivel de especie, encontramos algunas diferencias en la abundancia relativa de las siguientes especies: *L. helveticus*, *L. iners*, *L. gasseri* y *L. jensenii* (figura 3).

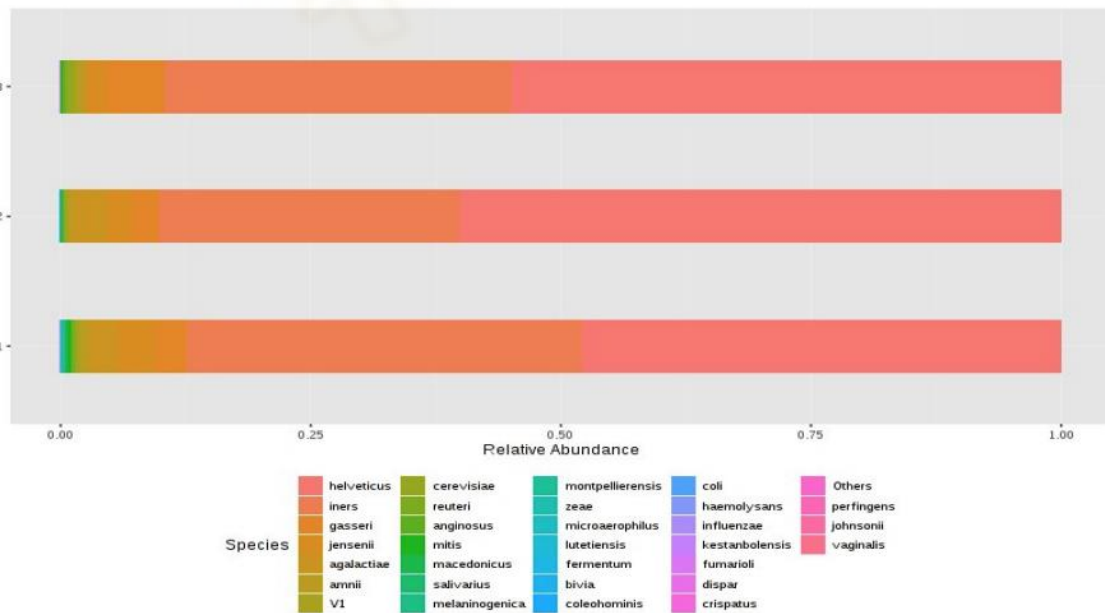
Las especies más abundantes fueron *L. helveticus* el día de la transferencia embrionaria, *L. iners*, durante la fase secretora del ciclo, y *L. gasseri* el día de la prueba de embarazo.

El día de la prueba de embarazo, los resultados mostraron una menor proporción de *L. jensenii*. Sin embargo, ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa.

a



b



**Figura 3.** MicrobiomeAnalyst MDP gráfico de barras de la frecuencia relativa de los más abundantes (a) géneros y (b) especies, agrupadas por punto de tiempo en el ciclo.

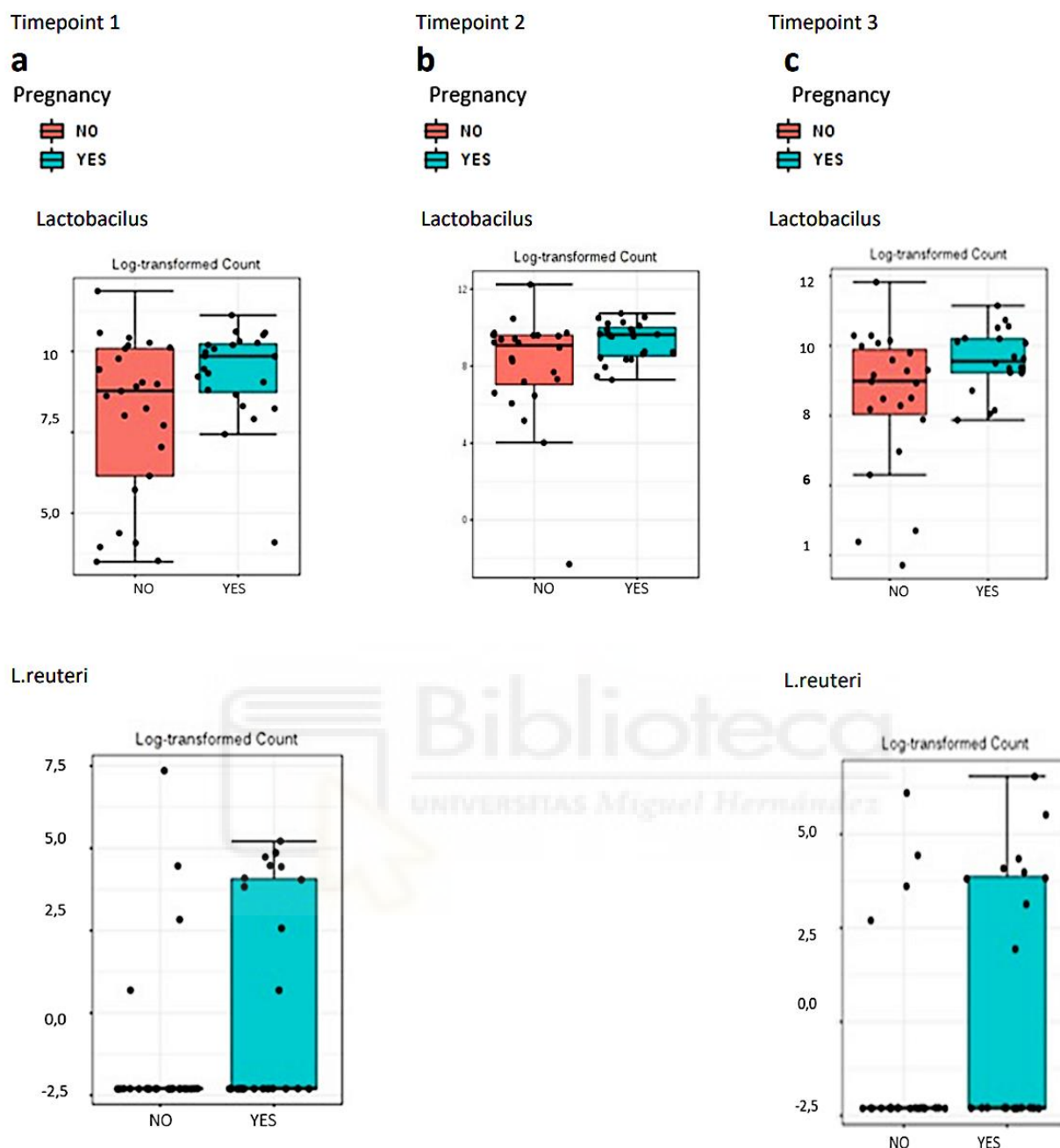
## 6.3 Patrones de microbioma asociados con el embarazo clínico después de FET

### 6.3.1 Patrón de microbioma vaginal

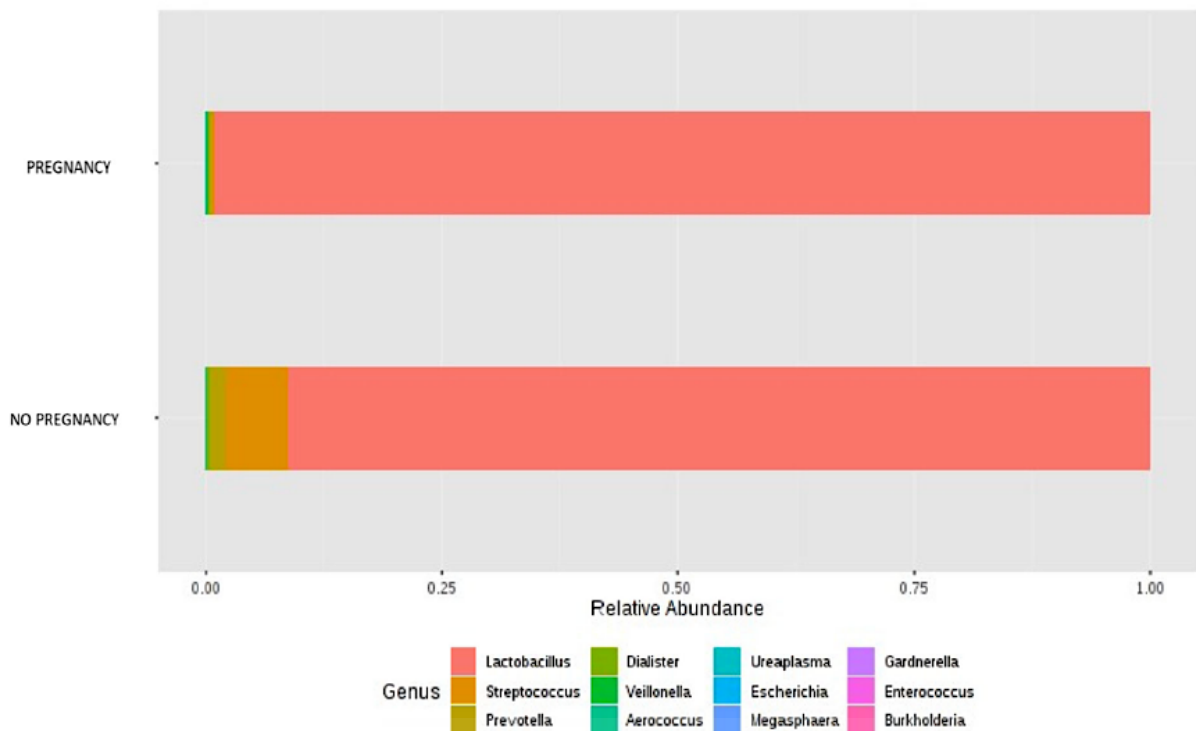
Analizando la diversidad en función de la tasa de embarazo clínico después de la FET, encontramos una mayor diversidad alfa en las mujeres que no quedaron embarazadas, aunque la tendencia no alcanzó significación estadística (Shannon  $p=0,075$  y Simpson  $p=0,086$ ). Con respecto a la diversidad beta de las muestras vaginales recolectadas durante la fase secretora del ciclo, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las mujeres que quedaron embarazadas y las que no. Para las muestras recolectadas el día de la transferencia de embriones, tampoco encontramos diferencias estadísticamente significativas en la diversidad alfa o beta entre estos grupos. Sin embargo, hubo una tendencia que sugiere una correlación negativa entre la tasa de embarazo clínico y la diversidad alfa ( $p=0,152$ ). Las muestras vaginales tomadas el día de la prueba de embarazo no mostraron diferencias en la diversidad alfa o beta.

En cuanto a la caracterización taxonómica, las mujeres que quedaron embarazadas presentaron una abundancia significativamente mayor de *Lactobacillus spp.* en muestras vaginales recolectadas durante la fase secretora del ciclo previo a la FET, en comparación con las que no quedaron embarazadas.

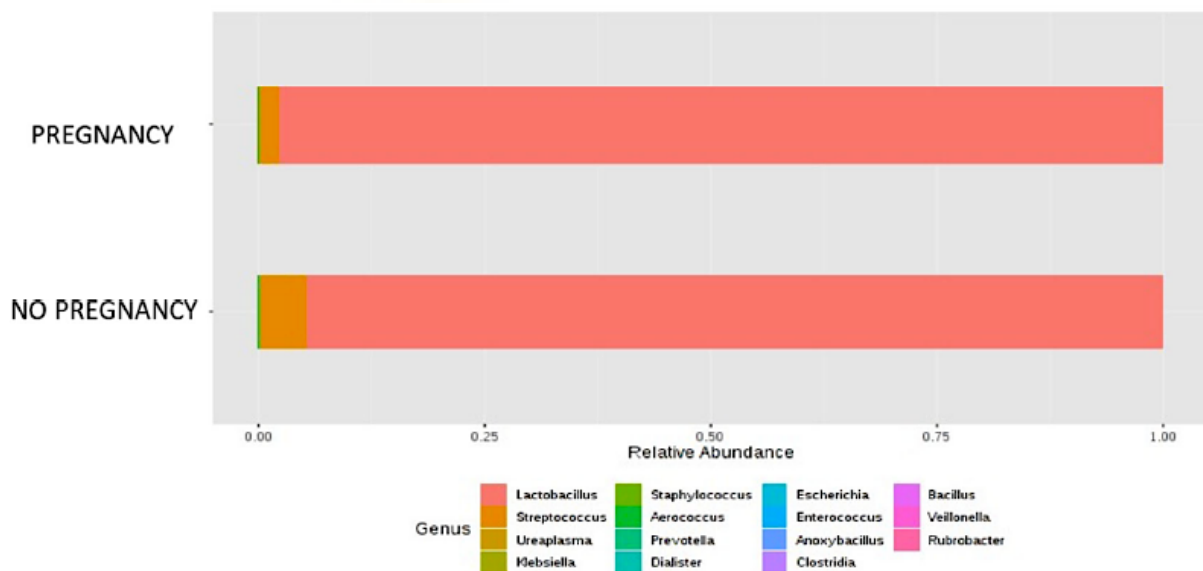
Por otro lado, *Streptococcus spp.* y *Prevotella spp.* fueron más abundantes en el último grupo (Figura S3). Las diferencias se observaron a nivel de género para *Lactobacillus spp.* (91% sin gestación vs 99% con gestación;  $p=0.045$ ) y a nivel de especie para *L. reuteri* (0.39% vs 0.17%;  $p=0.040$ ; Figura 4a). Se obtuvieron resultados similares para las muestras recolectadas el día de la transferencia de embriones. Las mujeres que lograron un embarazo clínico presentaron una mayor abundancia relativa de *Lactobacillus spp.* que los que no lo hicieron (97,69% versus 94,63%;  $p=0,027$ ; Figura 4 y Figura S4); lo contrario fue cierto para el caso de *Streptococcus spp.* (Figura S4). Para las muestras vaginales recolectadas el día de la prueba de embarazo, los hallazgos fueron similares (Figura S5). El análisis univariado mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.049$ ) para el género *Lactobacillus spp.* (99,74% con gestación versus 97,73% sin) y la especie *L. reuteri* (0,30% versus 0,15%, respectivamente;  $p=0,059$ ; Figura 4C).



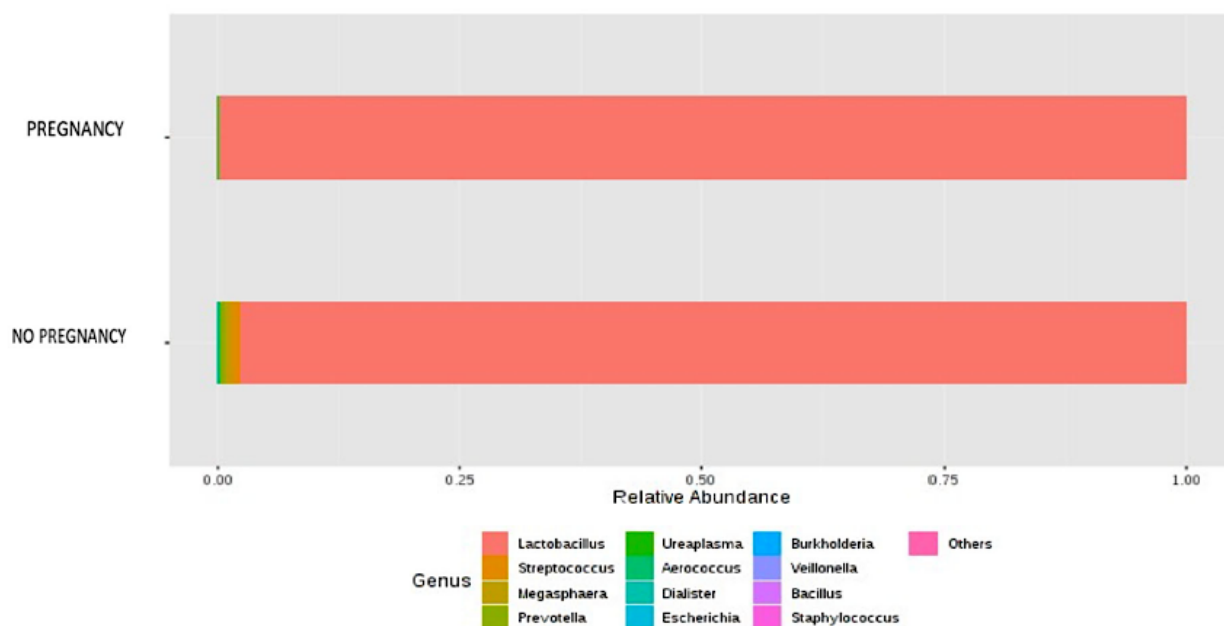
**Figura 4.** Asociación de las muestras vaginales tomadas en diferentes momentos con la tasa de gestación. (a) Análisis univariante representado con un diagrama de caja que muestra la abundancia relativa de *Lactobacillus spp.* (0.045) y *L. reuteri* ( $p = 0.040$ ) para la tasa de gestación durante la fase secretora del ciclo anterior a la transferencia de embriones congelados (días 18-22 del ciclo). (b) Análisis univariante representado con un diagrama de caja que muestra la abundancia relativa del género *Lactobacillus spp.* (0,027) para la tasa de gestación el día de la transferencia del embrión. (c) Análisis univariante representado con un diagrama de caja que muestra la abundancia relativa de *Lactobacillus spp.* ( $p= 0.049$ ) y *L. reuteri* ( $p = 0.059$ ) para la tasa de gestación el día de la prueba de embarazo.



**Figura S3:** Gráfico de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes, agrupados por tasa de gestación durante la fase secretora del ciclo anterior a la transferencia de embriones congelados (días 18-22 del ciclo), MicrobiomeAnalyst MDP;



**Figura S4:** Gráfico de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes, agrupados por tasa de gestación para el segundo momento, MicrobiomeAnalyst MDP;



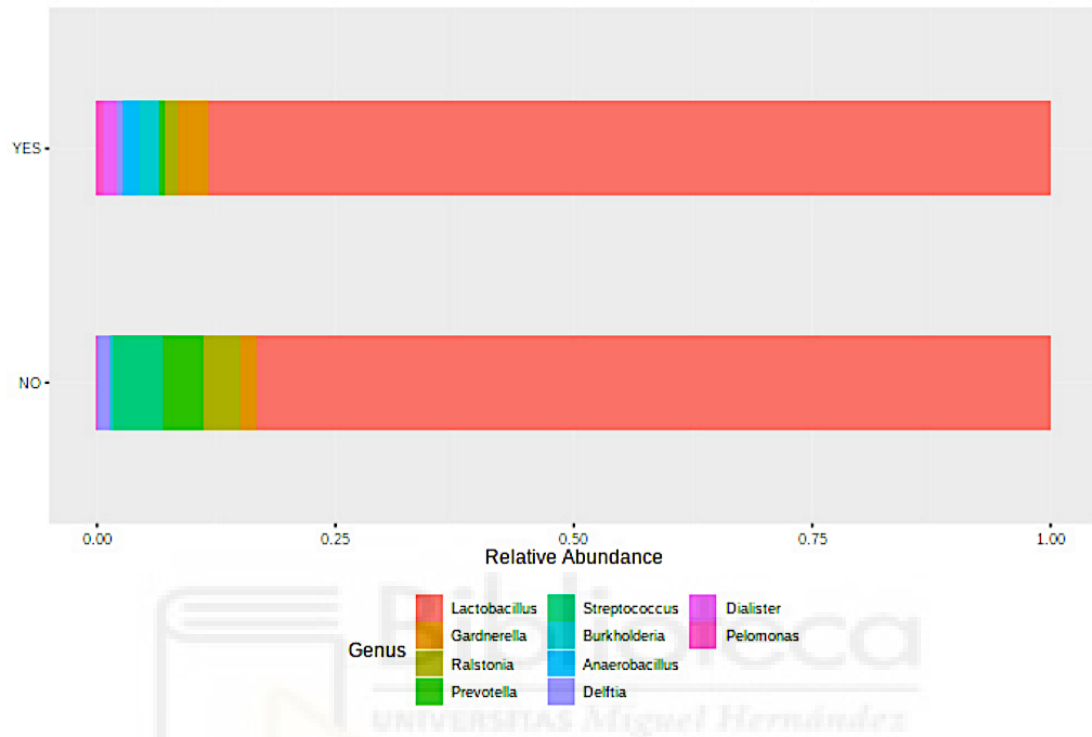
**Figura S5:** Gráfico de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes, agrupados por tasa de gestación el día de la prueba de embarazo, MicrobiomeAnalyst MDP.

### 6.3.2 Patrón de microbioma endometrial

Con respecto a la diversidad alfa y beta de las muestras de endometrio recolectadas durante la fase secretora del ciclo anterior a la TEC, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre mujeres embarazadas y no embarazadas.

Figura 5, muestra la caracterización taxonómica de muestras de endometrio según el resultado del embarazo; las mujeres que lograron un embarazo clínico tuvieron mayor abundancia de *Lactobacillus* spp., *Gardnerella* spp., *Burkholderia* spp. y *Anaerobacillus* spp.; en contraste, *Streptococcus* spp., *Ralstonia* spp., *Prevotella* spp. y *Delftia* spp. fueron más abundantes en mujeres que no quedaron embarazadas; sin embargo, el análisis univariado no mostró diferencias significativas en la abundancia relativa de estos géneros entre grupos.



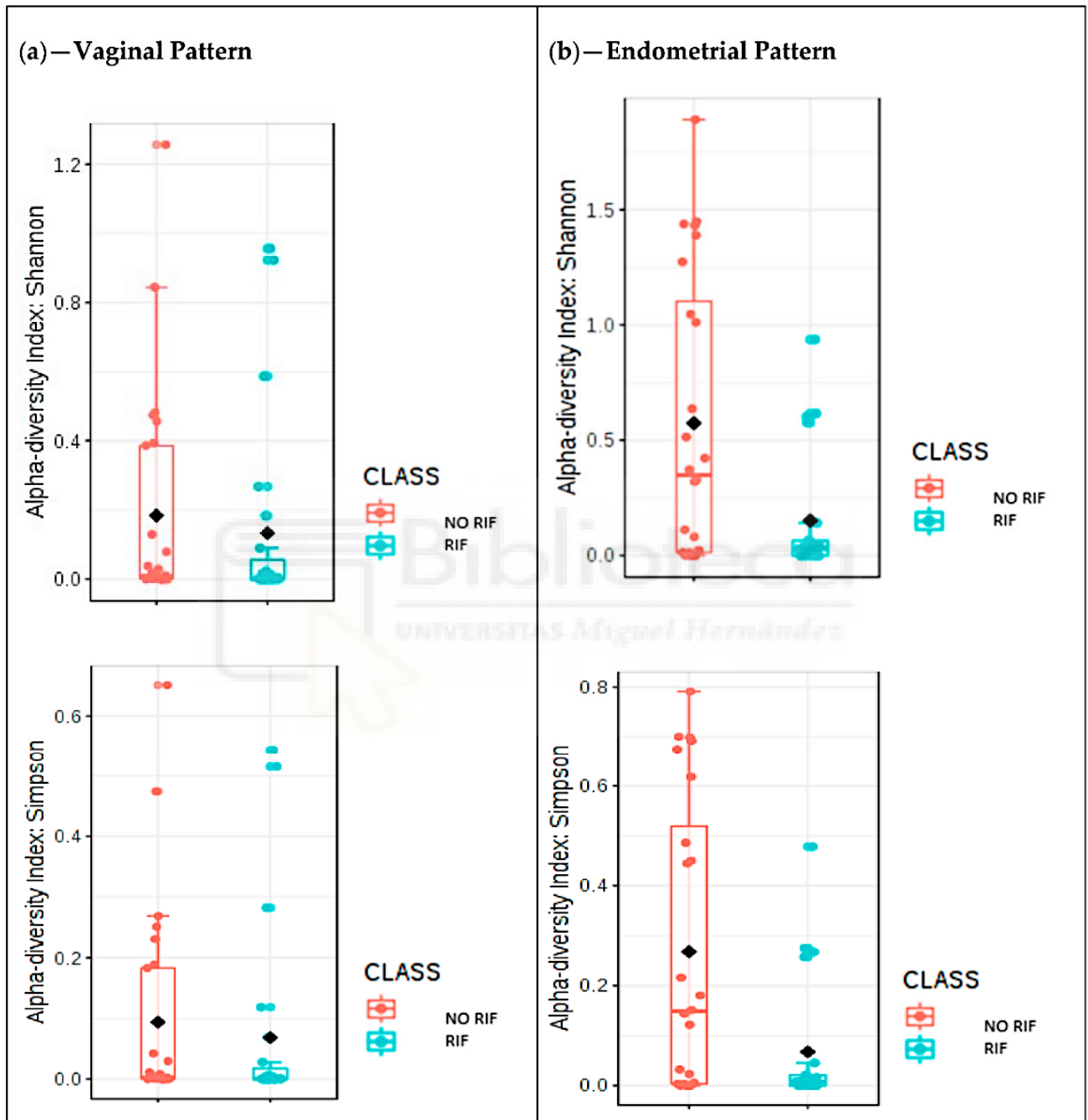


**Figura 5.** Asociación de la muestra de endometrio con la tasa de gestación: gráfico de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes, agrupados por tasa de gestación.

## 6.4 Patrones de microbioma asociados con el diagnóstico de RIF

### 6.4.1. Patrón de microbioma vaginal

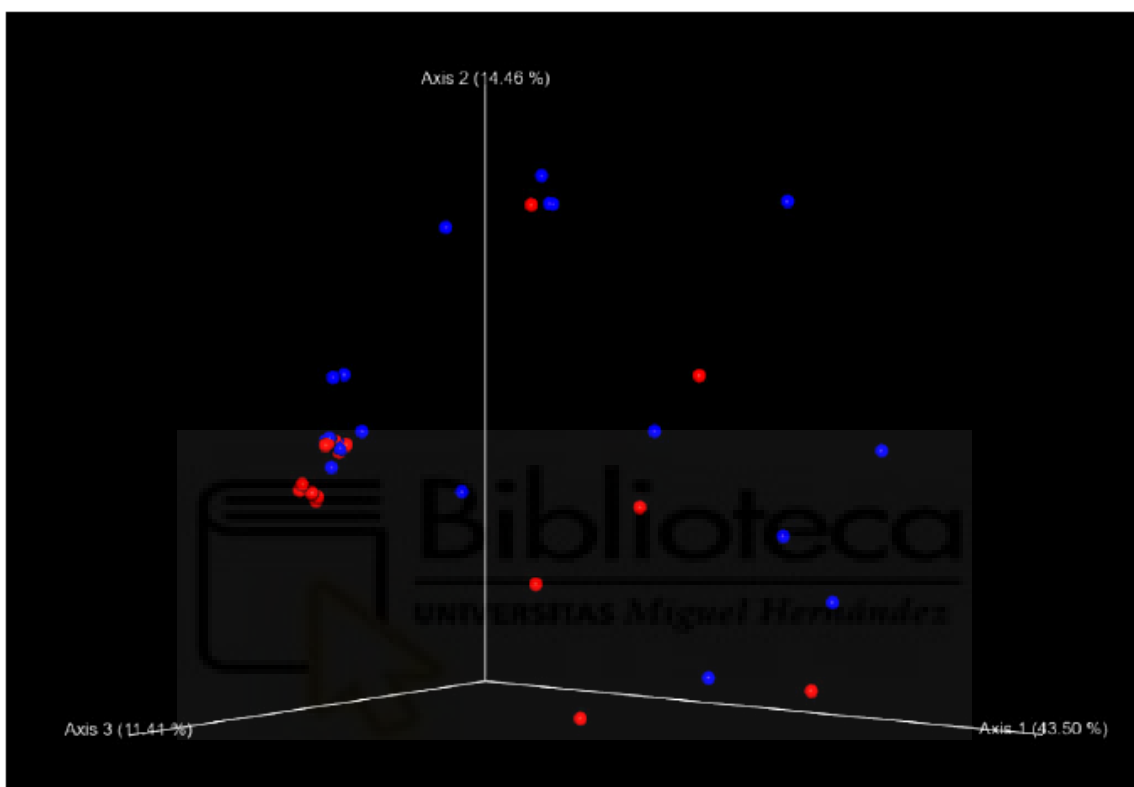
Con respecto al patrón del microbioma vaginal en las muestras recolectadas durante la fase secretora del ciclo, no encontramos diferencias en la diversidad alfa entre mujeres con y sin antecedentes de RIF según los índices de diversidad alfa de Shannon o Simpson (Figura 6a). Los resultados fueron estadísticamente significativos solo para el índice Faith. El diagrama de caja para el índice de diversidad alfa filogenética de Faith (análogo filogenético de la riqueza del taxón expresado como el número de unidades de árboles encontradas en una muestra) arrojó un valor  $p$  de 0.027, lo que representa un índice de diversidad alfa de Faith significativamente más bajo en mujeres con RIF en comparación con mujeres sin RIF.



**Figura 6.** Patrones de microbioma por diagnóstico de fallo repetido de implantación (RIF). (a) Análisis comparativo del índice de diversidad de Shannon ( $p = 0,285$ ) y el índice de diversidad de Simpson ( $p=0,276$ ) para las mujeres con y sin RIF en relación al estudio de diversidad alfa. MicrobiomeAnalyst MDP. (b) Análisis univariante representado con un diagrama de caja que muestra las diferencias en el índice de diversidad alfa para el grupo

de estudio en las muestras endometriales. Análisis del índice de diversidad de Shannon,  $p = 0,021$  y Simpson,  $p = 0,021$ ; Mann-Whitney U.

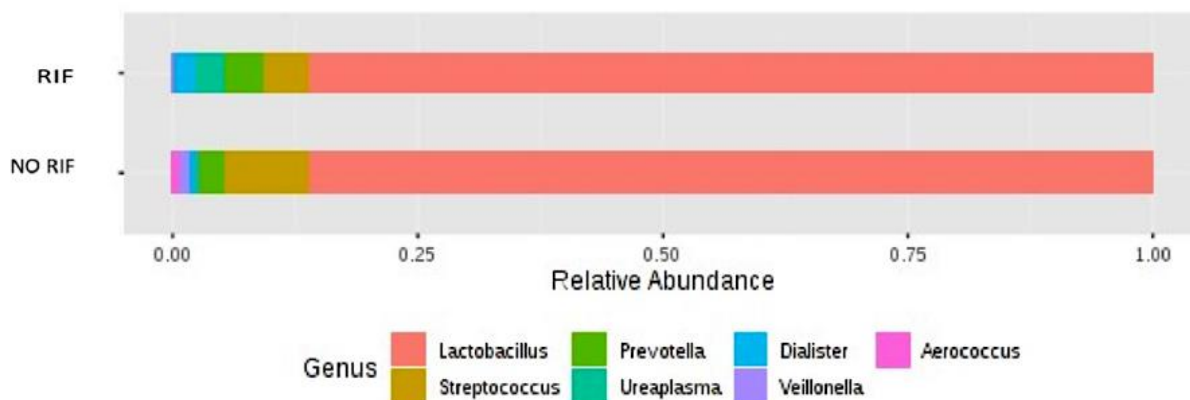
En relación con la diversidad beta, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre mujeres con y sin diagnóstico de RIF (Figura S6 ).



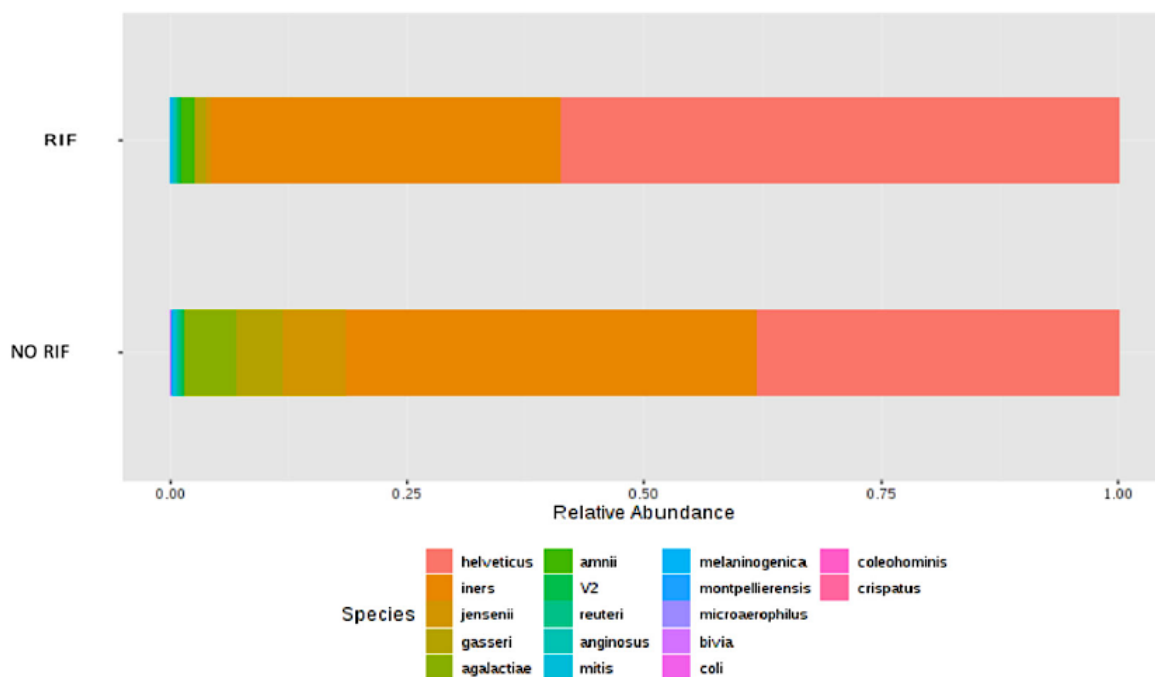
**Figura S6:** El UniFrac PCoA no ponderado, basado en la matriz de distancia UniFrac, que representa las muestras del estudio con diferentes colores según el diagnóstico de RIF: vaginal (rojo) o endometrial (azul), QIIME2.

Asimismo, el análisis univariado no mostró resultados estadísticamente significativos. En relación a la asignación taxonómica, las mujeres con diagnóstico de RIF tuvieron menor abundancia relativa del género *Streptococcus*, y mayor abundancia de *Prevotella* spp., *Ureaplasma* spp. Y *Dialister* spp.

Las mujeres sin RIF presentaron mayor abundancia relativa de *Streptococcus* spp., *Veillonella* spp. Y *Aerococcus* spp. En cuanto al género *Lactobacillus*, no se observaron diferencias entre los grupos (Figura S7).



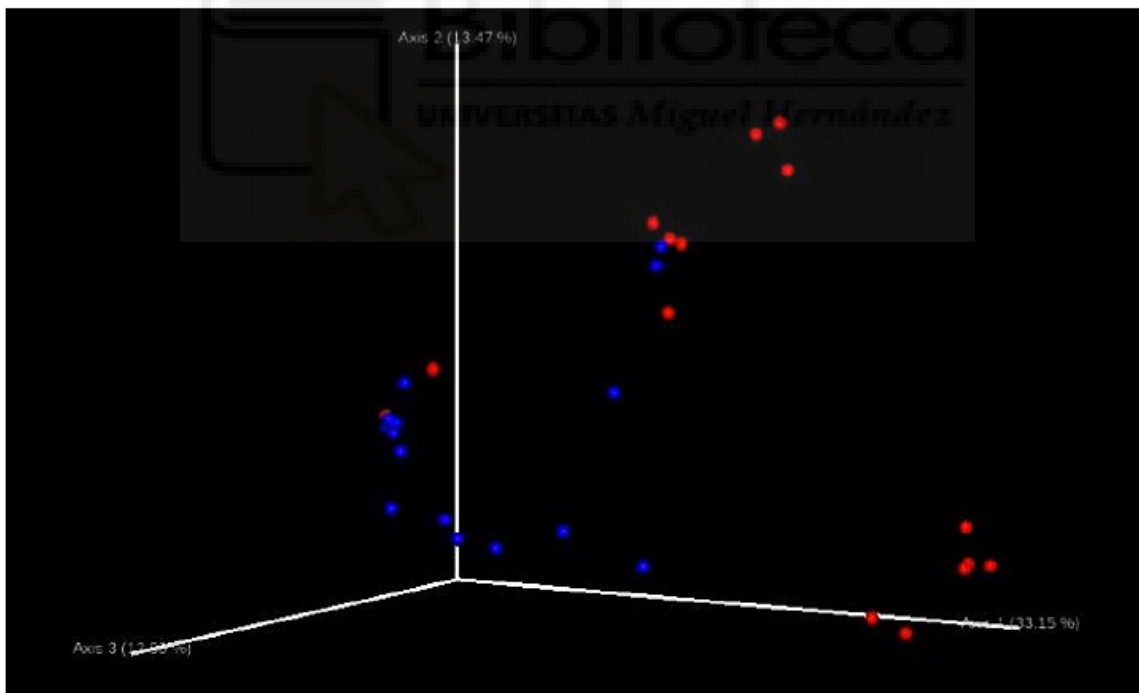
**Figura S7:** Gráfico de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes, agrupados por diagnóstico de RIF, en las muestras vaginales, MicrobiomeAnalyst MDP. A nivel de especie, encontramos una mayor abundancia relativa de *L. helveticus* en mujeres con RIF, y de *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri* y *L. agalactiae* en mujeres sin RIF ( Figura S8 ).



**Figura S8:** Gráfico de barras de la frecuencia relativa de las especies más abundantes, agrupadas por diagnóstico de RIF, en las muestras vaginales, MicrobiomeAnalyst MDP.

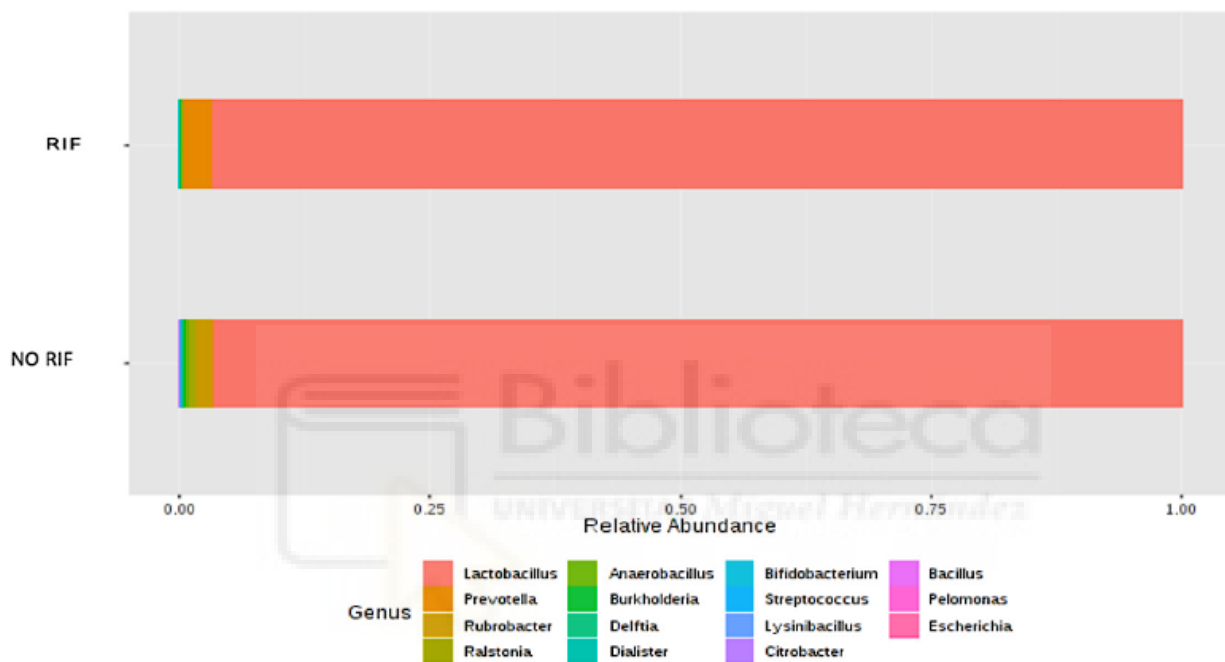
#### 6.4.2. Patrón de microbioma endometrial

La diversidad alfa del microbioma endometrial durante la fase secretora del ciclo fue significativamente mayor en mujeres sin RIF (Figura 6B;  $p=0,021$  para los índices de Shannon y Simpson). También hubo diferencias estadísticamente significativas en la diversidad beta, como se muestra en el gráfico de PCoA (Figura S9). Existe un patrón claro de separación entre mujeres con y sin RIF: las muestras recolectadas de mujeres diagnosticadas con RIF se ubican en el centro superior del gráfico, mientras que las recolectadas de mujeres sin RIF se agrupan en el centro. Los ejes muestran el porcentaje de la varianza explicada por cada componente (PC1: 31%; PC2: 14,1%; PC3: 8,9%). Los resultados del primer y segundo componentes explican más del 45% de la variabilidad entre las muestras de estudio.



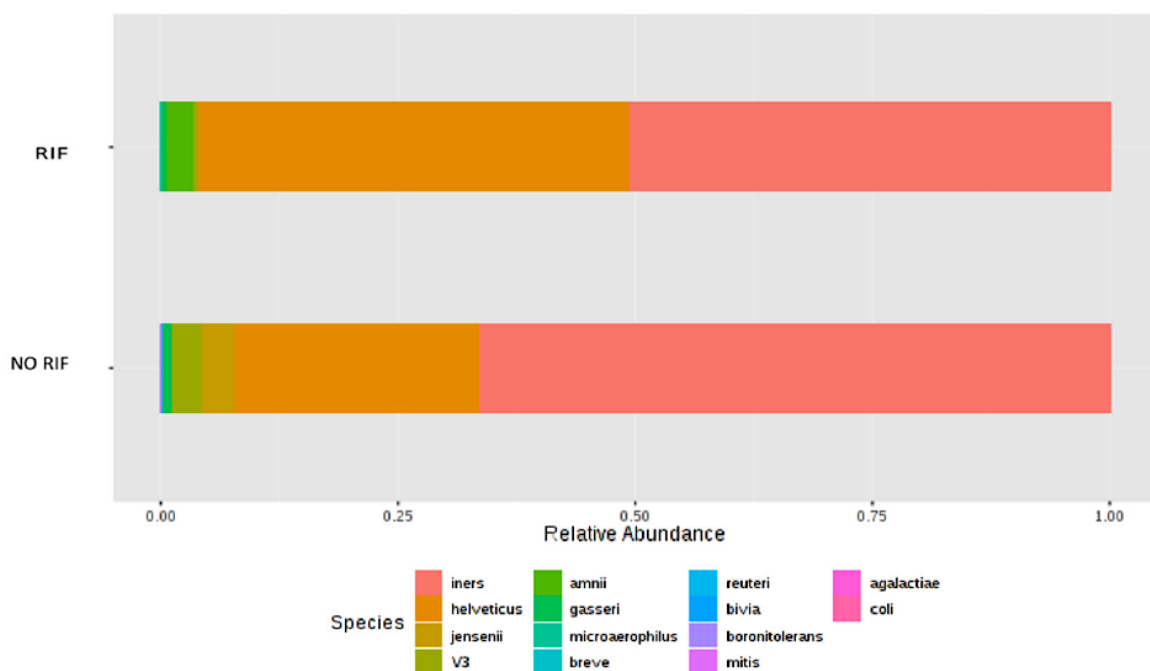
**Figura S9:** UniFrac PCoA no ponderado, que representa a las mujeres con y sin diagnóstico de RIF utilizando diferentes colores, sin RIF (rojo) o con RIF (azul), QIIME2.

La asignación taxonómica en la tabla de frecuencias (Figura S10) representa la abundancia relativa de los diferentes taxones presentes en las muestras según el diagnóstico RIF. Se observó una mayor abundancia del género *Prevotella* en mujeres con RIF. En el análisis univariado, encontramos diferencias estadísticamente significativas para el género *Ralstonia*, observándose una abundancia relativa mucho mayor en mujeres sin RIF en comparación con mujeres con RIF (0,73% versus 0,09%;  $p = 0,001$ ).



**Figura S10:** Gráfico de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes, agrupados por diagnóstico RIF, MicrobiomeAnalyst MDP.

La Figura S11 muestra las diferencias en abundancia relativa a nivel de especie. *L. iners* y *L. jensenii* fueron más abundantes en mujeres sin RIF, mientras que *L. helveticus* y *L. Sneathia amnii* tuvo una mayor presencia en mujeres con RIF.

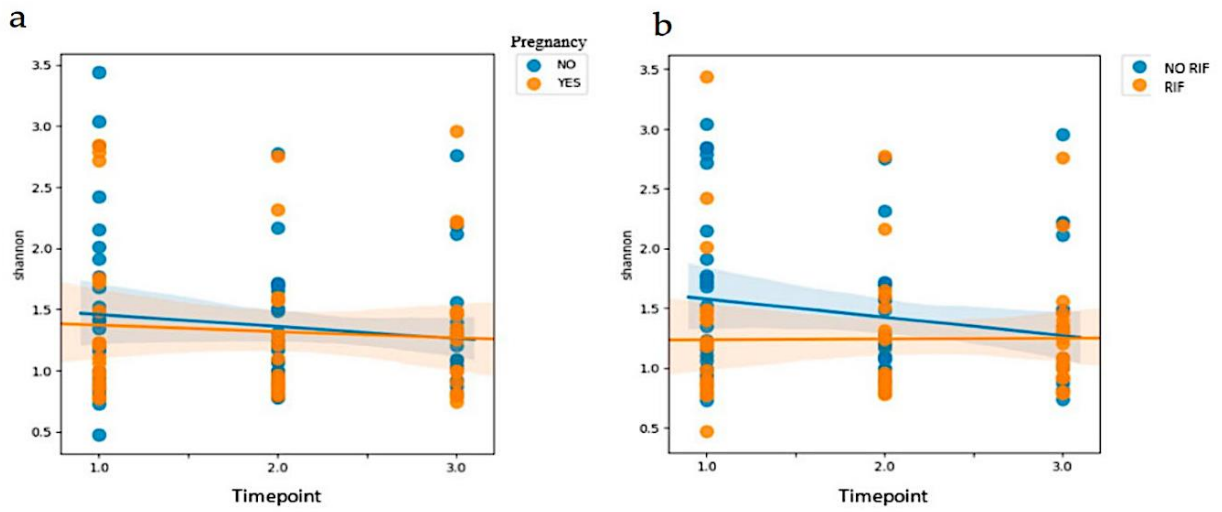


**Figura S11:** Gráfico de barras de las frecuencias relativas de las especies más abundantes, agrupados por diagnóstico RIF, MicrobiomeAnalyst MDP (*L. iners*, *L. helveticus*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *S. amnii*; V3 representa especies no identificadas).

### 6.5 Pruebas de modelos lineales de efectos mixtos por resultado del embarazo y diagnóstico de RIF

Se evaluó la variación en la diversidad alfa (índice de Shannon) en diferentes momentos del ciclo (Figura 7), y no hubo diferencias estadísticamente significativas en la evolución de los patrones del microbioma vaginal entre puntos temporales del tratamiento o según la consecución del embarazo clínico ( $p=0,412$ ). Analizando esta evolución mediante el diagnóstico de RIF ( $p=0,019$ ), observamos una variación en el patrón del microbioma vaginal a lo largo del tiempo en mujeres sin RIF. Específicamente, estas mujeres mostraron una disminución en la diversidad alfa desde la fase folicular a la lútea.

Por el contrario, las mujeres con RIF mostraron un patrón de microbioma estable en diferentes puntos de tiempo. Esta falta de dinamismo en el patrón del microbioma vaginal en mujeres con FID podría conllevar una falta de adaptación a la fisiología y preparación endometrial y, por tanto, un peor pronóstico para la implantación embrionaria (Figura 7).



**Figura 7.** Pruebas de modelos lineales de efectos mixtos por (a) resultado clínico del embarazo y (b) diagnóstico de falla repetida de implantación (RIF).





## DISCUSIÓN

---



## 7. DISCUSIÓN

---

Los resultados de este estudio muestran que no hubo diferencias en la diversidad del microbioma vaginal entre las mujeres que quedaron embarazadas y las que no, pero sí en su caracterización taxonómica, y si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el microbioma endometrial, hubo diferencias estadísticas en la composición de los microbiomas vaginales versus endometriales. Nuestros resultados también sugieren la estabilidad del microbioma vaginal a lo largo de diferentes momentos del ciclo. Por otro lado, las muestras vaginales recolectadas durante la fase secretora del ciclo previo a FET mostraron diferencias solo para el índice de Fe entre las mujeres con y sin diagnóstico de RIF, con una mayor diversidad alfa en mujeres con antecedentes de RIF. A nivel taxonómico, la abundancia relativa de los géneros en mujeres con RIF fue diferente de aquellas sin RIF. Con respecto a los patrones del microbioma endometrial, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre mujeres con y sin RIF.

Franasiak et al. (25) mostró que el microbioma en el momento de la transferencia de embriones podía caracterizarse con éxito sin alterar la práctica clínica estándar. Sin embargo, nuestras muestras vaginales se tomaron con un hisopo seco y las muestras de endometrio con Tao Brush, con el fin de discernir el microbioma de ambas ubicaciones y evitar una posible contaminación. Con referencia a la caracterización taxonómica en nuestro estudio, de manera similar a Franasiak et al. (25), también encontramos que la abundancia relativa de bacterias del género *Lactobacillus* fue mayor en las muestras vaginales de mujeres que lograron un embarazo clínico después de la TFE que en las que no lo hicieron. Sin embargo, Franasiak et al. (25) no obtuvo valores estadísticamente significativos como lo hicimos nosotros. También observamos que *Streptococcus* y *Prevotella* pueden estar asociados con un mal pronóstico con respecto a la gestación, mientras que una abundancia de *Lactobacillus* spp. podría ser indicativo de condiciones más favorables. Dado que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas al analizar las diferencias en abundancia relativa entre muestras tomadas en tres momentos diferentes del ciclo, concluimos que la muestra vaginal podría tomarse en cualquier momento para obtener hallazgos similares. El microbioma generalmente se ve afectado por los esteroides ováricos y el ciclo FET puede estar relacionado con niveles más altos de progesterona sérica local (P4) que en el ciclo anterior (punto de tiempo 1). Sin embargo, dado que a todas las pacientes se les sustituyó una preparación

endometrial por ciclo hormonal, se consideró que este factor era homogéneo para todas las participantes del estudio.

Los *Lactobacillus* spp. son las bacterias más abundantes en las muestras vaginales. La capacidad de los lactobacilos para inhibir la infección sin inducir inflamación puede maximizar la fertilidad y favorecer los resultados del embarazo (26). En relación al microbioma del endometrio, no encontramos diferencias entre las mujeres que quedaron embarazadas y las que no. La presencia de un microbioma no dominado por *Lactobacillus* (NLDM), es decir, <90% *Lactobacillus* spp. con > 10% de otras bacterias, se asoció con tasas más bajas de implantación, tasa de embarazo, progresión del embarazo y nacidos vivos (27). En este estudio, las mujeres clasificadas como portadoras de NLDM y que muestran una abundancia relativa de más del 80% de *Lactobacillus* spp. en el endometrio mostró buenos resultados de embarazo, lo que sugiere que este umbral podría considerarse suficiente para la implantación embrionaria (27). Además, incluso si se clasifica como portador de NLDM, el endometrio con una cantidad dominante de *bifidobacterias* también podría ser un entorno aceptable para la implantación (39). Kyono y col. (38) analizaron los microbiomas endometrial y vaginal en la población japonesa infértil y evaluaron su impacto en la implantación embrionaria. El estado bacteriano del endometrio y la vagina mostró microbiota dominada por *Lactobacillus* (> 90% *Lactobacillus* spp.) en la endometria del 38% de las pacientes con FIV y en las vaginas del 44,3%. El porcentaje medio de *Lactobacillus* spp. en mujeres embarazadas fue del 96,45% (DE 33,61%). Se encontró una proporción considerablemente alta de NLDM en el endometrio de mujeres japonesas infértiles. Un estudio piloto posterior de Kyono et al. (39) mostró que el predominio de *Lactobacillus* en el endometrio fue favorable en términos de la tasa de embarazo, pero los resultados no fueron concluyentes. Un metanálisis anterior (41) concluyó que las mujeres con microbiota vaginal anormal tienen aproximadamente 1,4 veces menos probabilidades de lograr un embarazo en el primer trimestre después del tratamiento de FIV en comparación con las mujeres con microbiota normal; sin embargo, las metodologías de los estudios incluidos fueron heterogéneas.

En el presente estudio, la caracterización taxonómica mostró diferencias en los perfiles microbianos entre las muestras vaginales y endometriales en términos de géneros y especies. El análisis univariado realizado sobre la abundancia relativa de los diferentes géneros por tipo de muestra alcanzó significación estadística para *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Ureaplasma* spp., *Delftia* spp., *Anaerobacillus* sp

p., *Ralstonia* spp., Y la especie *L. helveticus*. Estos resultados sugieren que las muestras vaginales y endometriales son diferentes en términos de diversidad microbiana y composición de los taxones. En un estudio piloto anterior (37), los miembros dominantes de la comunidad microbiana eran constantes en la vagina y el cuello uterino, y en general constantes en el endometrio; sin embargo, las proporciones relativas variaron. Además, las mujeres infértiles tendían a tener *Ureaplasma* spp. en la vagina y *Gardnerella* spp. en el cuello uterino con más frecuencia que las mujeres fértiles. En relación con el estudio mencionado anteriormente, nuestro análisis de los índices alfa y beta para la diversidad microbiana de muestras vaginales y endometriales reveló diferencias significativas. Aunque podría esperarse a priori que la diversidad del microbioma vaginal sea mayor que la del endometrial debido a factores como una exposición más directa al exterior del cuerpo y el contacto directo con la muestra seminal durante las relaciones sexuales, el presente estudio encontró un microbioma más diverso en el endometrio que en la vagina. Este hecho podría deberse a la no dominancia de un género (más del 90% de abundancia relativa según la evidencia científica actual), lo que puede conducir a la colonización por otro tipo de microorganismos y, así, generar un ambiente más diverso.

Otro aspecto importante del presente estudio es la evaluación de la diversidad y la caracterización taxonómica de acuerdo con la historia de RIF de los participantes. Previamente, la microbiota endometrial y vaginal fue caracterizada por Kitaya et al. (42) en mujeres infértiles con y sin antecedentes de RIF. La microbiota detectada en el endometrio mostró una variación significativa en la composición de la comunidad bacteriana entre los grupos RIF y no RIF, que no se observó en la vagina. *Burkholderia* spp. no se detectaron en la microbiota del endometrio en ninguna muestra de mujeres sin RIF, pero estuvieron presentes en una cuarta parte de las pacientes con RIF. En nuestro estudio, la diversidad alfa fue mayor a nivel endometrial en mujeres sin RIF. Esto no ocurrió en muestras vaginales, donde no se observaron diferencias. Además, según nuestros hallazgos y la literatura disponible, una mayor diversidad microbiana en el caso de la microbiota vaginal y endometrial parece ser un escenario más desfavorable para el éxito de los tratamientos de FIV. Los resultados de la diversidad alfa deben interpretarse con precaución, especialmente en pacientes con RIF. Es necesario un conocimiento detallado de la composición de este patrón microbiano para conocer el % de abundancia relativa de los géneros, especies y subespecies presentes en las muestras. e incluso examinar en profundidad la presencia de patógenos que

puedan tener efecto sobre la vagina y / o el endometrio. En el estudio mencionado anteriormente, los autores encontraron diferencias en la microbiota endometrial en ambos grupos. Cuando analizamos la caracterización taxonómica, también observamos claras diferencias en las abundancias relativas de los diferentes géneros y especies en el microbioma endometrial entre mujeres con y sin RIF. A diferencia de Kitaya et al. (38), no encontramos diferencias con respecto al género *Burkholderia*. El modelo lineal generalizado mostró que el patrón del microbioma vaginal en mujeres sin RIF cambió entre diferentes momentos del ciclo, mientras que en mujeres con RIF se mantuvo estable. Esto podría deberse a una posible adaptación del patrón del microbioma como resultado de los cambios fisiológicos que ocurren durante el ciclo. Las posibles causas y mecanismos involucrados en estas modificaciones aún se desconocen y no se han estudiado, pero esta podría ser una valiosa línea de investigación futura.

En vista de los hallazgos de nuestro estudio, antes del tratamiento de la infertilidad, tanto los microbiomas vaginales como endometriales pueden examinarse como objetivos para mejorar las tasas de embarazo. Un conocimiento detallado de la composición del patrón del microbioma, junto con el análisis de diversidad alfa y beta, podría ser útil para guiar los tratamientos.

## **FORTALEZAS Y LIMITACIONES**

---

## 8. FORTALEZAS Y LIMITACIONES

---

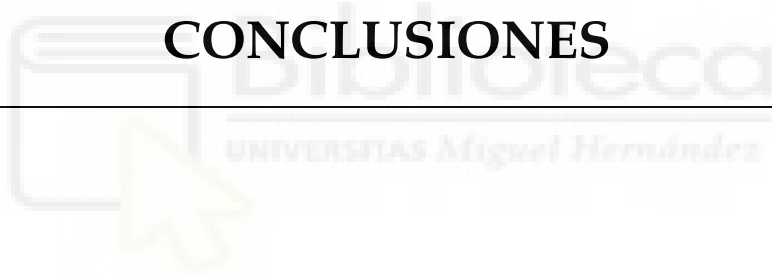
Las fortalezas de este estudio incluyen el uso de NGS para secuenciar las regiones hipervariables de la subunidad del ribosoma 16S. Otra fortaleza fue el uso del Tao Brush para obtener las muestras de endometrio, ya que este dispositivo tiene una vaina que cubre la muestra y se cierra antes de sacarla del útero y pasar por la vagina; su diseño evita así cualquier posible contaminación por microorganismos de la vagina, y evita la extracción de muestras con patrones que no están directamente asociados con el microbioma endometrial. Además, todos los embriones transferidos en los participantes fueron previamente analizados vía NGS para confirmar la normalidad y homogeneidad cromosómica, evitando así cualquier sesgo debido a factores embriológicos.

La principal limitación fue el tamaño de la muestra, que fue pequeño debido al diseño del estudio piloto. Otras limitaciones podrían ser posibles factores de confusión derivados de las relaciones sexuales recientes en algunos participantes, lo que podría haber influido en las composiciones microbianas obtenidas. Finalmente, solo extrajimos muestras de endometrio en un momento del ciclo, para evitar comprometer el resultado del tratamiento y la implantación del embrión. Esta decisión limitó la cantidad de información que pudimos obtener sobre el patrón endometrial, ya que no se tomaron muestras para los otros dos puntos temporales. Sin embargo, esta limitación se superó parcialmente, ya que las muestras vaginales se tomaron en tres momentos.

Se necesitan más estudios para confirmar nuestros hallazgos y aclarar el papel del tratamiento con antibióticos y/o probióticos en la normalización del patrón del microbioma y sus consecuencias en los resultados clínicos. Las investigaciones futuras sobre los microbiomas endometriales y vaginales, junto con sus efectos y asociaciones con la salud reproductiva y la infertilidad, deben adoptar un enfoque integral, incluido un análisis de cualquier interacción con el sistema inmunológico y entre diferentes cepas, variables metabólicas y transcriptómicas, y un estudio de biopelículas, todas las cuales están relacionadas con la implantación y las tasas de embarazo clínico.

## **CONCLUSIONES**

---





## 9. CONCLUSIONES

---

No hubo diferencias en la diversidad de los microbiomas vaginales y endometriales entre las mujeres que quedaron embarazadas y las que no, pero sí hubo diferencias en su caracterización taxonómica.

Las muestras vaginales recolectadas mostraron diferencias durante la fase secretora del ciclo previo a FET solo para el índice de Fe entre las mujeres con y sin diagnóstico de RIF, con una mayor diversidad alfa en mujeres con antecedentes de RIF; la abundancia relativa de los géneros en mujeres con RIF fue diferente de aquellas sin RIF, a nivel taxonómico.

Con respecto al patrón del microbioma endometrial, encontramos diferencias estadísticamente significativas entre mujeres con y sin RIF.



# BIBLIOGRAFÍA

---



## 10. BIBLIOGRAFÍA

---

- (1) Simon C. Introduction: Do microbes in the female reproductive function matter? *Fertil Steril*. 2018 Aug;110(3):325-326.
- (2) Patrick R. Murray; Ken S. Rosenthal; Michael A. Pfaller (Abril de 2009). «Capítulo 7: Flora microbiana comensal y patógena en el ser humano». En Patrick R. Murray. *Microbiología Médica* (6a edición). España: Elsevier-Mosby. pp. 73-76. ISBN 978-84-8086-465-7.
- (3) Mor, A., Driggers, P.H., and Segars, J.H. Molecular characterization of the human microbiome from a reproductive perspective. *Fertil Steril*. 2015; 104: 1344-1350
- (4) Peñalver Bernabé B, Cralle L, Gilbert JA. Systems biology of the human microbiome. *Curr Opin Biotechnol*. 2018 Feb 13;51:146-153.
- (5) Zhou, X., Hansmann, M.A., Davis, C.C., Suzuki, H., Brown, C.J., Schutte, U., Pierson, J.D., and Forney, L.J. The vaginal bacterial communities of Japanese women resemble those of women in other racial groups. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 2010; 58: 169-181
- (6) Gonzalez, A., Clemente, J.C., Shade, A., Metcalf, J.L., Song, S., Prithiviraj, B., Palmer, B.E., and Knight, R. Our microbial selves: what ecology can teach us. *EMBO Rep*. 2011; 12: 775-784
- (7) Rhoads, D.D., Cox, S.B., Rees, E.J., Sun, Y., and Wolcott, R.D. Clinical identification of bacteria in human chronic wound infections: culturing vs. 16S ribosomal DNA sequencing. *BMC Infect Dis*. 2012;12: 321
- (8) Franasiak, J.M. and Scott, R.T. Jr. Introduction: microbiome in human reproduction. *Fertil. Steril*. 2015; 104: 1341-1343
- (9) Franasiak, J.M. and Scott, R.T. Jr. Reproductive tract microbiome in assisted reproductive technologies. *Fertil. Steril*. 2015; 104: 1364-137
- (10) Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L., and Field, K.G. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature*. 1990; 345: 60-63
- (11) Dymock, D., Weightman, A.J., Scully, C., and Wade, W.G. Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscesses. *J Clin Microbiol*. 1996; 34: 537-542
- (12) Verhelst, R., Verstraelen, H., Claeys, G., Verschraegen, G., Delanghe, J., Van Simaey, L. et al. Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. *BMC Microbiol*. 2004; 4: 16
- (13) Zhou, X., Bent, S.J., Schneider, M.G., Davis, C.C., Islam, M.R., Forney, L.J. et

- al. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology (Reading, Engl)*. 2004; 150: 2565–2573
- (14) Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M. et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005; 308: 1635–1638
- (15) Hyman, R.W., Fukushima, M., Diamond, L., Kumm, J., Giudice, L.C., and Davis, R.W. Microbes on the human vaginal epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102: 7952–7957
- (16) Handelsman, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2004; 68: 669–685
- (17) Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(Suppl 1):4680–7.
- (18) . Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schutte UM, Zhong X, Koenig SS, Fu L, Ma ZS, Zhou X, Abdo Z, Forney LJ, Ravel J. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med* 2012;4:132ra52.
- (19) Chelsea Fox, M.D.b and Kacey Eichelberger, M.D.a Maternal microbiome and pregnancy outcomes. *Fertil Steril* 2015;104:1358–63.
- (20) Fanchin, R., Harmas, A., Benaoudia, F., Lundkvist, U., Olivennes, F., and Frydman, R. Microbial flora of the cervix assessed at the time of embryo transfer adversely affects in vitro fertilization outcome. *Fertil. Steril*. 1998; 70: 866–870
- (21) Kroon, B., Hart, R.J., Wong, B.M., Ford, E., and Yazdani, A. Antibiotics prior to embryo transfer in ART. *Cochrane Database Syst. Rev*. 2012; (CD008995)
- (22) Salim, R., Ben-Shlomo, I., Colodner, R., Keness, Y., and Shalev, E. Bacterial colonization of the uterine cervix and success rate in assisted reproduction, results of a prospective survey. *Hum. Reprod*. 2002; 17: 337–340
- (23) Salim, R., Ben-Shlomo, I., Colodner, R., Keness, Y., and Shalev, E. Bacterial colonization of the uterine cervix and success rate in assisted reproduction, results of a prospective survey. *Hum. Reprod*. 2002; 17: 337–340
- (24) T Haahr, J Zacho, M Bräuner, K Shathmigha, J Skov Jensen, P Humaidana Reproductive outcome of patients undergoing in vitro fertilisation treatment and diagnosed with bacterial vaginosis or abnormal vaginal microbiota: a systematic PRISMA review and meta-analysis. *BJOG* 2019;126:200–207
- (25) Franasiak, J.M., Werner, M.D., Juneau, C.R., Tao, X., Landis, J., Zhan, Y., Treff, N.R., and Scott, R.T. Endometrial microbiome at the time of embryo transfer: next-generation sequencing of the 16S ribosomal subunit. *J. Assist. Reprod. Genet*. 2016; 33: 129–136

- (26) Witkin SS, Linhares IM: Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota? *BJOG*.2017;124(4):606–11.
- (27) Moreno, I., Codoñer, F.M., Vilella, F., Valbuena, D., Martinez-Blanch, J.F., Jimenez-Almazán, J., Alonso, R., Alamá, P., Remohí, J., Pellicer, A., Ramon, D., and Simon, C. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2016; 215: 684–703
- (28)\_ NIH HMP Working Group. et al., "The NIH Human Microbiome Project.", *Genome Res*, 2009 Oct 9;19(12):2317-23.
- (29) Tran Q, Pham DT, Phan V. Using 16S rRNA gene as marker to detect unknown bacteria in microbial communities. *BMC Bioinformatics.* 2017 Dec 28;18(Suppl 14):499.
- (30) Witkin SS, Linhares IM, Giraldo P. Bacterial flora of the female genital tract: function and immune regulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2007 Jun;21(3):347-54.
- (31) Lambert JA, John S, Sobel JD, Akins RA. Longitudinal analysis of vaginal microbiome dynamics in women with recurrent bacterial vaginosis: recognition of the conversion process. *PLoS One.* 2013 Dec 20;8(12):e82599. (32) Ralph SG, Rutherford AJ, Wilson JD. Influence of bacterial vaginosis on conception and miscarriage in the first trimester: cohort study. *BMJ.* 1999 Jul 24;319(7204):220-3.
- (33) Van Oostrum N, De Sutter P, Meys J, Verstraelen H. Risks associated with bacterial vaginosis in infertility patients: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod.* 2013 Jul;28(7):1809-15.
- (34) Romero R, Hassan SS, Gajer P, Tarca AL, Fadrosch DW, Nikita L, Galuppi M, Lamont RF, Chaemsaihong P, Miranda J, Chaiworapongsa T, Ravel J. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome.* 2014 Feb 3;2(1):4.
- (35) Verstraelen H, Vilchez-Vargas R, Desimpel F, Jauregui R, Vankeirsbilck N, Weyers S, Verhelst R, De Sutter P, Pieper DH, Van De Wiele T. Characterisation of the human uterine microbiome in non-pregnant women through deep sequencing of the V1-2 region of the 16S rRNA gene. *PeerJ.* 2016 Jan 19;4:e1602.
- (36) Wee BA, Thomas M, Sweeney EL, Frentiu FD, Samios M, Ravel J, Gajer P, Myers G, Timms P, Allan JA, Huston WM. A retrospective pilot study to determine whether the reproductive tract microbiota differs between women with a history of infertility and fertile women. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2017 Dec 26.
- (37) Wee BA, Thomas M, Sweeney EL, Frentiu FD, Samios M, Ravel J, Gajer P, Myers G, Timms P, Allan JA, Huston WM. A retrospective pilot study to determine whether the reproductive tract microbiota differs between women with a history of infertility and

fertile women. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 2018 Jun;58(3):341-348. doi: 10.1111/ajo.12754. Epub 2017 Dec 26.

(38) Koichi Kyono, Tomoko Hashimoto, Yoko Nagai, Yoshiyuki Sakuraba Analysis of endometrial microbiota by 16S ribosomal RNA gene sequencing among infertile patients: a single-center pilot study. *Reprod Med Biol.* 2018; 17:297–306.

(39) Koichi Kyono. Tomoko Hashimoto, Suguru Kikuchi, Yoko Nagai, Yoshiyuki Sakuraba. A pilot study and case reports on endometrial microbiota and pregnancy outcome: An analysis using 16S rRNA gene sequencing among IVF patients, and trial therapeutic intervention for dysbiotic endometrium *Reprod Med Biol.* 2019;18:72–82.

(40) Moreno I, Simon C. Relevance of assessing the uterine microbiota in infertility. *Fertil Steril.* 2018 Aug;110(3):337-343. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.04.041. Review.

(41) Singer M, Borg M, Ouburg S, Morré SA. The relation of the vaginal microbiota to early pregnancy development during in vitro fertilization treatment-A meta-analysis. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2019 Apr;48(4):223-229. doi: 10.1016/j.jogoh.2019.01.007. Epub 2019 Jan 24. Review. PubMed PMID: 30685426.

(42) Kitaya K, Nagai Y, Arai W, Sakuraba Y, Ishikawa T. Characterization of Microbiota in Endometrial Fluid and Vaginal Secretions in Infertile Women with Repeated Implantation Failure. *Mediators Inflamm.* 2019 May 21;2019:4893437. doi: 10.1155/2019/4893437. eCollection 2019. PubMed PMID: 31249472; PubMed Central PMCID: PMC6556345.

(43) Xu J, Bian G, Zheng M, Lu G, Chan WY, Li W, Yang K, Chen ZJ, Du Y. Fertility factors affect the vaginal microbiome in women of reproductive age. *Am J Reprod Immunol.* 2020 Jan 11:e13220. doi: 10.1111/aji.13220. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31925865.

(44) Argimon Pallas Josep M<sup>a</sup>, Jimenez Villa Josep. *Métodos de investigación clínica y epidemiológica.* 4<sup>o</sup> Edición. Elsevier, Barcelona 2013, ISBN: 978-84-8086-941-6

(45) Ley 14/2006, de 26 de mayo, sobre técnicas de reproducción humana asistida. «BOE» núm. 126, de 27 de mayo de 2006, páginas 19947 a 19956

(46) Weinstock G. M. Genomic approaches to studying the human microbiota. *Nature.* 2012; 489(7415): 250-256.

(47) Bent S. J., Pierson J. D., Forney L. J. Measuring species richness based on microbial community fingerprints: the emperor has no clothes. *Applied and Environmental Microbiology.* 2007; 73(7): 2399–2401



**ANEXO**

---

**PUBLICACIONES**





Article

# Impact of the Vaginal and Endometrial Microbiome Pattern on Assisted Reproduction Outcomes

María del Carmen Diaz-Martínez <sup>1</sup>, Andrea Bernabeu <sup>1</sup>, Belén Lledó <sup>2</sup> , Concepción Carratalá-Munuera <sup>3,\*</sup> , Jose A. Quesada <sup>3</sup>, Francisca M. Lozano <sup>2</sup>, Vicente Ruiz <sup>1</sup>, Ruth Morales <sup>2</sup>, Joaquín Llácer <sup>1</sup>, Jorge Ten <sup>1</sup>, Juan Carlos Castillo <sup>1</sup>, Adoración Rodríguez <sup>1</sup>, Rauf Nouni-García <sup>3</sup>, Adriana López-Pineda <sup>3</sup> , Belén Moliner <sup>1</sup> and Rafael Bernabeu <sup>1</sup>

- <sup>1</sup> Instituto Bernabeu Reproductive Medicine, 03016 Alicante, Spain; maykadiaz84@gmail.com (M.d.C.D.-M.); abernabeu@institutobernabeu.com (A.B.); vruizcamara@institutobernabeu.com (V.R.); jllacer@institutobernabeu.com (J.L.); jten@institutobernabeu.com (J.T.); jcastillo@institutobernabeu.com (J.C.C.); drodriguez@institutobernabeu.com (A.R.); bmoliner@institutobernabeu.com (B.M.); rbernabeu@institutobernabeu.com (R.B.)
- <sup>2</sup> Molecular Laboratory, Instituto Bernabeu Biotech, 03016 Alicante, Spain; blledo@institutobernabeu.com (B.L.); plozano@institutobernabeu.com (F.M.L.); rmorales@institutobernabeu.com (R.M.)
- <sup>3</sup> Clinical Medicine Department, School of Medicine, University Miguel Hernández de Elche, 03550 Alicante, Spain; jqquesada@umh.es (J.A.Q.); raufnrg@gmail.com (R.N.-G.); adriannalp@hotmail.com (A.L.-P.)
- \* Correspondence: maria.carratala@umh.es



**Citation:** Diaz-Martínez, M.d.C.; Bernabeu, A.; Lledó, B.; Carratalá-Munuera, C.; Quesada, J.A.; Lozano, F.M.; Ruiz, V.; Morales, R.; Llácer, J.; Ten, J.; et al. Impact of the Vaginal and Endometrial Microbiome Pattern on Assisted Reproduction Outcomes. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 4063. <https://doi.org/10.3390/jcm10184063>

Academic Editors: Jacek Szamatowicz and Sławomir Wołczyński

Received: 29 June 2021

Accepted: 2 September 2021

Published: 8 September 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Uterine microbiota may be involved in reproductive health and disease. This study aims to describe and compare the vaginal and endometrial microbiome patterns between women who became pregnant and women who did not after in vitro fertilization. We also compared the vaginal and endometrial microbiome patterns between women with and without a history of repeated implantation failures (RIF). This pilot prospective cohort study included 48 women presenting to the fertility clinic for IVF from May 2017 to May 2019. Women who achieved clinical pregnancy presented a greater relative abundance of *Lactobacillus* spp. in their vaginal samples than those who did not (97.69% versus 94.63%;  $p = 0.027$ ). The alpha and beta diversity of vaginal and endometrial samples were not statistically different between pregnant and non-pregnant women. The Faith alpha diversity index in vaginal samples was lower in women with RIF than those without RIF ( $p = 0.027$ ). The alpha diversity of the endometrial microbiome was significantly higher in women without RIF ( $p = 0.021$ ). There were no significant differences in the vaginal and endometrial microbiomes between pregnant and non-pregnant women. The relative abundance of the genera in women with RIF was different from those without RIF. Statistically significant differences in the endometrial microbiome were found between women with and without RIF.

**Keywords:** microbiome; pregnancy rates; repeated implantation failure; reproductive medicine

## 1. Introduction

Technological advances in mass sequencing have enabled the identification of different microbial communities in the uterine cavity, including in the vagina and the endometrial cavity [1]. A recent review [2] concluded that there was not enough evidence for a “core” or bacterial resident population in the uterus, and the existence of uterine microbiota might be reflective of bacterial tourists or invaders. Nevertheless, uterine microbiota may be involved in reproductive health and disease [1,2]

The main bacteria at the vaginal and endometrial level belong to the genus *Lactobacillus*—producers of lactic acid that maintain the acidic pH of the vagina, which acts as a barrier against pathogens [3]. The association between vaginal flora and pregnancy outcomes has been widely studied for years. The live birth rate is correlated with the production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by *Lactobacillus* spp., and inversely correlated with the existence of

bacterial vaginosis. Thus, alterations to the vaginal flora—for example, due to bacterial vaginosis (provoked by *Gardnerella vaginalis*)—are associated with an increased risk of miscarriage [4,5]. Other pathogenic microorganisms—such as *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, and *Mycoplasma tuberculosis*—may cause subclinical alterations related to risk factors for subfertility [6].

The prevalence of infertility is on the rise [7], and assisted reproductive technologies (ART) are increasingly in demand, as well as being safer and more successful [8]. Endometrial implantation is the single most important event determining the success of embryo transfer in ART [9]. Other factors include the microbial colonization of the upper genital tract [10]—and possibly the uterine–cervical canal—which has been shown to be a significant, independent determinant of the success of assisted reproductive treatments [11]. Recently, the reproductive tract microbiota have been associated with embryo transfer failure [12].

Until now, the reproductive microbiome has been studied by analyzing samples taken from either the endometrium or the vagina. Although the uterine microbiota appear to be a continuum from the vaginal microbiota, previous studies have found differences between the endometrial and vaginal microbiota [13]. Currently, the role of these microbiota in embryo implantation and pregnancy outcomes is unclear. One of the main obstacles to determining the bacterial composition of the endometrium is that the small amount of the initial sample makes it vulnerable to contamination with exogenous bacterial DNA.

Recently, Di Simone et al. [14] suggested that classification based on endometrial bacterial patterns could help prevent obstetric complications through personalized treatments. In light of scientific evidence that alterations to the reproductive microbiome reduce women's fertility by negatively impacting on embryo implantation, determining the bacterial composition of the vagina and the endometrium may contribute to improving the prognosis of fertility treatments. Thus, the primary objective of the present study was to describe and compare the vaginal and endometrial microbiome patterns between women who became pregnant and women who did not after in vitro fertilization (IVF). The secondary objective was to compare the vaginal and endometrial microbiome patterns between women with and without a history of repeated implantation failures (RIF).

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Design and Study Population

This pilot prospective cohort study took place in a private assisted reproduction clinic. It included women presenting to the fertility clinic for IVF from May 2017 to May 2019 who met the following inclusion criteria: aged 18–50 years; undergoing frozen embryo transfer (FET) with euploid embryos, using either their own or donated gametes; and an indication to use the intracytoplasmic sperm injection (ICSI) method to generate embryos. Exclusion criteria were: the use of antibiotics in the three months preceding the fertility treatment, uterine malformations, untreated hydrosalpinx, known implantation failure factors, or unwillingness to sign informed consent.

Participants followed the usual ART procedure with ovarian stimulation and ICSI per protocol, and underwent preimplantation genetic testing for aneuploidies (PGT-A) at the blastocyst stage using NGS (VeriSeq, Illumina, San Diego, California, USA) with the MiSeq Sequencer (Illumina). One euploid embryo was transferred in the cycle following the ovarian stimulation via ultrasound-guided transfer, in accordance with established protocols. Endometrial preparation via estrogen–progesterone replacement therapy was performed. Human chorionic gonadotropin ( $\beta$ -hCG) blood testing was performed 8–9 days after the embryo transfer to test for pregnancy.

The local ethics committee approved this study in January 2017 (Reference code: 16/318), and it was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All participants signed written informed consent to take part in the study.

## 2.2. Study Variables

The following baseline characteristics were collected on enrollment: age (years), weight (kg), tobacco use (yes/no), number of previous pregnancies, previous miscarriages (yes/no), number of miscarriages, previous fertility treatments (yes/no), RIF, i.e., failed implantation after  $\geq 3$  transfer cycles with good-quality embryos (yes/no), donated oocytes (yes/no), donated semen (yes/no), and normozoospermia diagnosis after semen analysis (yes/no). The date and the endometrial thickness (mm) were recorded before the embryo transfer.

The primary study outcome was clinical pregnancy (yes/no), i.e., pregnancy evidenced by ultrasound of fetal cardiac activity after positive  $\beta$ -hCG. Other reproductive outcomes included the result of the  $\beta$ -hCG blood test (positive/negative), biochemical miscarriage (yes/no), and clinical miscarriage (yes/no).

## 2.3. Sample Collection

Vaginal samples were collected at different stages of IVF treatment: (1) during the secretory phase of the cycle previous to FET (days 18–22 of the cycle), (2) on the day of the embryo transfer, and (3) on the day of the pregnancy test. A dry swab was used to collect vaginal fluid from the bottom of the posterior sac by direct visualization using the vaginal speculum, with the patient in the lithotomy position. In order to avoid contamination, we did not use lubricant or gel on the speculum. On the day of the embryo transfer, we took the sample before preparing the embryo transfer to prevent interference by the procedure.

Endometrial samples were collected during the secretory phase of the cycle previous to FET (days 18–22 of the cycle), and we used the Tao Brush IUMC Endometrial Sampler; this device minimizes the risk of contamination during the collection of the endometrial sample via a sheath that closes prior to withdrawal from the uterus. All vaginal and endometrial samples were stored at  $-80$  °C until further analysis.

## 2.4. Sample Analysis

Microbiome patterns were analyzed by estimating the prevalence and variability of types of bacteria at both the vaginal and endometrial levels. We used metagenomics for sample analysis, studying the 16S rRNA gene marker of the included samples via next-generation sequencing (NGS). Analyses took place in the molecular genetics laboratory of the fertility clinic. Rigorous controls were carried out for the reagents and all of the equipment used in all of the steps carried out during the processing and analysis of the samples.

## 2.5. DNA Extraction

DNA extraction was performed using the PureLink Microbiome DNA Purification Kit (Thermo Fisher, PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit, Darmstadt, Germany and/or its affiliates). The DNA was quantified using a Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher). The extracted DNA was stored at  $-20$  °C for later use.

## 2.6. Amplification of Region V3V4 of the 16S rRNA Gene

Polymerase chain reaction (PCR) amplification of the variable region V3V4 of the 16S rRNA gene was performed using Taq DNA polymerase ( $2\times$  KAPA HiFi HotStart, Roche, Rotkreuz, Switzerland) in the presence of dNTPs, as well as oligonucleotides 357F and 806R, at a final concentration of  $1$   $\mu$ M and an average of  $100$  ng of DNA, and at a final reaction volume of  $25$   $\mu$ L, following the recommendations of Illumina (16S Metagenomic Sequencing Library Preparation). PCR was carried out in a thermal cycler (Verity, Applied Biosystems, San Francisco, CA, USA). For the validation of the PCR technique, all amplification reactions included positive and negative controls without DNA templates. The PCR products were visualized using agarose electrophoresis, verifying that the amplified DNA band was the correct size ( $449$  base pairs). All products of amplification were stored at  $-20$  °C for subsequent sequencing.

### 2.7. Sequencing of Region V3V4 of 16S rRNA Gene

Once the V3V4 amplicon was obtained and purified, we generated the library with the identifying indices of each sample using the Nextera XT sequencing kit (Illumina). After the purification of the libraries, the samples, which were previously diluted to a concentration of 4 nM before being mixed and prepared for sequencing, were quantified using a Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher). The final concentration of the library was 15 pM. The library was sequenced using MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) reagents. We used MiSeq (Illumina) as the sequencing equipment and for the metagenomics of the workflow.

### 2.8. Bioinformatic Analysis of the Sequences

The primary analysis of the obtained sequences consisted of demultiplexing, using the MiSeq Reporter software (Illumina). The unindexed paired-end sequences of each sample were exported from the MiSeq system in FASTQ format for the analysis. The bioinformatic analysis of the sequences was carried out using the QIIME2 package. Further data analysis was also performed with MicrobiomeAnalyst software. Deblur was used to filter and denoise the sequences with QIIME2. The sequences were grouped in operational taxonomic units (OTUs) with a similarity percentage of 97%.

In order to estimate alpha diversity—i.e., the number of different species present in the sample—a rarefaction analysis was performed on 1000 sequences per sample, followed by an alpha diversity analysis. To aid in comparisons of alpha diversity, differences in library sizes across samples were adjusted by the rarefaction method. Three different indices were used: Shannon, Simpson, and Faith. Since these indices did not follow a normal distribution, the non-parametric Mann–Whitney U method was used. The Shannon index quantifies the different types of taxa present in the community, and considers the richness and equitability of species. If two sites are equally rich in species, however, with one site dominated by a single species and the other showing more evenness, the second would clearly be considered more diverse. The Simpson index expresses the probability that two microorganisms randomly selected from an infinitely large community are of different species.

The results for beta diversity were visualized with QIIME2 using the graphics generated by principal coordinates analysis (PCoA), obtained with EMPeror. We carried out the analysis of beta diversity using the unweighted UniFrac index. Beta diversity expresses composition in terms of the abundance of different taxa among the samples. UniFrac is a measure of beta diversity that uses phylogenetic information to compare samples belonging to the interest groups—in this case, four; the unweighted version is qualitative. Therefore, UniFrac measures concordance based on the abundance of OTUs in each sample, including phylogenetic distances. The matrices with beta diversity measurements were analyzed using PERMANOVA for differences in composition according to the group they belonged to (type of sample).

Taxonomic assignment was performed using a classification based on a filtering of the 99\_otus sequence from the Greengenes database to the V3V4 region. Finally, we performed the univariate analysis of each specified taxon or group according to the results we obtained, using the correction for multiple testing.

### 2.9. Statistical Analysis

A descriptive analysis of all variables was performed by calculating frequencies for the qualitative parameters and minima, maxima, means, and standard deviations (SD) for the quantitative variables. To compare them, we used the parametric Student's *t*-test or the non-parametric Mann–Whitney U test, as appropriate. Microbiome patterns as well as vaginal and endometrial samples were compared between groups according to outcome variables, using double-entry tables for qualitative variables and the chi-squared test. For quantitative variables, Student's *t*-test was used to assess the association between microbiome patterns and clinical pregnancy outcomes. A linear mixed-effects model was constructed to determine the evolution of the vaginal microbiome pattern and its

association with clinical pregnancy rate and RIF diagnosis. Analyses were performed using R v.3.5.1.

### 3. Results

The study included 48 participants, who provided 192 samples, from which 189 sequences suitable for analysis were obtained. Figure 1 details the number of women and samples initially included in the study, along with losses and net inclusion data and analysis. Table 1 shows the baseline characteristics of the study participants, whose mean age was 39.44 years. A total of 26 women (54.2%) tested positive on the  $\beta$ -hCG pregnancy test during the study, and 21 achieved clinical pregnancy (43.8%); of these, 38.9% ( $n = 8$ ) had a history of miscarriages, compared to 70.0% ( $n = 19$ ) of those who did not get pregnant ( $p = 0.034$ ). The biochemical and clinical miscarriage rates were 10.4% ( $n = 5$ ) and 14.28% ( $n = 7$ ), respectively.

J. Clin. Med. 2021, 10, 4063

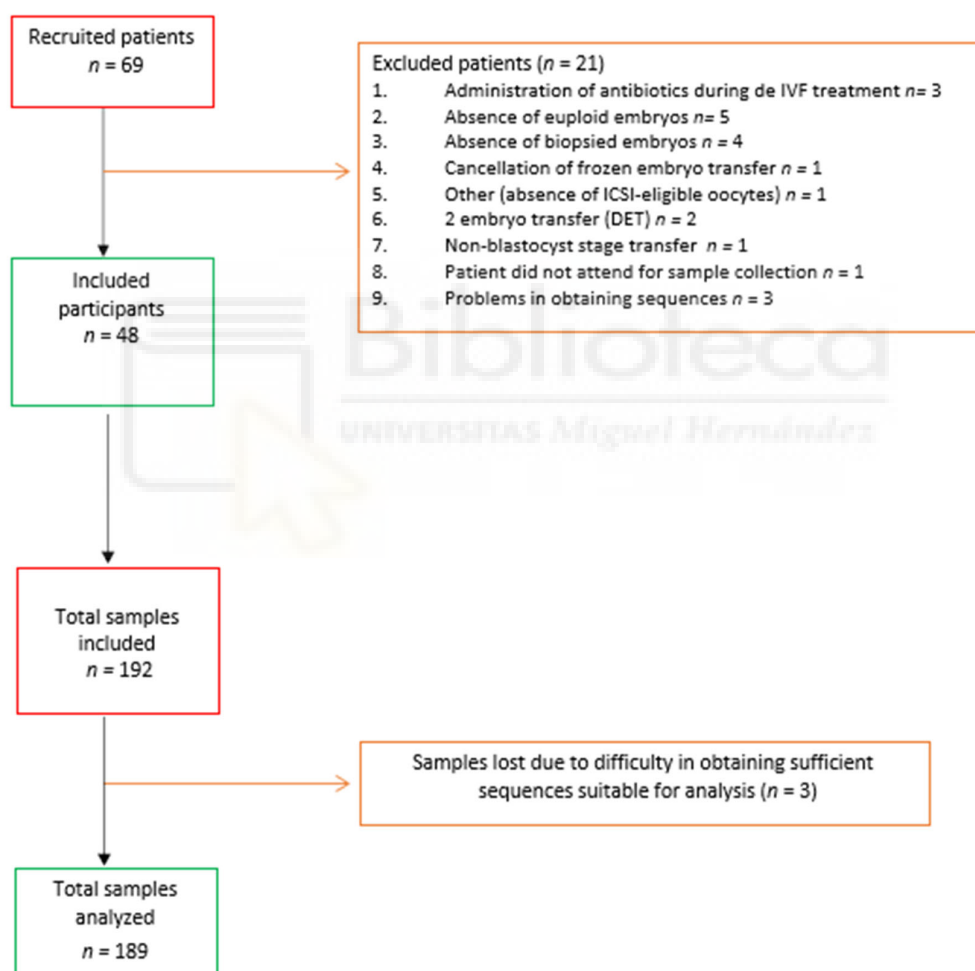


Figure 1. Flow diagram of the study.

#### 3.1. Differences between Vaginal and Endometrial Microbiome Patterns

We found statistically significant differences in the alpha diversity of endometrial versus vaginal microbiomes ( $p = 0.014$  for the Shannon index and  $p = 0.046$  for the Simpson index), with higher values in endometrial samples (Figure 2a). Using PERMANOVA, the beta diversity of the samples showed statistical differences in composition between vaginal and endometrial microbiomes ( $p = 0.001$ ). The unweighted UniFrac PCoA revealed a clear pattern of separation between vaginal and endometrial samples (Figure S1). The endometrial samples are grouped at the extreme right of the graph. The percentage of the variance explained by each component is shown on the axes (principal component (PC)1: 34.16%; PC2: 20.31%; PC3: 8.58%). The first and second components could together explain more than 50% of the variability between the samples.

Regarding the taxonomic characterization of the samples during the secretory phase of the cycle previous to FET, there was a clear dominance of the genus *Lactobacillus* in both the vaginal and the endometrial microbiomes. The relative frequencies of the most



**Table 1.** Baseline characteristics in women who achieved and did not achieve clinical pregnancy.

Variables	Total Women N = 48	Pregnancy N = 21	No Pregnancy N = 27	p-Value
Age, years, mean (SD)	39.44 (3.82)	38.28 (3.39)	40.13 (3.95)	0.092
Weight, kg, mean (SD)	63.41 (9.79)	59.57 (7.98)	64.69 (10.16)	0.194
Height, cm, mean (SD)	162.33 (6.89)	160.25 (10.41)	163.09 (5.22)	0.481
Tobacco user, n (%)	7 (14.29)	4 (16.7)	3 (11.1)	0.598
N of previous pregnancies, mean (SD)	0.67 (0.60)	0.56 (0.51)	0.73 (0.64)	0.296
Previous miscarriages, n (%)	28 (58.33)	9 (38.90)	19 (70.0)	0.034
N of previous miscarriages, mean (SD)	1.44 (1.80)	1.11 (1.79)	1.63 (1.81)	0.334
Previous treatments, n (%)	37 (77.08)	15 (72.20)	22 (80.0)	0.535
Semen analysis, normozoospermia, n (%)	37 (77.08)	17 (83.30)	20 (73.30)	0.617
Donated semen, n (%)	10 (20.83)	5 (22.20)	5 (20.0)	0.854
Endometrial thickness, mm, mean (SD)	8.40 (2.04)	8.54 (2.01)	8.32 (2.09)	0.725
Repeated implantation failures, n (%)	23 (47.9)	5 (23.81)	18 (66.66)	

SD: standard deviation.

### 3.1. Differences between Vaginal and Endometrial Microbiome Patterns

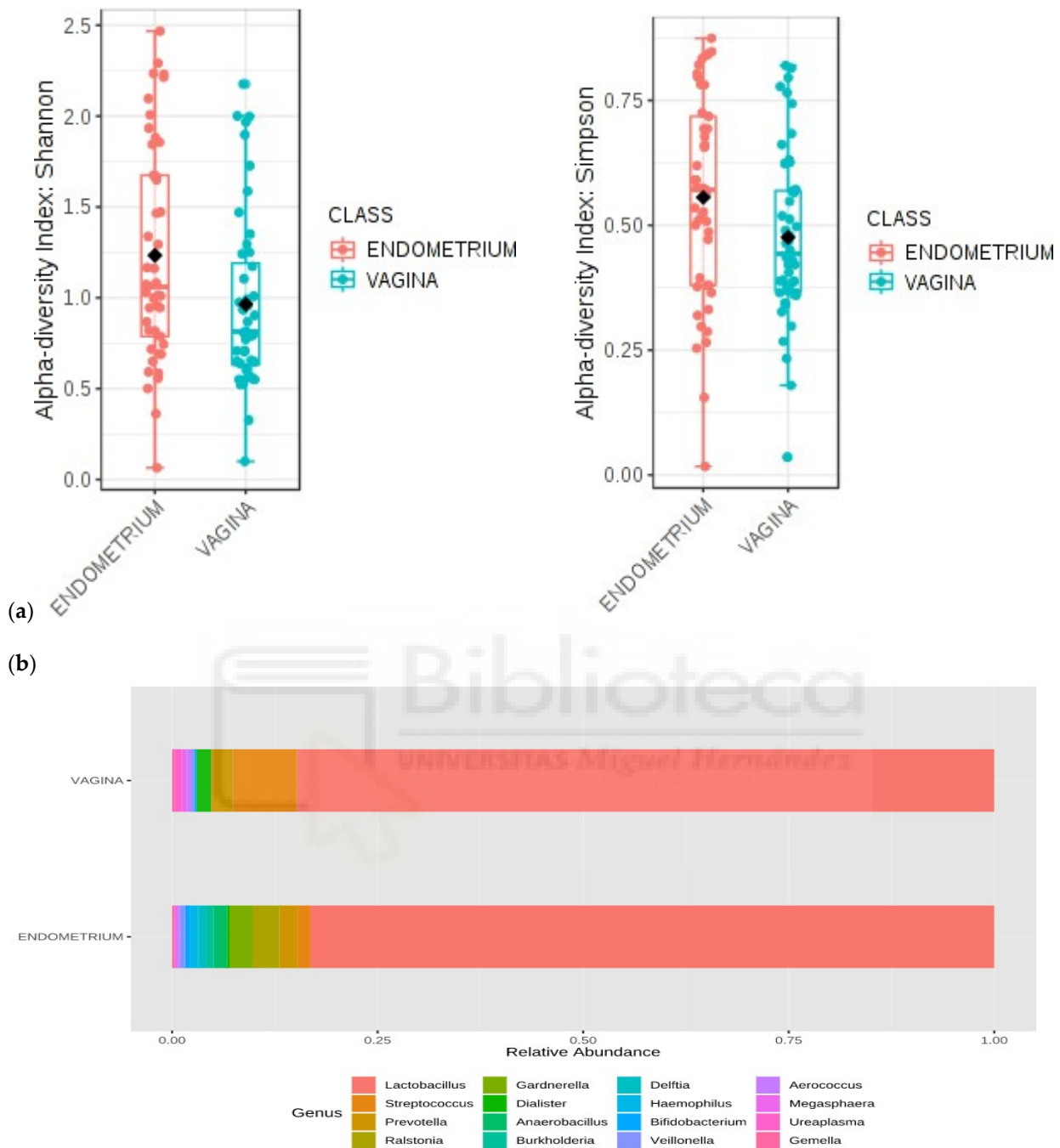
We found statistically significant differences in the alpha diversity of endometrial versus vaginal microbiomes ( $p = 0.014$  for the Shannon index and  $p = 0.046$  for the Simpson index), with higher values in endometrial samples (Figure 2a). Using PERMANOVA, the beta diversity of the samples showed statistical differences in composition between vaginal and endometrial microbiomes ( $p = 0.001$ ). The unweighted UniFrac PCoA revealed a clear pattern of separation between vaginal and endometrial samples (Figure S1). The endometrial samples are grouped at the extreme right of the graph. The percentage of the variance explained by each component is shown on the axes (principal component (PC)1: 34.16%; PC2: 20.31%; PC3: 8.58%). The first and second components could together explain more than 50% of the variability between the samples.

Regarding the taxonomic characterization of the samples during the secretory phase of the cycle previous to FET, there was a clear dominance of the genus *Lactobacillus* in both the vaginal and the endometrial microbiomes. The relative frequencies of the most abundant genera grouped by sample type (vaginal/endometrial) are shown in Figure 2b. Microbiome profiles showed relative differences in genera and species present in the vaginal and endometrial samples. The univariate analysis reached statistical significance for *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Ureaplasma* spp., *Delftia* spp., *Anaerobacillus* spp., and *L. helveticus*. Several genera were more abundant in the vagina than in the endometrium: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, and *Ureaplasma*. The remaining genera were more abundant in the endometrium (Table 2). Figure S2 shows the relative frequency of the most abundant species for each sample type. *Lactobacillus iners* presents a higher relative abundance in endometrial samples, without significant difference (64% versus 40% in vaginal samples). There was a significant difference in the abundance of *L. helveticus*: 28% in the endometrium versus 47% in the vagina ( $p = 0.013$ ).

**Table 2.** Differences in the genera present in microbiome profiles in vaginal and endometrial samples.

Genus	Endometrium	Vagina	p-Value
<i>Lactobacillus</i> spp.	83.17%	84.82%	0.003
<i>Delftia</i> spp.	0.95%	0.00%	0.004
<i>Anaerobacillus</i> spp.	1.59%	0.00%	0.004
<i>Ralstonia</i> spp.	3.17%	0.00%	0.004
<i>Ureaplasma</i> spp.	0.00%	0.89%	0.006
<i>Streptococcus</i> spp.	1.59%	7.74%	0.019

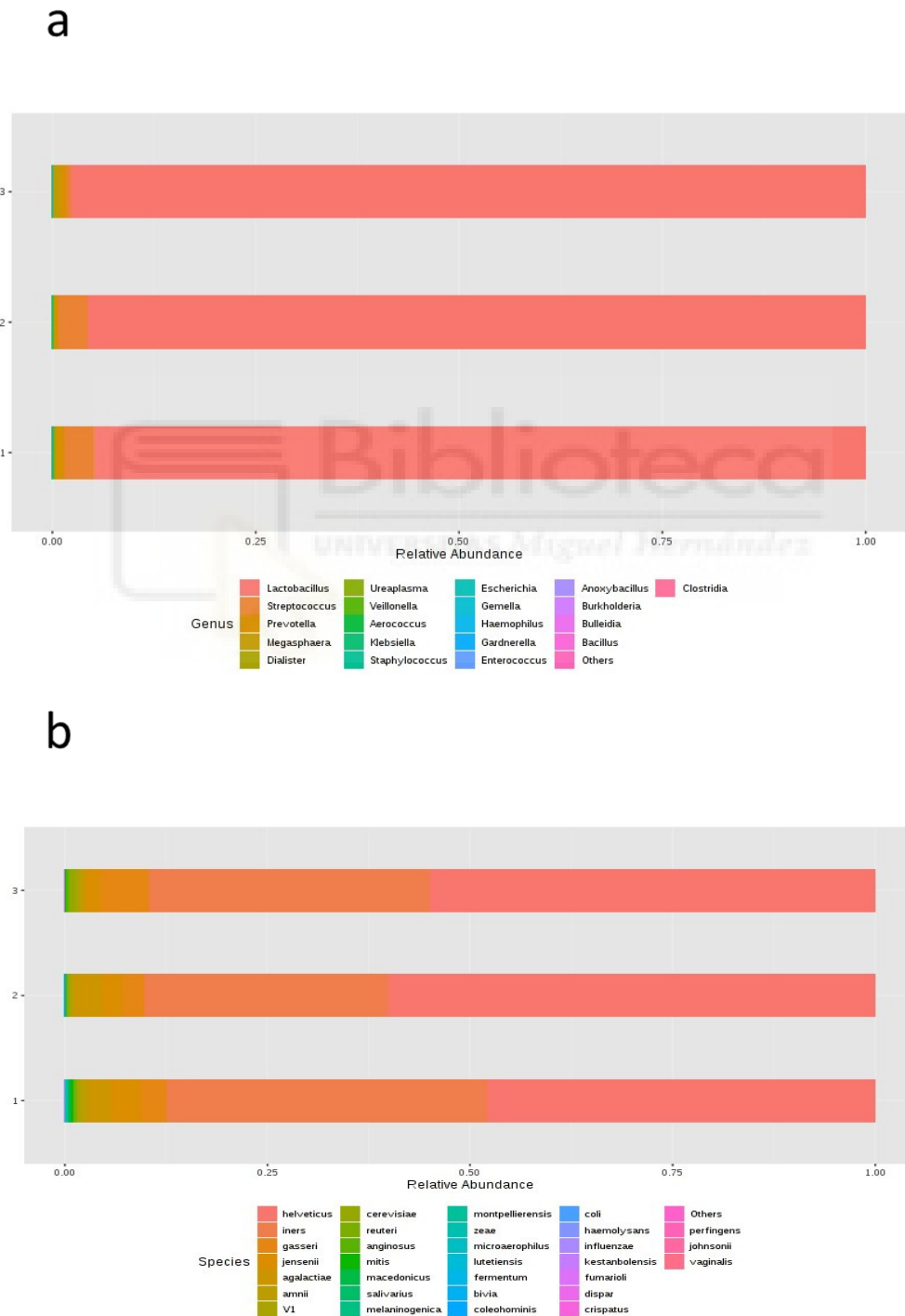
species for each sample type. *Lactobacillus iners* presents a higher relative abundance in endometrial samples, without significant difference (64% versus 40% in vaginal samples). There was a significant difference in the abundance of *L. helveticus*: 28% in the endometrium versus 47% in the vagina ( $p = 0.013$ ).



**Figure 2.** Vaginal and endometrial microbial patterns during the secretory phase of the cycle previous to FET (days 18–22 of the cycle). (a) Comparative analysis of the Shannon diversity index and the Simpson diversity index for the women in the study in relation to the study of alpha diversity. (b) MicrobiomeAnalyst MDP bar chart of the relative frequencies of the most abundant genera, grouped by type of sample.

There were no statistically significant differences in alpha or beta diversity between the samples over the different timepoints. In regard to taxonomic characterization, no statistically significant differences between timepoints for the composition of either genera or species were found (Figure 3). There were some apparent changes in the abundance of the genera *Lactobacillus*, *Streptococcus*, and *Prevotella*: both *Lactobacillus* and *Streptococcus* were more abundant in vaginal samples collected during the secretory phase of the cycle and on the day of the embryo transfer, showing a decrease on the day of the pregnancy

test; on the other hand, *Prevotella* showed a high abundance during the secretory phase of the cycle, and even higher on the day of the pregnancy test. However, the univariate analysis showed no statistically significant differences. At the species level, we found some differences in relative abundance for the following species: *L. helveticus*, *L. iners*, *L. gasseri*, and *L. jensenii* (Figure 3). The most abundant species were *L. helveticus* on the day of the embryo transfer, *L. iners*, during the secretory phase of the cycle, and *L. gasseri* on the day of the pregnancy test. On the day of the pregnancy test, results showed a smaller proportion of *L. jensenii*. However, none of these differences were statistically significant.



**Figure 3.** MicrobiomeAnalyst MDP bar chart of the relative frequency of the most abundant (a) genera and (b) species, grouped by timepoint in the cycle.



### 3.3. Microbiome Patterns Associated with Clinical Pregnancy after FET

#### 3.3.1. Vaginal Microbiome Pattern

Analyzing diversity as a function of the clinical pregnancy rate after FET, we found a greater alpha diversity in women who did not get pregnant, although the trend did not reach statistical significance (Shannon  $p = 0.075$  and Simpson  $p = 0.086$ ). Regarding the beta diversity of vaginal samples collected during the secretory phase of the cycle, we did not find statistically significant differences between women who became pregnant and those who did not. For the samples collected on the day of embryo transfer, we likewise found no statistically significant differences in alpha or beta diversity between these groups. However, there was a trend suggestive of a negative correlation between the clinical pregnancy rate and alpha diversity ( $p = 0.152$ ). The vaginal samples taken on the day of the pregnancy test showed no differences in alpha or beta diversity.

Regarding taxonomic characterization, women who became pregnant presented a significantly greater abundance of *Lactobacillus* spp. in vaginal samples collected during the secretory phase of the cycle previous to FET, compared to those who did not get pregnant. On the other hand, *Streptococcus* spp. and *Prevotella* spp. were more abundant in the latter group (Figure S3). The differences were observed at the genus level for *Lactobacillus* spp. (91% with no gestation vs. 99% with gestation;  $p = 0.045$ ) and at the species level for *L. reuteri* (0.39% vs. 0.17%;  $p = 0.040$ ; Figure 4a).

Similar results were obtained for samples collected on the day of embryo transfer. Women who achieved clinical pregnancy presented a greater relative abundance of *Lactobacillus* spp. than those who did not (97.69% versus 94.63%;  $p = 0.027$ ; Figure 4b and Figure S4); the opposite was true for the case of *Streptococcus* spp. (Figure S4). For vaginal samples collected on the day of the pregnancy test, the findings were similar (Figure S5). The univariate analysis showed statistically significant differences ( $p = 0.049$ ) for the genus *Lactobacillus* spp. (99.74% with gestation versus 97.73% without) and the species *L. reuteri* (0.30% versus 0.15%, respectively;  $p = 0.059$ ; Figure 4c).

#### 3.3.2. Endometrial Microbiome Pattern

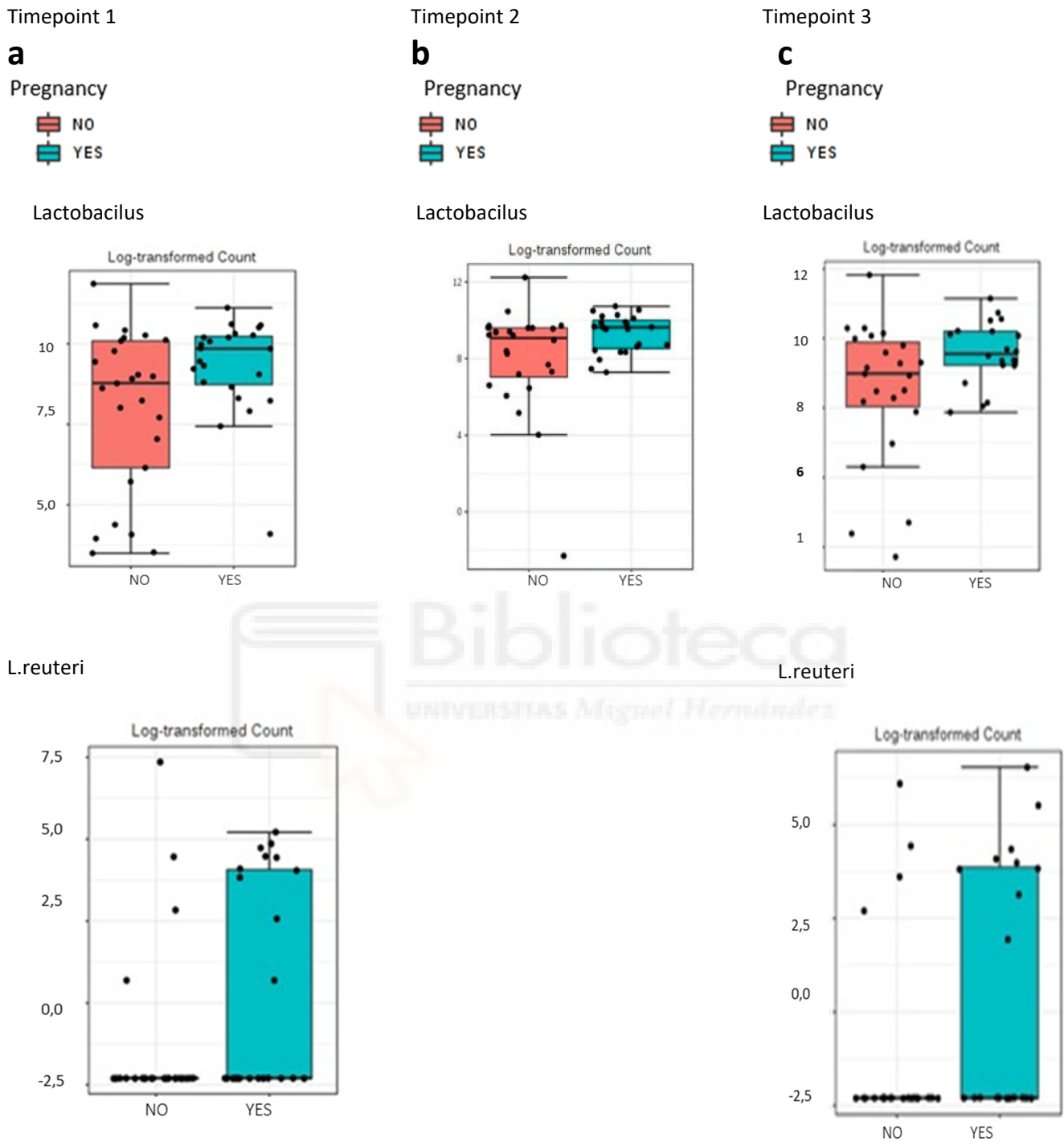
Concerning the alpha and beta diversity of endometrial samples collected during the secretory phase of the cycle previous to FET, no statistically significant differences were found between pregnant and non-pregnant women.

Figure 5 shows the taxonomic characterization of endometrial samples according to pregnancy outcome; women who achieved a clinical pregnancy had a greater abundance of *Lactobacillus* spp., *Gardnerella* spp., *Burkholderia* spp., and *Anaerobacillus* spp.; in contrast, *Streptococcus* spp., *Ralstonia* spp., *Prevotella* spp., and *Delftia* spp. were more abundant in women who did not get pregnant; however, the univariate analysis did not show significant differences in the relative abundance of these genera between groups.

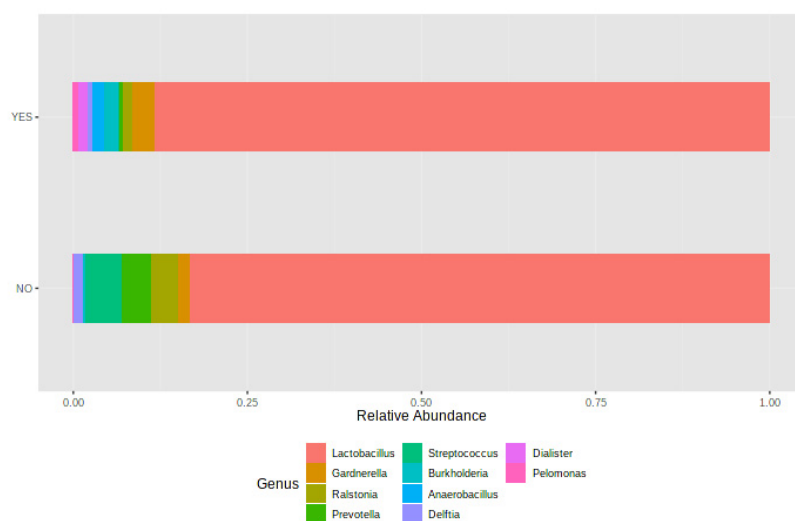
### 3.4. Microbiome Patterns Associated with Diagnosis of RIF

#### 3.4.1. Vaginal Microbiome Pattern

Regarding the vaginal microbiome pattern in the samples collected during the secretory phase of the cycle, we found no differences in alpha diversity between women with and without history of RIF according to either the Shannon or Simpson alpha diversity indices (Figure 6a). The results were statistically significant only for the Faith index. The box diagram for the Faith phylogenetic alpha diversity index (phylogenetic analog of taxon richness expressed as the number of tree units found in a sample) yielded a  $p$ -value of 0.027, representing a significantly lower Faith alpha diversity index in women with RIF compared to women without RIF.



**Figure 4.** Association of the vaginal samples taken at different timepoints with the gestation rate. (a) Univariate analysis represented with box plot showing relative abundance of *Lactobacillus* spp. (0.045) and *L. reuteri* ( $p = 0.040$ ) for the gestation rate during the secretory phase of the cycle previous to frozen embryo transfer (days 18–22 of the cycle). (b) Univariate analysis represented with box plot showing relative abundance of the genus *Lactobacillus* spp. (0.027) for the gestation rate on the day of the embryo transfer. (c) Univariate analysis represented with box plot showing relative abundance of *Lactobacillus* spp. ( $p = 0.049$ ) and *L. reuteri* ( $p = 0.059$ ) for the gestation rate on the day of the pregnancy test.



**Figure 5.** Association of the endometrial sample with the gestation rate: bar chart of the relative frequency of the most abundant genera, grouped by gestation rate.

In relation to beta diversity, no statistically significant differences were observed between women with and without RIF diagnosis (Figure S6). Likewise, the univariate analysis showed no statistically significant results. In relation to the taxonomic allocation, women with an RIF diagnosis had a lower relative abundance of the genus *Streptococcus*, and a higher abundance of *Prevotella* spp., *Ureaplasma* spp., and *Dialister* spp. Women without RIF presented a higher relative abundance of *Streptococcus* spp., *Veillonella* spp., and *Aerococcus* spp. As for the genus *Lactobacillus*, no differences were observed between groups (Figure S7). At the species level, we found a higher relative abundance of *L. helveticus* in women with RIF, and of *L. iners*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, and *L. agalactiae* in women without RIF (Figure S8).

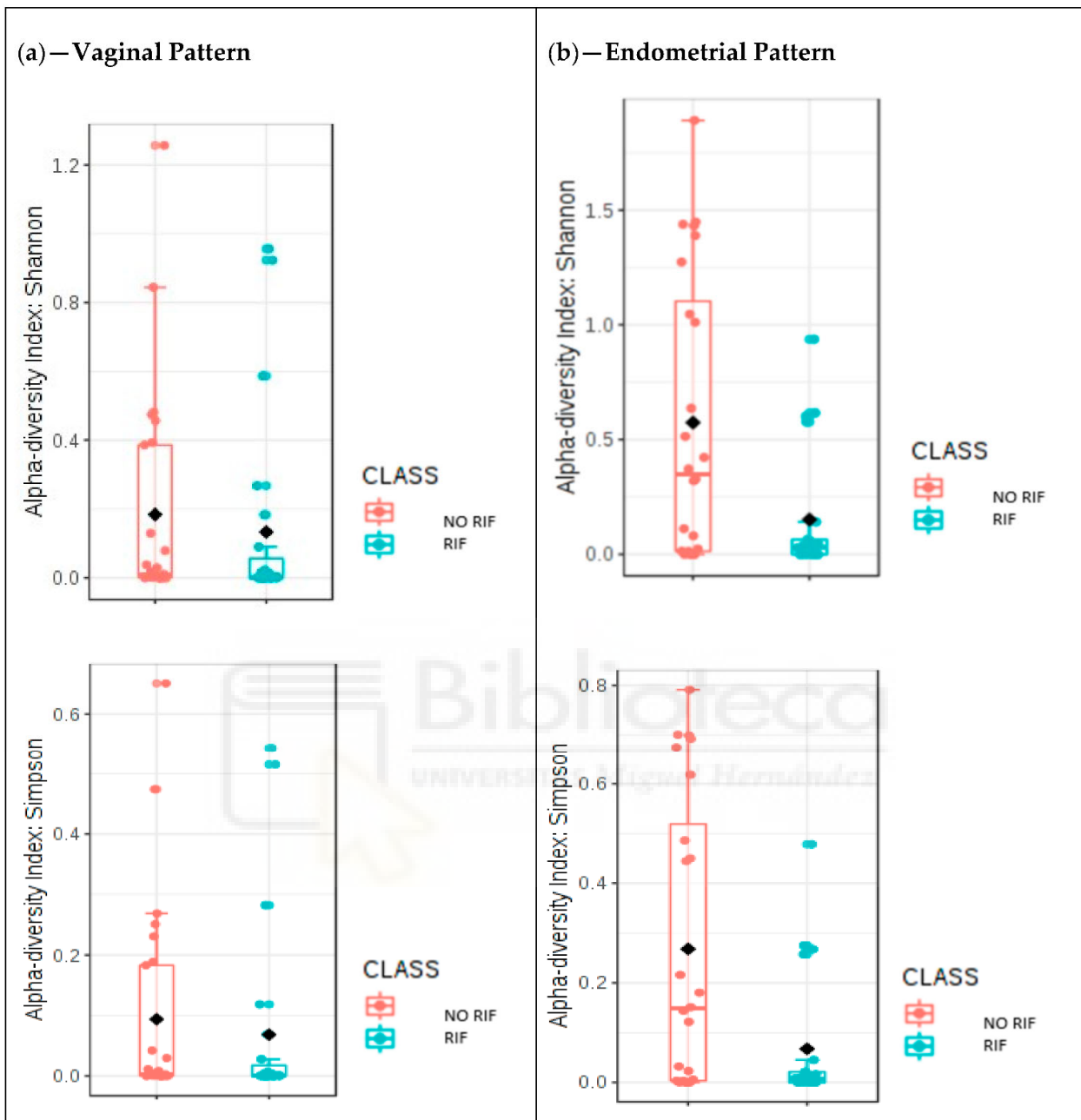
### 3.4.2. Endometrial Microbiome Pattern

The alpha diversity of the endometrial microbiome during the secretory phase of the cycle was significantly higher in women without RIF (Figure 6b;  $p = 0.021$  for both Shannon and Simpson indices). There were also statistically significant differences in beta diversity, as shown in the PCoA graph (Figure S9). There is a clear pattern of separation between women with and without RIF: the samples collected from women diagnosed with RIF fall in the top center of the graph, while those collected from women without RIF are clustered in the center. The axes show the percentage of the variance explained by each component (PC1: 31%; PC2: 14.1%; PC3: 8.9%). The results for the first and second components explain more than 45% of the variability between study samples.

The taxonomic assignment in the frequency table (Figure S10) represents the relative abundance of the different taxa present in the samples according to RIF diagnosis. A greater abundance of the genus *Prevotella* was observed in women with RIF. In the univariate analysis, we found statistically significant differences for the genus *Ralstonia*, observing a much higher relative abundance in women without RIF compared to women with RIF (0.73% versus 0.09%;  $p = 0.001$ ). Figure S11 shows the differences in relative abundance at the species level. *L. iners* and *L. jensenii* were more abundant in women without RIF, while *L. helveticus* and *Sneathia amnii* had a larger presence in women with RIF.

### 3.5. Linear Mixed-Effects Model Tests by Pregnancy Outcome and RIF Diagnosis

The variation in alpha diversity (Shannon index) at different timepoints of the cycle was assessed (Figure 7), and there were no statistically significant differences in the evolution of the vaginal microbiome patterns between timepoints of the treatment or according to the achievement of clinical pregnancy ( $p = 0.412$ ).

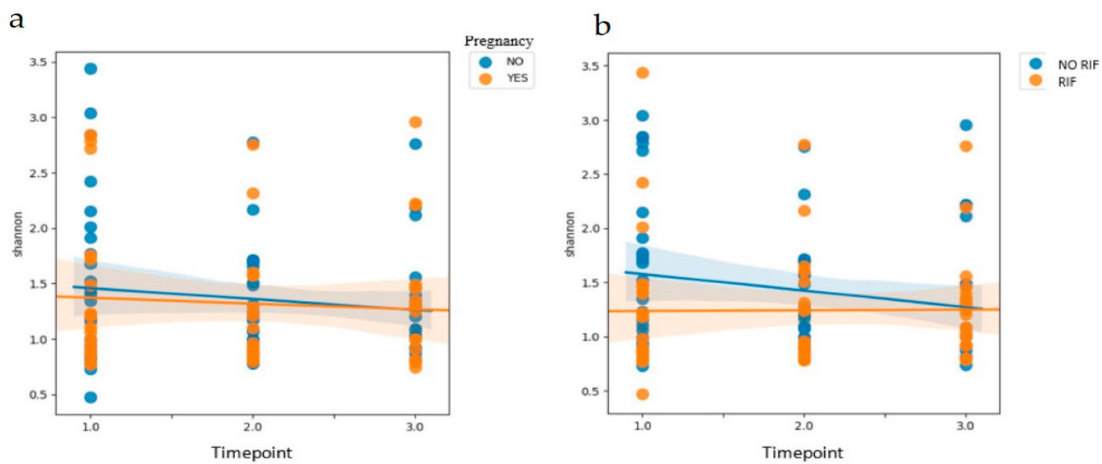


**Figure 6.** Microbiome patterns by diagnosis of repeated implantation failure (RIF). (a) Comparative analysis of the Shannon diversity index (p = 0.285) and of the Simpson index (p = 0.276) for the 276 men with and without RIF. (b) Univariate analysis represented with box plot showing the differences in the alpha diversity index for the study group in the endometrial samples. Shannon diversity index analysis,  $p = 0.021$  and Simpson,  $p = 0.021$ ; Mann-Whitney U.

### 3.5. Linear Mixed-Effects Model Tests by Pregnancy Outcome and RIF Diagnosis

The variation in alpha diversity (Shannon index) at different timepoints of the cycle was assessed (Figure 7), and there were no statistically significant differences in the evolution of the vaginal microbiome patterns between timepoints of the treatment or according to the achievement of clinical pregnancy ( $p = 0.412$ ).

Analyzing this evolution by RIF diagnosis ( $p = 0.019$ ), we observed a variation in the vaginal microbiome pattern over time in women without RIF. Specifically, these women showed a decrease in alpha diversity from the follicular to the luteal phase. In contrast, the women with RIF showed a stable microbiome pattern across different timepoints. This lack of dynamism in the pattern of the vaginal microbiome in women with RIF could entail a lack of adaptation to endometrial physiology and preparation and, therefore, a worse prognosis for embryo implantation (Figure 7).



**Figure 7.** Linear mixed-effects model tests by (a) clinical pregnancy outcome and (b) the diagnosis of repeated implantation failure (RIF).

**4. Discussion** Analyzing this evolution by RIF diagnosis ( $p = 0.019$ ), we observed a variation in the vaginal microbiome pattern over time in women without RIF. Specifically, these women showed a decrease in alpha diversity from the follicular to the luteal phase. In contrast, the women with RIF showed a stable microbiome pattern across different timepoints. This lack of dynamism in the pattern of the vaginal microbiome in women with RIF could entail a lack of adaptation to endometrial physiology and preparation and, therefore, a worse prognosis for embryo implantation (Figure 7).

The results of this study show that there were no differences in the diversity of the vaginal microbiome between women who got pregnant and those who did not, but there were differences in its taxonomic characterization, and with regard to several microbial patterns, statistically significant differences were found between women with and without RIF. With regard to endometrial microbiome patterns, there were statistical differences in the composition of the vaginal versus endometrial microbiomes. Our results also suggest stability of the vaginal microbiome throughout different timepoints of the cycle. On the other hand, the vaginal samples collected during the secretory phase of the cycle previous to FET showed differences only for the Faith index between the women with and without RIF diagnosis, with a higher alpha diversity in women with a history of RIF. At the taxonomic level, the relative abundance of the genera in women with RIF was different from those without RIF. With regard to endometrial microbiome patterns, higher in vaginal samples of women who achieved clinical pregnancy after FET than of those who did not. However, Franasiak et al. [15] did not obtain statistically significant values as we did. We also observed that *Streptococcus* and *Prevotella* may be associated with a poor prognosis with regard to gestation, while an abundance of *Lactobacillus* spp. could be indicative of more favorable conditions. Since no statistically significant differences were obtained when analyzing the differences in relative abundance between samples taken at three different timepoints of the cycle, we concluded that the vaginal microbiome could be taken at any timepoint to obtain similar findings. The microbiome is usually affected by ovarian steroids, and the FET cycle may be related to higher local serum progesterone (P4) levels than in the previous cycle (timepoint 1). However, since all patients had one



endometrial preparation per hormonal cycle substituted, we considered that this factor was homogeneous for all study participants.

*Lactobacillus* spp. are the most abundant bacteria in the vaginal samples. The ability of lactobacilli to inhibit infection without inducing inflammation can maximize fertility and favor pregnancy outcomes [16]. In relation to the endometrium microbiome, we did not find differences between women who got pregnant and those who did not. The presence of a non-*Lactobacillus*-dominated microbiome (NLDM)—i.e., < 90% *Lactobacillus* spp. with > 10% of other bacteria—was associated with lower rates of implantation, pregnancy rate, pregnancy progression, and live birth [17]. In this study, women classified as having an NLDM and showing a relative abundance of more than 80% *Lactobacillus* spp. in the endometrium showed good pregnancy outcomes, suggesting that this threshold could be considered sufficient for embryonic implantation [17]. In addition, even if classified as having an NLDM, the endometrium with a dominant quantity of *Bifidobacteria* could also be an acceptable environment for implantation [18]. Kyono et al. [19] analyzed both the endometrial and vaginal microbiomes in the infertile Japanese population and assessed their impact on embryonic implantation. The bacterial status of the endometrium and vagina showed *Lactobacillus*-dominated microbiota (> 90% *Lactobacillus* spp.) in the endometria of 38% of IVF patients, and in the vaginas of 44.3%. The mean percentage of *Lactobacillus* spp. in pregnant women was 96.45% (SD 33.61%). A considerably high proportion of NLDMs was found in the endometria of infertile Japanese women. A subsequent pilot study by Kyono et al. [18] did show that the predominance of *Lactobacillus* in the endometrium was favorable in terms of the pregnancy rate, but the results were not conclusive. A previous meta-analysis [20] concluded that women with abnormal vaginal microbiota are approximately 1.4 times less likely to achieve first-trimester pregnancy after IVF treatment compared to women with normal microbiota; however, the methodologies of the included studies were heterogeneous.

In the present study, the taxonomic characterization showed differences in the microbial profiles between the vaginal and endometrial samples in terms of genera and species. The univariate analysis performed on the relative abundance of the different genera by sample type reached statistical significance for *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Ureaplasma* spp., *Delftia* spp., *Anaerobacillus* spp., *Ralstonia* spp., and the species *L. helveticus*. These results suggest that vaginal and endometrial samples are different in terms of both microbial diversity and the composition of the taxa. In a previous pilot study [21], the dominant members of the microbial community were constant in the vagina and the cervix, and generally consistent in the endometrium; however, the relative proportions varied. In addition, infertile women tended to have *Ureaplasma* spp. in the vagina and *Gardnerella* spp. in the cervix more frequently than fertile women. In relation to the above-mentioned study, our analysis of alpha and beta indices for the microbial diversity of vaginal and endometrial samples revealed significant differences. Although the diversity of the vaginal microbiome could be expected a priori to be higher than that of the endometrial one due to factors such as more direct exposure to the outside of the body and direct contact with the seminal sample during sexual intercourse, the present study found a more diverse microbiome in the endometrium than in the vagina. This fact could be due to the non-dominance of a genus (more than 90% of relative abundance according to current scientific evidence), which can lead to colonization by other types of microorganisms and, thus, generate a more diverse environment, which might be related to infertility.

Another important aspect of the present study is the assessment of both diversity and taxonomic characterization according to participants' history of RIF. Previously, the endometrial and vaginal microbiota were characterized by Kitaya et al. [22] in infertile women with and without history of RIF. The microbiota detected in the endometrium showed significant variation in the composition of the bacterial community between the RIF and non-RIF groups, which was not observed in the vagina. *Burkholderia* spp. were not detected in the microbiota of the endometrium in any sample women without RIF, but they were present in a quarter of the RIF patients. In our study, alpha diversity was higher

at the endometrial level in women without RIF. This did not occur in vaginal samples, where no differences were observed. In addition, according to our findings and the available literature, a greater microbial diversity in the case of the vaginal and endometrial microbiota seems to be a scenario most unfavorable for the success of IVF treatments. The results of alpha diversity should be interpreted with caution, especially in patients with RIF. A detailed knowledge of the composition of this microbial pattern is necessary in order to know the % relative abundance of the genera, species, and subspecies present in the samples, and even to examine in depth the presence of pathogens that may have an effect on the vagina and/or endometrium. In the above-mentioned study, the authors found differences in the endometrial microbiota in both groups. When we analyzed the taxonomic characterization, we also observed clear differences in the relative abundances of the different genera and species in the endometrial microbiome between women with and without RIF. Unlike Kitaya et al. [19], we found no differences with respect to the genus *Burkholderia*. The generalized linear model showed that the vaginal microbiome pattern in women without RIF changed between different timepoints of the cycle, while in women with RIF it remained stable. This could be due to a possible adaptation of the microbiome pattern as a result of physiological changes occurring during the cycle. The possible causes and mechanisms involved in these modifications are still unknown and unstudied, but this could be a valuable line of future research.

In view of our study's findings, before infertility treatment, both the vaginal and endometrial microbiomes can be examined as targets to improve pregnancy rates. A detailed knowledge of the composition of the microbiome pattern, together with the alpha and beta diversity analysis, might be helpful to guide the treatments.

#### *Strengths and Limitations*

Strengths of this study include the use of NGS to sequence the hypervariable regions of the 16S ribosome subunit. Another strength was the use of the Tao Brush to obtain the endometrial samples, as this device has a sheath that covers the specimen and closes before removal from the uterus and passage through the vagina; its design thus prevents any possible contamination by microorganisms from the vagina, and avoids the extraction of samples with patterns that are not directly associated with the endometrial microbiome. Moreover, all of the transferred embryos in the participants were previously analyzed via NGS to confirm chromosome normality and homogeneity, thus avoiding any bias due to embryological factors.

The main limitation was the sample size, which was small due to the pilot study design. Other limitations could be potential confounding stemming from recent sexual relations in some participants, which could have influenced the microbial compositions obtained. Finally, we only extracted endometrial samples at one timepoint in the cycle, in order to avoid compromising the treatment outcome and embryo implantation. This decision limited the amount of information we could obtain on the endometrial pattern, as no samples were taken for the other two timepoints. However, this limitation was partially overcome, as the vaginal samples were taken at three timepoints.

Further studies are needed in order to confirm our findings and to clarify the role of antibiotic and/or probiotic treatment in the normalization of the microbiome pattern and its consequences on clinical outcomes. Future research on the endometrial and vaginal microbiomes, along with their effects on and associations with reproductive health and infertility, should take a comprehensive approach, including an analysis of any interactions with the immune system and between different strains, metabolic and transcriptomic variables, and a study of biofilms—all of which are related to implantation and clinical pregnancy rates.

## 5. Conclusions

There were no differences in the diversity of the vaginal and endometrial microbiomes between women who got pregnant and those who did not, but there were differences in their taxonomic characterization.

The vaginal samples collected showed differences during the secretory phase of the cycle previous to FET only for the Faith index between the women with and without RIF diagnosis, with a higher alpha diversity in women with a history of RIF; the relative abundance of the genera in women with RIF was different from those without RIF, at the taxonomic level.

With respect to the endometrial microbiome pattern, we found statistically significant differences between women with and without RIF.

**Supplementary Materials:** The following are available at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jcm10184063/s1>. Figure S1: The unweighted UniFrac PCoA, based on the UniFrac distance matrix, which represents the study samples with different colors depending on the samples—vaginal (red) or endometrial (blue), QIIME2; Figure S2: Pie chart of the relative frequency of the most abundant species for each sample type; Figure S3: Bar chart of the relative frequency of the most abundant genera, grouped by gestation rate during the secretory phase of the cycle previous to frozen embryo transfer (days 18–22 of the cycle), MicrobiomeAnalyst MDP; Figure S4: Bar chart of the relative frequency of the most abundant genera, grouped by gestation rate for the second timepoint, MicrobiomeAnalyst MDP; Figure S5: Bar chart of the relative frequency of the most abundant genera, grouped by gestation rate on the day of the pregnancy test, MicrobiomeAnalyst MDP; Figure S6: The unweighted UniFrac PCoA, based on the UniFrac distance matrix, which represents the study samples with different colors depending on the RIF diagnosis—vaginal (red) or endometrial (blue), QIIME2; Figure S7: Bar chart of the relative frequency of the most abundant genera, grouped by RIF diagnosis, in the vaginal samples, MicrobiomeAnalyst MDP; Figure S8: Bar chart of the relative frequency of the most abundant species, grouped by RIF diagnosis, in the vaginal samples, MicrobiomeAnalyst MDP; Figure S9: The unweighted UniFrac PCoA, which represents the women with and without RIF diagnosis using different colors—without RIF (red) or with RIF (blue), QIIME2; Figure S10: Bar chart of the relative frequency of the most abundant genera, grouped by RIF diagnosis, MicrobiomeAnalyst MDP; Figure S11: Bar chart of the relative frequency of the most abundant species, grouped by RIF diagnosis, MicrobiomeAnalyst MDP (*L. iners*, *L. helveticus*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *S. amnii*; V3 represents unidentified species).

**Author Contributions:** Conceptualization, M.d.C.D.-M., A.B., B.L., C.C.-M., A.L.-P., R.N.-G., and R.B.; methodology, F.M.L., R.M., B.L., J.L., and J.T.; validation, V.R., A.R., B.M., and J.C.C.; formal analysis, B.L. and J.A.Q.; investigation, M.d.C.D.-M., A.B., B.L., F.M.L., R.M., B.L., J.L., and J.T.; resources, A.B. and R.B.; data curation, F.M.L., R.M., B.L., J.L., and J.T.; writing—original draft preparation, M.d.C.D.-M., B.L., and A.B.; writing—review and editing, R.N.-G., C.C.-M., A.L.-P., J.A.Q., F.M.L., V.R., R.M., J.L., J.T., J.C.C., A.R., B.M., and R.B.; visualization, A.L.-P., A.B., M.d.C.D.-M., and A.B.; supervision, C.C.-M., A.B., B.L., R.B.; project administration, M.d.C.D.-M., A.B., B.L., C.C.-M., A.L.-P., R.N.-G., and R.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding.

**Institutional Review Board Statement:** This study was conducted in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by The Clinical Research Ethics Committee (CEIC) of the University Hospital San Juan de Alicante (Reference code: 16/318, 13 January 2017)).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

**Data Availability Statement:** All of the data used for this analysis can be confirmed at any time.

**Acknowledgments:** We thank Ania Pitas for her assistance in editing and formatting the manuscript for publication.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.



## References

1. Simon, C. Introduction: Do microbes in the female reproductive function matter? *Fertil. Steril.* **2018**, *110*, 325–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Baker, J.M.; Chase, D.M.; Herbst-Kralovetz, M.M. Uterine Microbiota: Residents, Tourists, or Invaders? *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Witkin, S.S.; Linhares, I.M.; Giraldo, P. Bacterial flora of the female genital tract: Function and immune regulation. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2007**, *21*, 347–354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Lambert, J.A.; John, S.; Sobel, J.D.; Akins, R.A. Longitudinal analysis of vaginal microbiome dynamics in women with recurrent bacterial vaginosis: Recognition of the conversion process. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e82599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Ralph, S.G.; Rutherford, A.J.; Wilson, J.D. Influence of bacterial vaginosis on conception and miscarriage in the first trimester: Cohort study. *BMJ* **1999**, *319*, 220–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Sirota, I.; Zarek, S.M.; Segars, J.H. Potential influence of the microbiome on infertility and assisted reproductive technology. *Semin. Reprod. Med.* **2014**, *32*, 35–42. [[CrossRef](#)]
7. Sun, H.; Gong, T.T.; Jiang, Y.T.; Zhang, S.; Zhao, Y.H.; Wu, Q.J. Global, regional, and national prevalence and disability-adjusted life-years for infertility in 195 countries and territories, 1990–2017: Results from a global burden of disease study, 2017. *Aging* **2019**, *11*, 10952–10991. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Faddy, M.J.; Gosden, M.D.; Gosden, R.G. A demographic projection of the contribution of assisted reproductive technologies to world population growth. *Reprod. Biomed. Online* **2018**, *36*, 455–458. [[CrossRef](#)]
9. Fanchin, R.; Harmas, A.; Benaoudia, F.; Lundkvist, U.; Olivennes, F.; Frydman, R. Microbial flora of the cervix assessed at the time of embryo transfer adversely affects in vitro fertilization outcome. *Fertil. Steril.* **1998**, *70*, 866–870. [[CrossRef](#)]
10. Kroon, B.; Hart, R.J.; Wong, B.M.; Ford, E.; Yazdani, A. Antibiotics prior to embryo transfer in ART. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2012**, *3*, CD008995. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Salim, R.; Ben-Shlomo, I.; Colodner, R.; Keness, Y.; Shalev, E. Bacterial colonization of the uterine cervix and success rate in assisted reproduction, results of a prospective survey. *Hum. Reprod.* **2002**, *17*, 337–340. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. García-Velasco, J.A.; Budding, D.; Campe, H.; Malferteiner, S.F.; Hamamah, S.; Santjohanser, C.; Schuppe-Koistinen, I.; Nielsen, H.S.; Vieira-Silva, S.; Laven, J. The reproductive microbiome—Clinical practice recommendations for fertility specialists. *Reprod. Biomed. Online* **2020**, *41*, 443–453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Moreno, I.; Simon, C. Relevance of assessing the uterine microbiota in infertility. *Fertil. Steril.* **2018**, *110*, 337–343. [[CrossRef](#)]
14. Di Simone, N.; Santamaria Ortiz, A.; Specchia, M.; Tersigni, C.; Villa, P.; Gasbarrini, A.; Scambia, G.; D'Ippolito, S. Recent Insights on the Maternal Microbiota: Impact on Pregnancy Outcomes. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 528202. [[CrossRef](#)]
15. Franasiak, J.M.; Werner, M.D.; Juneau, C.R.; Tao, X.; Landis, J.; Zhan, Y.; Treff, N.R.; Scott, R.T. Endometrial microbiome at the time of embryo transfer: Next-generation sequencing of the 16S ribosomal subunit. *J. Assist. Reprod. Genet.* **2016**, *33*, 129–136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Witkin, S.S.; Linhares, I.M. Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota? *BJOG* **2017**, *124*, 606–611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Moreno, I.; Codoñer, F.M.; Vilella, F.; Valbuena, D.; Martinez-Blanch, J.F.; Jimenez-Almazán, J.; Alonso, R.; Alamá, P.; Remohí, J.; Pellicer, A.; et al. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **2016**, *215*, 684–703. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Kyono, K.; Hashimoto, T.; Kikuchi, S.; Nagai, Y.; Sakuraba, Y. A pilot study and case reports on endometrial microbiota and pregnancy outcome: An analysis using 16S rRNA gene sequencing among IVF patients, and trial therapeutic intervention for dysbiotic endometrium. *Reprod. Med. Biol.* **2019**, *18*, 72–82. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Kyono, K.; Hashimoto, T.; Nagai, Y.; Sakuraba, Y. Analysis of endometrial microbiota by 16S ribosomal RNA gene sequencing among infertile patients: A single-center pilot study. *Reprod. Med. Biol.* **2018**, *17*, 297–306. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Singer, M.; Borg, M.; Ouburg, S.; Morré, S.A. The relation of the vaginal microbiota to early pregnancy development during in vitro fertilization treatment—A meta-analysis. *J. Gynecol. Obstet. Hum. Reprod.* **2019**, *48*, 223–229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Wee, B.A.; Thomas, M.; Sweeney, E.L.; Frentiu, F.D.; Samios, M.; Ravel, J.; Gajer, P.; Myers, G.; Timms, P.; Allan, J.A.; et al. A retrospective pilot study to determine whether the reproductive tract microbiota differs between women with a history of infertility and fertile women. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol.* **2018**, *53*, 341–348. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kitaya, K.; Nagai, Y.; Arai, W.; Sakuraba, Y.; Ishikawa, T. Characterization of Microbiota in Endometrial Fluid and Vaginal Secretions in Infertile Women with Repeated Implantation Failure. *Mediat. Inflamm.* **2019**, *2019*, 4893437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## DECLARACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA (CEIC)

---

Este estudio se realizó de acuerdo con las directrices de la Declaración de Helsinki, y fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario San Juan de Alicante (Código de referencia: 16/318, 13 de enero de 2017).



### COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO SAN JUAN DE ALICANTE

---

D. DOMINGO OROZCO BELTRÁN, Secretario del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario San Juan de Alicante,

#### CERTIFICA

Que este Comité, en su reunión de fecha 29 de Noviembre de 2016, ha evaluado la propuesta de la investigadora, **Dra. Andrea Bernabeu García** del Instituto Bernabeu de Alicante, para que sea realizado el proyecto de investigación titulado **“ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL MICROBIOMA VAGINAL Y ENDOMETRIAL SOBRE LOS RESULTADOS DE LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCION ASISTIDA”**, Código de Comité: 16/318.

y que considera que:

- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio.
- La capacidad del investigador y los medios disponibles son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Son adecuados los procedimientos para obtener el consentimiento informado.
- El tratamiento de la información del estudio se realizará conforme a la legislación vigente de protección y confidencialidad de los datos en relación a los métodos, riesgos y tratamiento de los mismos tal y como se contempla en la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos.

y que este Comité da su aprobación a dicho estudio para que sea realizado por la investigadora, **Dra. Andrea Bernabeu García** del Instituto Bernabeu de Alicante.

Lo que firmo en San Juan, a 13 de Enero de 2017

SECRETARIO DEL CEIC



*Domingo Orozco Beltrán*  
Fdo.: Domingo Orozco Beltrán

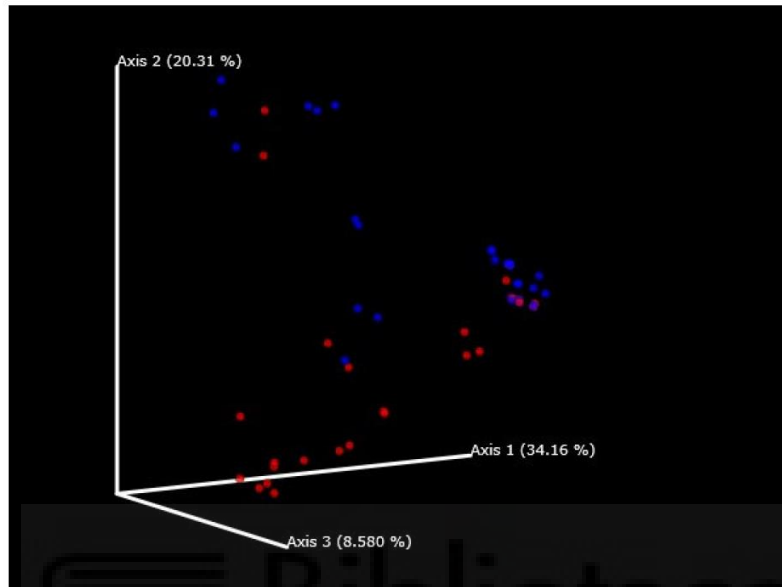
Biblioteca

**APÉNDICE**

---

**FIGURAS SUPLEMENTARIAS**

## SUPPLEMENTARY MATERIALS



**Figure S1.** The unweighted UniFrac PCoA, based on the UniFrac distance matrix, which represents the study samples with different colors depending on the samples—vaginal (red) or endometrial (blue), QIIME2.

Figure S2

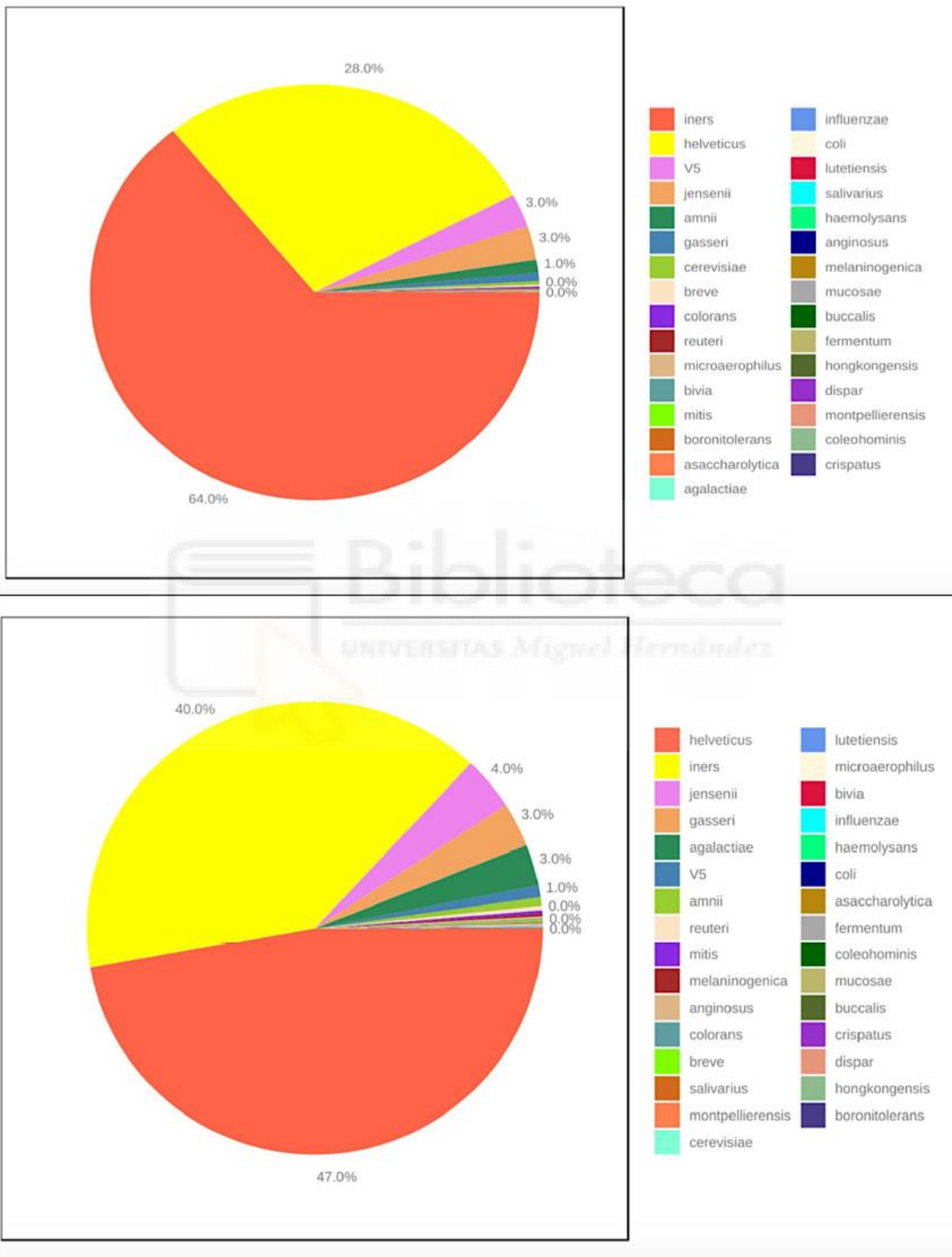


Figure S2. Pie chart of the relative frequency of the most abundant species for each sample type.

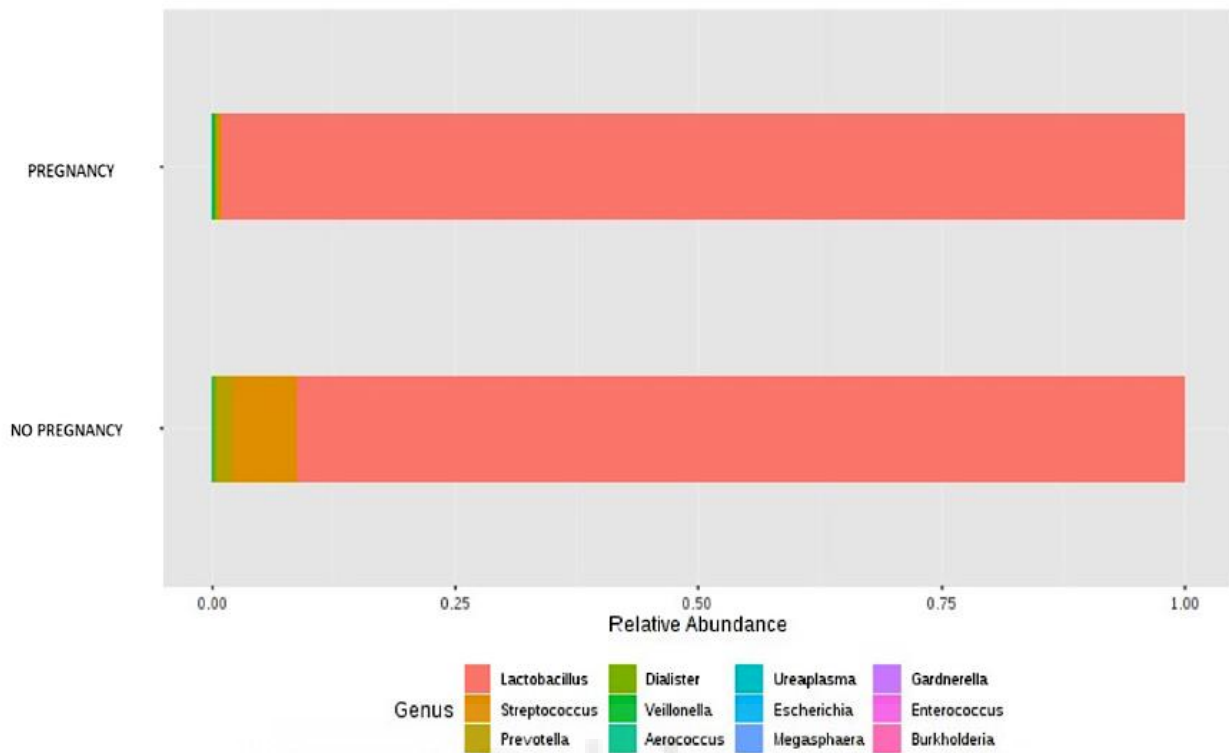


Figure S3. Bar chart of the relative frequency of the most abundant genera, grouped by gestation rate during the secretory phase of the cycle previous to frozen embryo transfer (days 18–22 of the cycle), MicrobiomeAnalyst MDP.

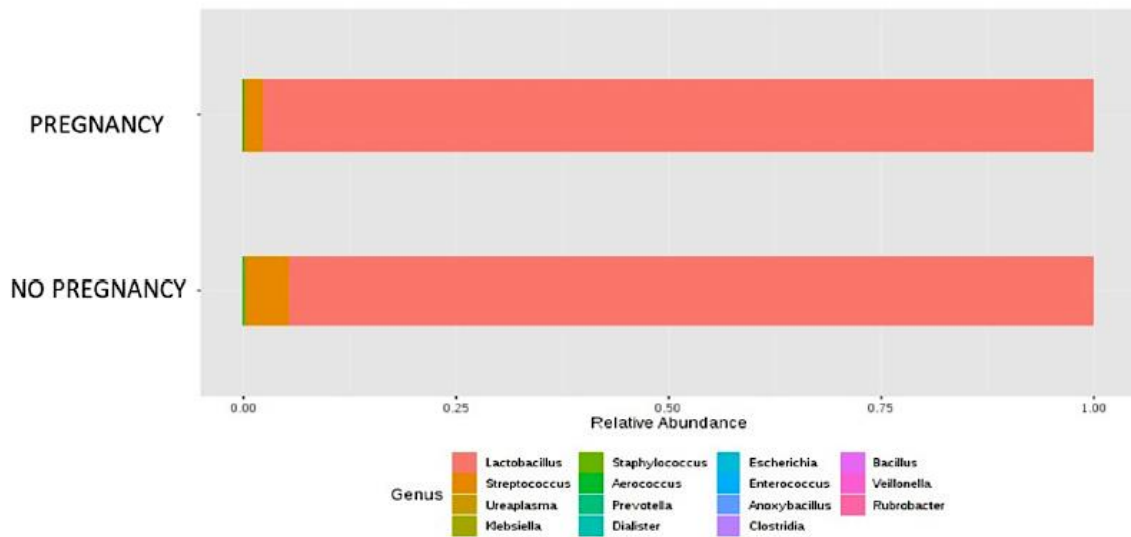


Figure S4. Bar chart of the relative frequency of the most abundant genera, grouped by gestation rate for the second timepoint, MicrobiomeAnalyst MDP.

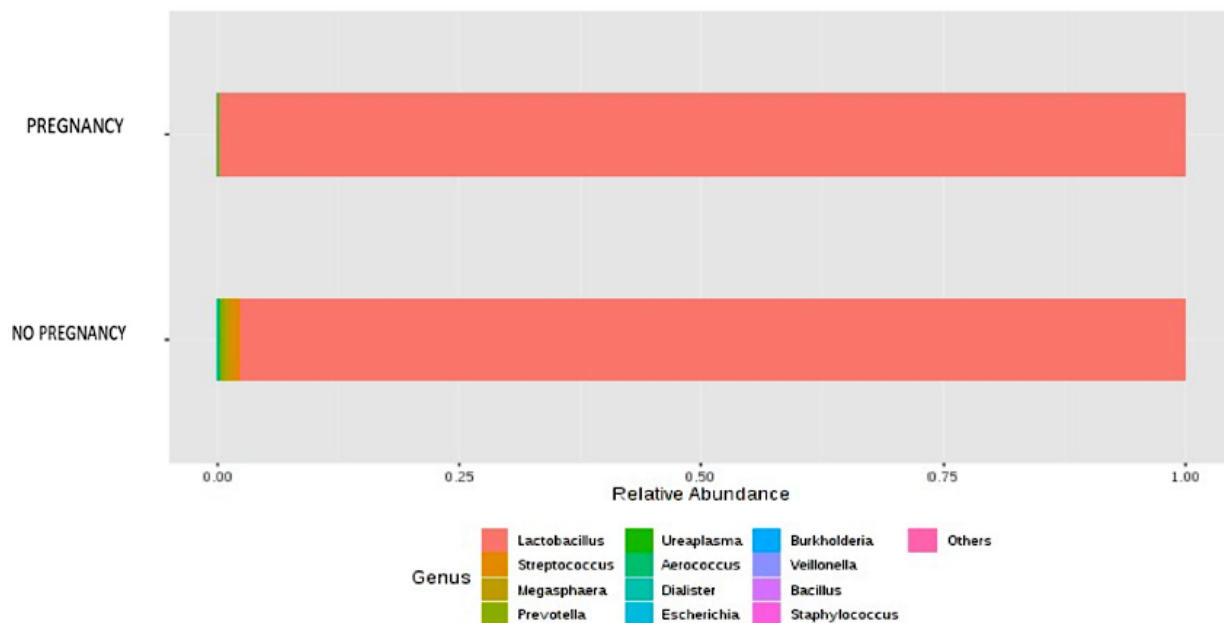


Figure S5. Bar chart of the relative frequency of the most abundant genera, grouped by gestation rate on the day of the pregnancy test, MicrobiomeAnalyst MDP.

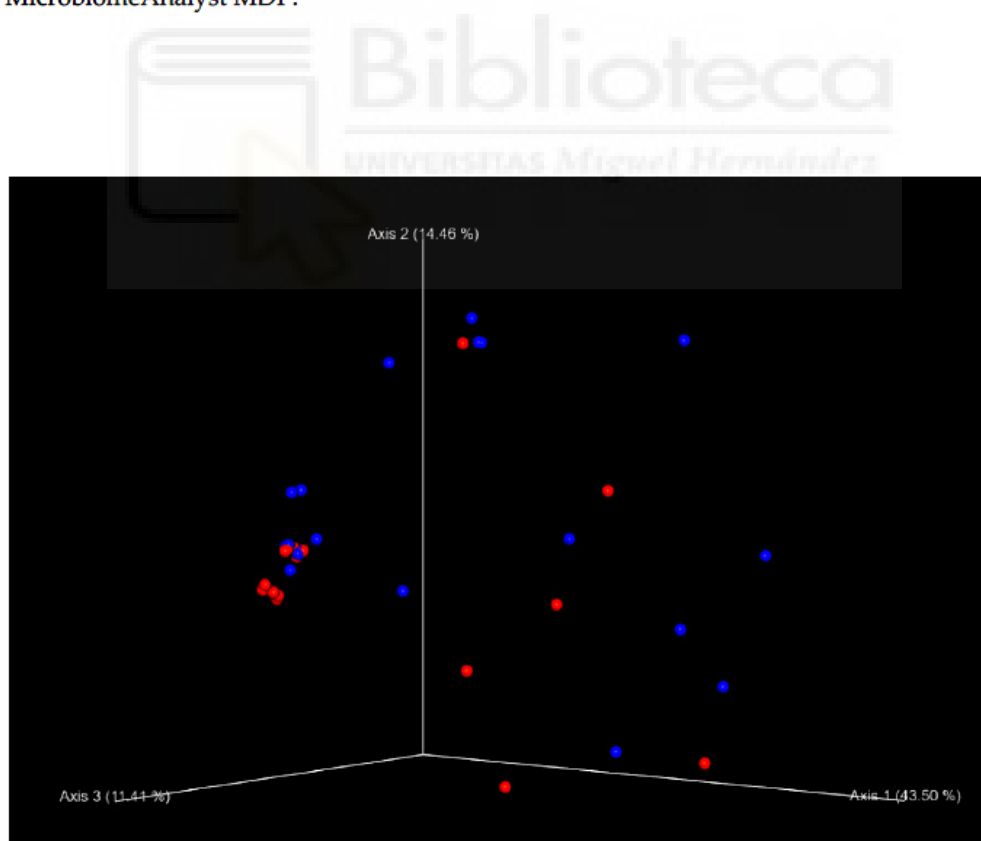


Figure S6. The unweighted UniFrac PCoA, based on the UniFrac distance matrix, which represents the study samples with different colors depending on the RIF diagnosis—vaginal (red) or endometrial (blue), QIIME2.

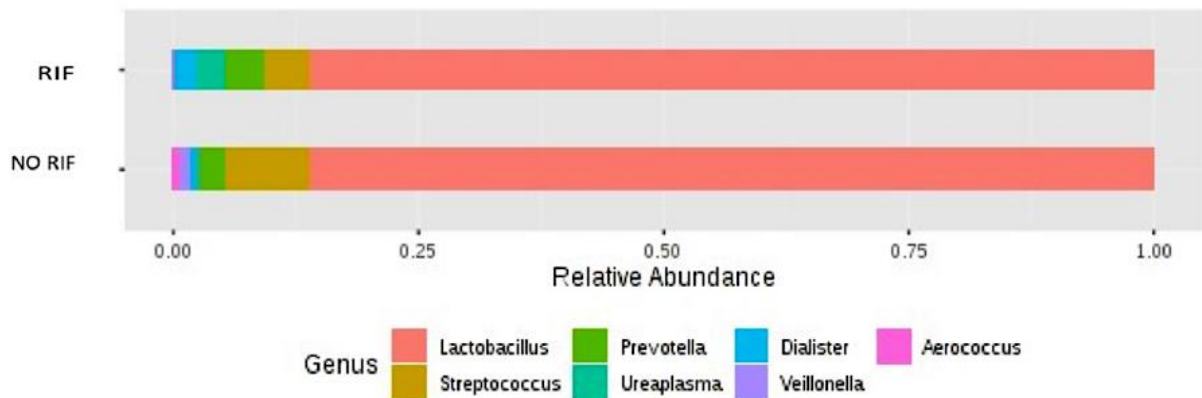


Figure S7. Bar chart of the relative frequency of the most abundant genera, grouped by RIF diagnosis, in the vaginal samples, MicrobiomeAnalyst MDP.

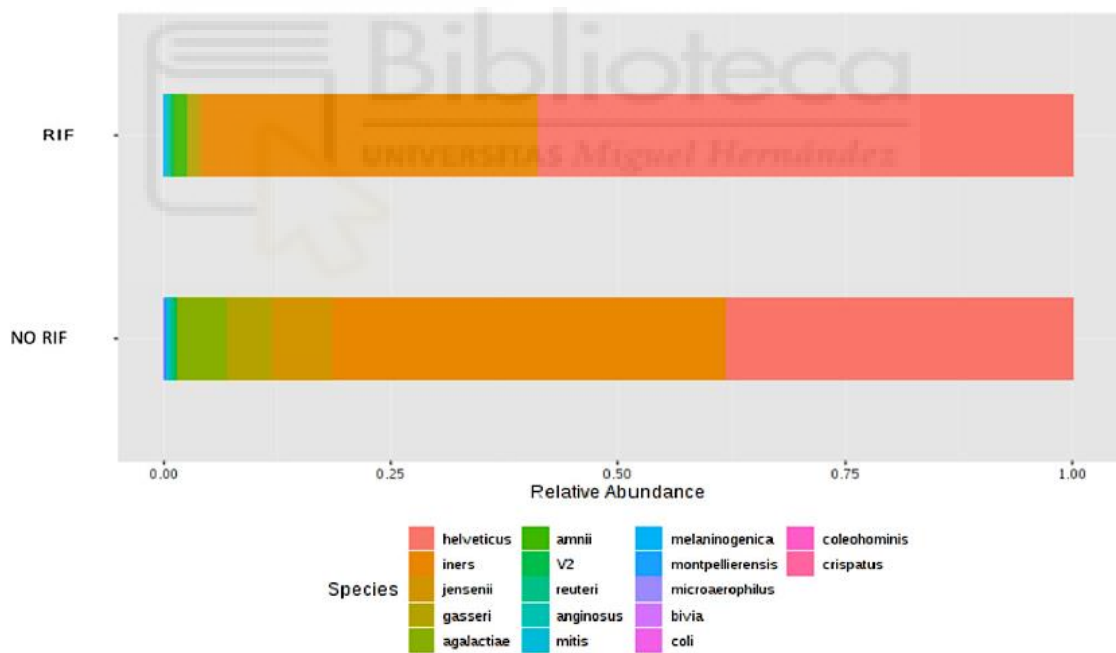


Figure S8. Bar chart of the relative frequency of the most abundant species, grouped by RIF diagnosis, in the vaginal samples, MicrobiomeAnalyst MDP.



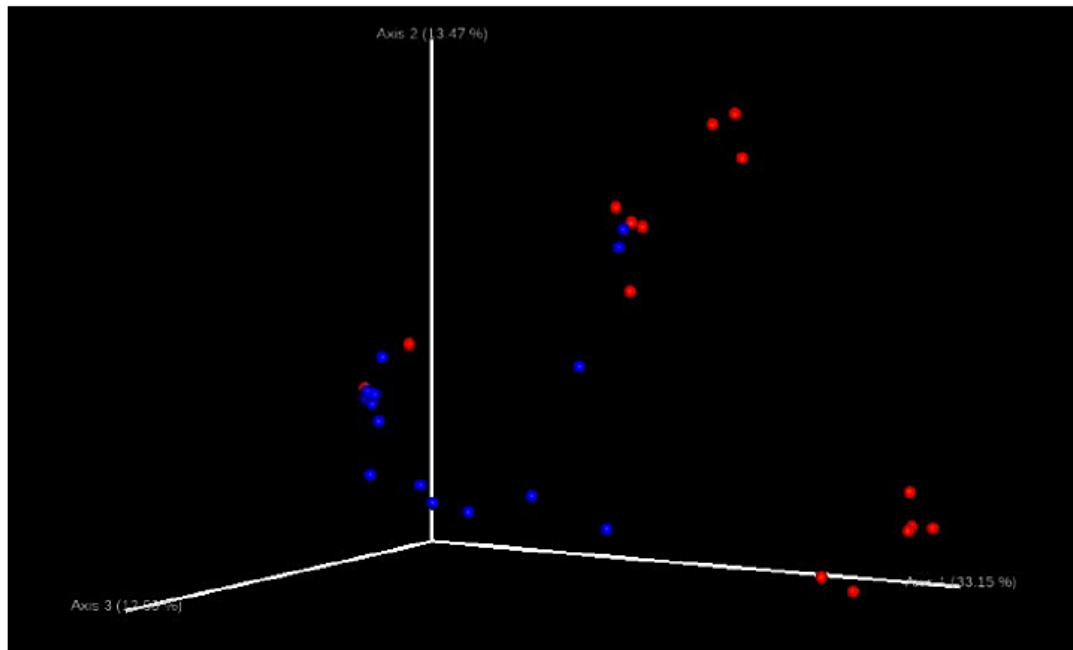


Figure S9. The unweighted UniFrac PCoA, which represents the women with and without RIF diagnosis using different colors—without RIF (red) or with RIF (blue), QIIME2.

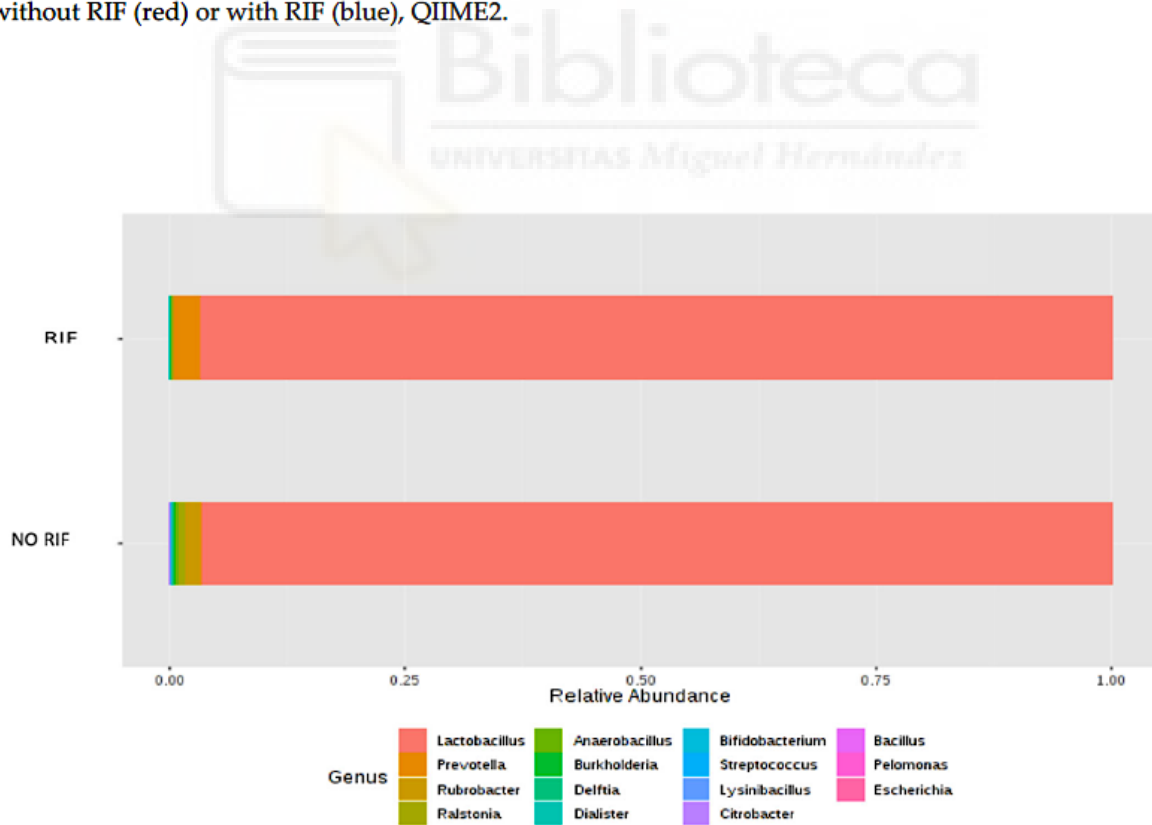


Figure S10. Bar chart of the relative frequency of the most abundant genera, grouped by RIF diagnosis, MicrobiomeAnalyst MDP.

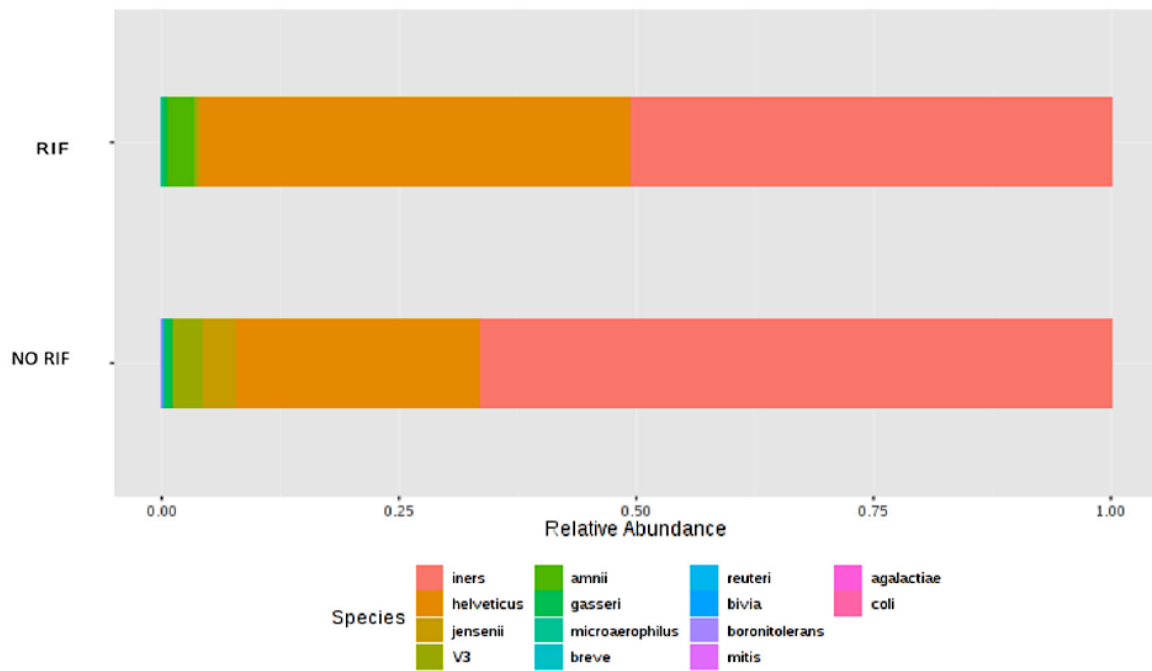


Figure S11. Bar chart of the relative frequency of the most abundant species, grouped by RIF diagnosis, MicrobiomeAnalyst MDP (*L. iners*, *L. helveticus*, *L. jensenii*, *L. gasseri*, *S. amnii*; V3 represents unidentified species).

## AGRADECIMIENTOS

---

A todas las personas que han participado de forma directa o indirecta en la parte de investigación, análisis y desarrollo de mi tesis doctoral. Mi agradecimiento a las personas de la Universidad Miguel Hernández, que me han ayudado desde el principio. En especial a mi directora de tesis, la Prof<sup>a</sup> Dra. Concepción Carratalá Munuera, que con suma empatía ha sabido guiarme para llevar a cabo este proyecto, y entender mis altibajos en el camino, por lo que le estoy sumamente agradecida. También mis agradecimiento a la Dra. Adriana López Pineda, Dr. Rauf Nouni García y Prof<sup>o</sup> Dr. José Antonio Quesada Rico. Al personal del laboratorio de genética molecular, y en especial a la Dra. Belén Lledó, que, con una paciencia infinita, me enseñó las técnicas de análisis para poder obtener los resultados genéticos de las muestras. Me llevo mucho aprendido de la parte técnica, y sobre todo humana de este laboratorio.

A mis compañeros del laboratorio de embriología, que me ayudaron y apoyaron siempre. Me llevo todo su cariño, y un aprendizaje sobre lo importante que es el trabajo en equipo en la investigación. Me gustaría incluir en mis agradecimientos a todo el personal de Instituto Bernabeu de Alicante que, sin interés propio, han ayudado a que todas las muestras se pudiesen obtener y analizar con los requerimientos necesarios y en tiempo.

No quiero dejar pasar mi agradecimiento a la Dra. Andrea Bernabeu y el Dr. Rafael Bernabeu, por presentarme la oportunidad de realizar mi tesis en “su casa”, poner los medios y apoyo necesarios para ello. Hay momentos inolvidables, y uno de ellos, es cuando me dijeron que si quería desarrollar mi tesis doctoral en este ámbito de estudio. En ese momento, empecé mi pasión por la microbiota aplicada a la embriología humana. Desde entonces, sigo aprendiendo y dedicándome a su estudio.

Por último, a mi familia, que siempre me ha apoyado, y le ha dado la importancia que para mí ha tenido, tiene y tendrá esta tesis doctoral, que ahora, se hace realidad. A mi marido, Vicente, que siempre lo creyó posible, y me ha tendido su mano en cada paso, a mis padres y mi hermano, por su cariño y apoyo, y mis amigos/as, que siempre creyeron en mí. Por último y la más importante, a mi hija Sofía, que me escuchó teclear y me acompañó en el laboratorio, cuando aún estaba en mi barriga, y la que cada día me da luz y fuerza para seguir siendo un poquito mejor. GRACIAS.