

Efecto del microbioma vaginal en la tasa de embarazo en pacientes que se someten a técnicas de reproducción asistida.

Belén Lledó Bosch

Máster en Bioestadística y Bioinformática

Área 33: Microbiología, biotecnología y biología molecular

Paloma Pizarro Tobías

David Merino Arranz

1 de junio de 2018



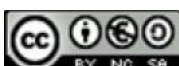
Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada [3.0 España de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/es/)

Licencias alternativas (elegir alguna de las siguientes y sustituir la de la página anterior)

A) Creative Commons:



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada [3.0 España de Creative Commons](#)



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual [3.0 España de Creative Commons](#)



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-NoComercial [3.0 España de Creative Commons](#)



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-SinObraDerivada [3.0 España de Creative Commons](#)



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento-CompartirIgual [3.0 España de Creative Commons](#)



Esta obra está sujeta a una licencia de Reconocimiento [3.0 España de Creative Commons](#)

B) GNU Free Documentation License (GNU FDL)

Copyright © 2018-Belén Lledó

Permission is granted to copy, distribute and/or modify this document under the terms of the GNU Free Documentation License, Version 1.3 or any later version published by the Free

Software Foundation; with no Invariant Sections, no Front-Cover Texts, and no Back-Cover Texts.

A copy of the license is included in the section entitled "GNU Free Documentation License".

C) Copyright

© (el autor/a)

Reservados todos los derechos. Está prohibido la reproducción total o parcial de esta obra por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la impresión, la reprografía, el microfilme, el tratamiento informático o cualquier otro sistema, así como la distribución de ejemplares mediante alquiler y préstamo, sin la autorización escrita del autor o de los límites que autorice la Ley de Propiedad Intelectual.

FICHA DEL TRABAJO FINAL

Título del trabajo:	<i>Efecto del microbioma vaginal en la tasa de embarazo en pacientes que se someten a técnicas de reproducción asistida.</i>
Nombre del autor:	<i>Belén Lledó Bosch</i>
Nombre del consultor/a:	<i>Paloma Pizarro Tobías</i>
Nombre del PRA:	<i>David Merino Arranz</i>
Fecha de entrega (mm/aaaa):	06/2018
Titulación:	<i>Máster en Bioinformática y Bioestadística</i>
Área del Trabajo Final:	<i>Área 33: Microbiología, biotecnología y biología molecular</i>
Idioma del trabajo:	Castellano
Palabras clave	<i>Microbioma; TRA (técnicas de reproducción asistida); FIV (fecundación in vitro).</i>

Resumen del Trabajo (máximo 250 palabras): *Con la finalidad, contexto de aplicación, metodología, resultados i conclusiones del trabajo.*

El microbioma vaginal posee un papel muy importante en el mantenimiento de la salud integral de la mujer, estando comprendido básicamente por bacterias del género *Lactobacillus*. En la actualidad cada vez más son las parejas que recurren a técnicas de reproducción asistida (TRA), siendo un abordaje multidisciplinar (ginecológico, endocrino, genético, inmunológico, infeccioso...etc) el que debe de ofrecerse para el diagnóstico. La evidencia actual parece apuntar a que existe una relación entre el microbioma vaginal y la fertilidad, sin embargo, se desconoce si este efecto se produce cuando las parejas se someten a TRA. El objetivo de este trabajo ha sido establecer si hay una relación entre el microbioma vaginal el día de la transferencia y el logro de un embarazo. Para alcanzar dicho objetivo se han analizado muestras vaginales de 31 pacientes que se han sometido a una transferencia de embriones criopreservados cromosómicamente normales. Se ha empleado el análisis de la región V3V4 del rRNA16S y las herramientas bioinformáticas QIIME2, MicrobiomeAnalyst y Phyloseq para determinar el microbioma. Del análisis de los resultados se ha podido concluir que las pacientes que logran embarazo poseen una menor diversidad que las pacientes que no lo logran. Además, la presencia de *Lactobacillus* parece ser clave para la consecución del embarazo. Por el contrario, la presencia de bacterias del género *Gadnerella* parece influir negativamente en alcanzar el embarazo. Adicionalmente, el microbioma vaginal no parece influir en si la paciente sufre fallo de implantación o ha sido o no tratada con probióticos.

Abstract (in English, 250 words or less):

The vaginal microbiome plays a very important role in the maintenance of the integral health of the woman, being comprised basically of bacteria of the genus *Lactobacillus*. Currently more and more couples are using assisted reproduction techniques (ART), which should be offered a multidisciplinary approach (gynecological, endocrine, genetic, immunological, infectious ... etc) for diagnosis. Recent evidence seems to indicate that there is a relationship between the vaginal microbiome and fertility, however, it is unknown whether this effect occurs when couples undergo ART. The aim of this work was to evaluate the impact of the vaginal microbiome day of embryo transfer on the pregnancy rate of patients undergoing in vitro fertilization treatment. To achieve this objective, vaginal samples from 31 patients who have undergone a transfer of chromosomally normal cryopreserved embryos have been analyzed. The analysis of the rRNA16S V3V4 region and the bioinformatic tools QIIME2, MicrobiomeAnalyst and Phyloseq have been used to determine the microbiome. From our results we conclude that the patients who achieve pregnancy have a lower diversity than the patients who do not achieve it. In addition, the presence of *Lactobacillus* seems to be key to embryo implantation. On the other hand, the presence of bacteria of the genus *Gardnerella* seems to have a negative influence on pregnancy. Moreover, the vaginal microbiome does not influence whether the patient suffers implantation failure or has not been treated with probiotics.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1 Contexto y justificación del Trabajo.....	1
1.2 Objetivos del Trabajo.....	2
1.3 Enfoque y método seguido.....	3
1.4 Planificación del Trabajo.....	4
1.5 Breve resumen de productos obtenidos.....	7
1.6 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria.....	9
2. Resto de capítulos.....	10
3. Conclusiones.....	52
4. Glosario.....	53
5. Bibliografía.....	54
6. Anexos.....	57

Lista de figuras

- Figura 1.** Calendario de las diferentes tareas a seguir para completar el TFM.
- Figura 2.** Workflow de trabajo empleado con QIIME2.
- Figura 3.** Hitos de la metagenómica. Desde los estudios de Leeuwenhoek hasta la secuenciación masiva. Tomado de Front. Cell. Infect. Microbiol. 2:104.
- Figura 4.** Esquema del rRNA 16S mostrando las regiones hipervariables V1V9 y localización de los oligonucleótidos empleados para su amplificación.
- Figura 5.** Esquema del proceso seguido para la creación de librerías mediante amplificación del gen del rARN 16S.
- Figura 6.** Diagrama de flujo de workflow QIIME. Tomado de Metaproteomics (2013): 371.
- Figura 7.** Calidad de las secuencias obtenidas en lecturas *forward* y *reverse*. QIIME2
- Figura 8.** Curvas de rarefacción para el índice Shannon por: (A) muestra, (B) embarazo, (C) grupo, (D) tratamiento. QIIME2
- Figura 9.** Curvas de rarefacción para la distancia filogenética Faith por: (A) muestra, (B) embarazo, (C) grupo, (D) tratamiento. QIIME2
- Figura 10.** Curvas de rarefacción para el numero de OTUS observadas por: (A) muestra, (B) embarazo, (C) grupo, (D) tratamiento. QIIME2
- Figura 11.** Diagrama de cajas para el índice de diversidad alpha faith_pd para el factor grupo. QIIME2
- Figura 12.** Diagrama de cajas para el índice de diversidad alpha faith_pd para el factor tratamiento. QIIME2.
- Figura 13.** Diagrama de cajas para el índice de diversidad alpha faith_pd para el factor embarazo. QIIME2
- Figura 14.** Análisis comparativo para el índice de diversidad Chao1 para el factor embarazo. MicrobiomeAnalyst MDP.
- Figura 15.** Análisis comparativo para el índice de diversidad beta para el factor embarazo. QIIME2
- Figura 16.** PCoA, construido a partir de la matriz de distancias Unifrac, que representa las muestras del estudio con diferentes colores en función del embarazo (rojo) o no embarazo (azul).QIIME2.
- Figura 17.** Gráfico pie-chart que muestra la diversidad taxonómica a nivel de género en las muestras incluidas en el estudio. MicrobiomeAnalyst MDP.
- Figura 18.** Heatmap de abundancia relativa a nivel de género en las muestras incluidas en el estudio. MicrobiomeAnalyst MDP.
- Figura 19.** Diagrama de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes por muestra agrupadas por el resultado del test de embarazo (prueba beta-HCG: positiva o negativa). QIIME2.

Figura 20. Diagrama de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes agrupadas por el resultado del test de embarazo (prueba beta-HCG: positiva o negativa). MicrobiomeAnalyst MDP.

Figura 21. Diagrama de superficie de la abundancia relativa de los géneros más abundantes en función resultado del test de embarazo (prueba beta-HCG: positiva o negativa). MicrobiomeAnalyst MDP.

Figura 22. Diagrama de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes por muestra agrupadas por el grupo al que pertenecen las pacientes (control o RIF). QIIME2.

Figura 23. Diagrama de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes agrupadas por grupo al que pertenecen las pacientes (control o RIF). MicrobiomeAnalyst MDP.

Figura 24. Diagrama de superficie de la abundancia relativa de los géneros más abundantes en función del grupo al que pertenecen las pacientes (control o RIF). MicrobiomeAnalyst MDP.

Figura 25. Diagrama de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes por muestra agrupadas por tratamiento con pro bióticos. QIIME2.

Figura 26. Diagrama de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes agrupadas por tratamiento con pro bióticos. MicrobiomeAnalyst MDP.

Figura 27. Diagrama de superficie de la abundancia relativa de los géneros más abundantes agrupadas por tratamiento con pro bióticos. MicrobiomeAnalyst MDP.

Figura 28. Cluster análisis mediante heatmap a nivel de género. MicrobiomeAnalyst MDP.

Figura 29. Análisis *Ordination* para las muestras incluidas en el estudio a nivel de filo. R-Phyloseq.

Figura 30. Análisis *Ordination* para las muestras incluidas en el estudio a nivel de género. R-Phyloseq.

Figura 31. Análisis de correlación con *Lactobacillus*.

1. Introducción

1.1 Contexto y justificación del Trabajo

El presente trabajo fin de master consiste en la identificación de los patrones de microbioma vaginal en pacientes con problemas de fertilidad y su asociación con el logro del embarazo. En caso de asociar patrones de microbioma vaginal alterados en las mujeres que no logran embarazo permitirá plantear nuevos fármacos para la modificación de este microbioma hacia otros patrones asociados con un éxito en la gestación.

El acceso tardío de la mujer a su primera maternidad y el estilo de vida actual, están provocando un aumento del número de parejas que no pueden concebir un hijo de forma natural. Siendo cada vez mayor el número de pacientes que acuden a una clínica de reproducción. Se requiere un mayor conocimiento de los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que ocurren durante el proceso de fecundación, implantación uterina y gestación para ayudar al diagnóstico y tratamiento de dichas parejas. Se especula que el microbioma vaginal pueda influir en la fertilidad de la mujer.

Por todo lo anteriormente expuesto, se ha elegido como área del presente TFM la microbiología, biotecnología y biología molecular que permitirá conocer y emplear las herramientas bioinformáticas necesarias para el análisis de los datos, y más concretamente dentro del tema del TFM, el estudio del microbioma vaginal, poder profundizar en las herramientas disponibles para estudios de metagenómica.

En caso de asociar patrones de microbioma vaginal alterados en las mujeres que no logran embarazo permitirá plantear nuevos fármacos para la modificación de este microbioma hacia otros patrones asociados con un éxito en la gestación y con un recién nacido a término en casa sano. Los fármacos a plantear serán a nivel local vaginal, preferiblemente en forma de óvulo vaginal, por lo que no supondrá molestias adicionales a la paciente. Así mismo, la determinación del

microbioma vaginal tampoco supone una molestia adicional, ya que se realiza bajo revisión ginecológica habitual durante una exploración incluida en el propio protocolo de tratamiento.

Sin duda que poder identificar ciertos patrones de microbioma vaginal con mejores resultados en las tasas de embarazo sería extremadamente relevante y beneficioso para los pacientes que se someten a técnicas de reproducción asistida con el objetivo de mejorar los resultados de los tratamientos. Los verdaderos beneficiarios del éxito de este trabajo serán, por tanto, las parejas con problemas de fertilidad que no pueden tener descendencia de forma natural. En estos casos, al elevado coste de los tratamientos se le suma el estrés producido por no conocer las causas últimas de su infertilidad, lo que puede producir múltiples fracasos en la aplicación de las distintas técnicas de reproducción asistida (TRA). Es por ello que una sencilla prueba de determinación del microbioma vaginal, unido al resto de pruebas diagnósticas previas, puede aumentar las probabilidades de éxito y acortar plazos. Además, si la causa última de la infertilidad de una pareja fuera la alteración en el microbioma vaginal, los tratamientos farmacológicos adecuados podrían hacer que parejas con escasas posibilidades de concebir un hijo con sus propios medios pudieran superar esta barrera, optando por TRA menos agresivas o incluso recurriendo a la propia gestación espontánea para conseguir su objetivo de tener un niño sano.

Por último, estos resultados permitirán a la comunidad científica aumentar los conocimientos sobre el microbioma vaginal y su influencia en la implantación embrionaria.

1.2 Objetivos del Trabajo

El objetivo general del presente trabajo es:

-) Estudiar la influencia del microbioma vaginal en la tasa de embarazo de los tratamientos de Fecundación In vitro (FIV).

Para poder alcanzar con éxito el objetivo principal del TFM será preciso superar los siguientes objetivos secundarios del proyecto:

-) Determinar las poblaciones de microorganismos más habituales en las mujeres con problemas reproductivos.
-) Comparar los perfiles obtenidos entre el grupo de pacientes que no ha logrado embarazo y aquellas que han obtenido un test de embarazo positivo tras la TRA mediante análisis estadísticos.
-) Proponer un patrón de microorganismos óptimo para lograr el embarazo.

1.3 Enfoque y método seguido

Ha sido difícil identificar la diversidad de microorganismos en diferentes ambientes empleando técnicas de microbiología convencional como el empleo del cultivo de especies aisladas. Al igual que en el resto de hábitats, 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 los datos han supuesto un gran avance en el conocimiento de la diversidad microbiológica. Estos estudios se engloban dentro de un área denominada metagenómica. La metagenómica permite estudiar directamente el conjunto de genomas de una muestra identificando los microorganismos presentes en ella.

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 primera metodología permite obtener gran cantidad de información que se puede extraer de los resultados generados, permitiendo no sólo la identificación taxonómica y la caracterización de la diversidad microbiana, sino que 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. Por otro lado, el empleo de genes marcadores como el rRNA 16S supone importantes ventajas ya que el tamaño de la región es limitado por lo tanto 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.

Considerando los objetivos del presente trabajo vamos a emplear como método a seguir el empleo de la metagenómica estudiando el rRNA16S de las muestras incluidas en el estudio. Ya que la identificación basada en el rRNA16S supone una alternativa rápida y reproducible, al proporcionar datos concluyentes incluso para microorganismos pocos comunes.

1.4 Planificación del Trabajo

Las Tareas que se llevarán a cabo para alcanzar los objetivos del presente TFM serán:

-) Reclutamiento de pacientes y toma de muestras. Se trabajará con dos grupos de pacientes que realizarán ciclos de fecundación in vitro (FIV): grupo de pacientes con test de embarazo positivo y grupo de pacientes que no logran embarazo.
-) Extracción del ADN de las muestras incluidas en el estudio. A partir de las muestras de exudado vaginal tomadas mediante una torunda seca se obtendrá el ADN empleando el kit de extracción PureLink microbiome kit ® (Thermo Fisher).

- J) Amplificación de la región del rRNA16S. El rRNA16S posee nueve regiones hipervariables (V1-V9) flanqueadas por regiones conservadas. Existe cierta controversia en determinar que regiones son más representativas del microbioma vaginal. Para el presente trabajo se va a analizar la región hipervariable V3V4.
- J) Obtención de las librerías de NGS. Una vez realizada la amplificación de la región V3V4 del rRNA16S de las muestras incluidas en el estudio obtendremos las librerías de amplicones, con los índices correspondientes que permitirán identificar de forma inequívoca cada muestra, para poder secuenciarlas utilizaremos el kit NexteraXT (Illumina).
- J) Secuenciación del rRNA 16S. Para la secuenciación emplearemos la tecnología Illumina Miseq Reagent kit v3 y el equipo Miseq.
- J) Análisis bioinformático de los datos de secuencias obtenidos. A partir de las secuencias obtenidas se llevará a cabo un análisis primario y secundario de las secuencias para identificar los microorganismos presentes en la muestra. Parte del análisis puede ser realizado por el equipo Miseq con su workflow de trabajo Metagenomics. El análisis se completará empleando herramientas como QIIME2, microbiomeAnalyst o diferentes paquetes de R.
- J) Análisis estadístico de los resultados obtenidos. A partir de los resultados anteriores se realizará una comparativa de ambos grupos de pacientes para poder identificar patrones de microorganismos asociados al embarazo.
- J) Obtención de conclusiones y elaboración de memoria. Finalmente, se procederá a la obtención de las conclusiones y escritura de la memoria.

El calendario que se siguió para conseguir completar las tareas fue el que se adjunta a continuación.

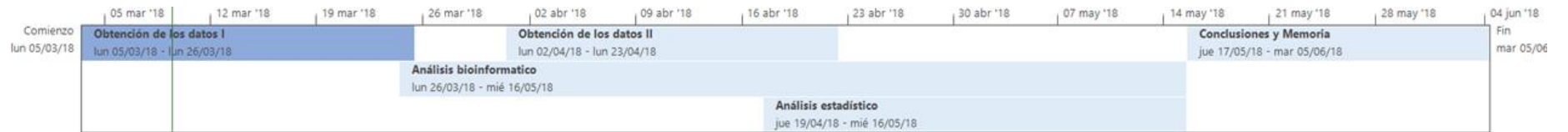


Figura 1. Calendario de las diferentes tareas a seguir para completar el TFM.

Con respecto a su desarrollo temporal, el proyecto se plantea a dos Hitos claramente diferenciados en los que se incluyen las tareas mencionadas:

-) HITO 1: Obtención de los perfiles del microbioma vaginal de las muestras incluidas en el estudio.
-) HITO 2: Análisis bioinformático y estadístico de los resultados obtenidos.

1.5 Breve resumen de productos obtenidos

-) Plan de Trabajo. El plan de trabajo es un documento que plasma los motivos o justificación del proyecto, los objetivos del mismo, el método a seguir, la planificación de las tareas, la programación temporal de las mismas, destacando los hitos importantes y finalmente una evaluación de riesgos.
-) Memoria. La memoria es el documento final que reúne todo el trabajo realizado. Debe contener una introducción que puede incluir tanto el plan de trabajo como los objetivos, además la memoria incluirá los resultados y discusión de los mismos.
-) Producto. El principal producto que hemos obtenido del presente trabajo ha sido un *workflow* de trabajo optimizado para el análisis de muestras de microbioma vaginal empleando nuestra tecnología y nuestro protocolo. Como resumen se describe el siguiente flujo de trabajo (figura 2):
 1. Análisis con QUIIME2. A continuación describimos de forma gráfica el flujo de trabajo empleado con la aplicación QUIIME2. Se describirá con detalle en el apartado materiales y métodos.

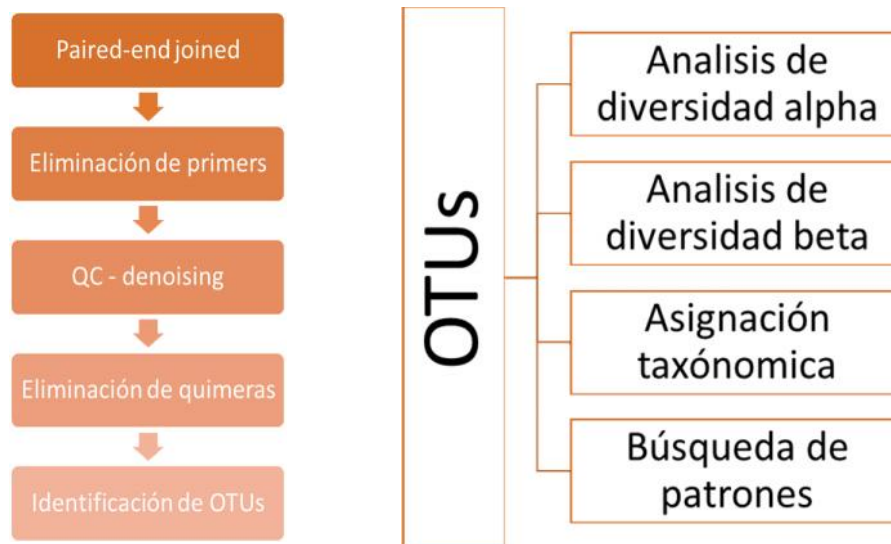


Figura 2. Workflow de trabajo empleado con QIIME2.

2. Análisis con phyloseq. A partir de la tabla OTU, la taxonomía y el árbol filogenético obtenidos de QIIME2 se podrá realizar el análisis empleando el paquete phyloseq de R. Se utilizará para generar el heatmap
3. Análisis con MicrobiomeAnalyst MDP. A partir de la tabla OTU, la taxonomía y el árbol filogenético obtenidos de QIIME2 se podrá realizar el análisis empleando la herramienta on-line MDP de MicrobiomeAnalyst. Se utilizarán las herramientas de análisis de diversidad, abundancia relativa...etc.

Por otro lado, a partir de los resultados obtenidos, su análisis y discusión se pretende realizar una publicación científica en una revista internacional indexada del área del TFM. Además, si los resultados son satisfactorios se podría proponer como producto final de aplicación clínica una prueba diagnóstica/pronostica del embarazo.

) Presentación virtual.

La presentación virtual será una presentación mediante power point, que sintetice el trabajo y presente los resultados y conclusiones.

) Autoevaluación del proyecto.

La autoevaluación consistirá en una evaluación del resultado final del proyecto en el que se pondrán de manifiesto sus limitaciones y opciones de mejora.

1.6 Breve descripción de los otros capítulos de la memoria

La memoria elaborada a partir de este Trabajo comprenderá unos capítulos adicionales necesarios para plasmar desde un punto de vista científico los resultados y conclusiones obtenidos en el Trabajo. Además, se realizará una introducción para plantear el estado actual de la temática del TFM y se explicaran con detalles los materiales y métodos empleados para alcanzar los objetivos del TFM.

A continuación, explicamos el contenido de cada capítulo y su relación con el TFM.

) Introducción. Breve revisión bibliográfica del estado actual de la temática del TFM: microbioma y fertilidad.

) Materiales y métodos: Establece cual son los medios empleados para alcanzar los diferentes objetivos del TFM, así como la metodología que seguiremos para alcanzarla.

) Resultados y discusión: Tras completar todas las tareas descritas en el plan de Trabajo se obtendrán unos resultados que serán analizados para posteriormente poder valorar en el conjunto de la evidencia científica actual sobre esta temática.

) Conclusiones: Tras todo el análisis anterior se obtendrán las principales conclusiones del Trabajo y se podrá establecer si los objetivos iniciales planteados han sido alcanzados.

2. Resto de capítulos

2.1 Introducción

El microbioma humano

El cuerpo humano está constituido por células especializadas que componen los diferentes órganos y sistemas que se hayan acompañadas 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. Estos microorganismos se denominan microbioma [1].

Existen dos tipos de microbioma: autóctona y alóctona. La autóctona hace referencia a aquellos microorganismos que están presentes en el organismo humano durante un tiempo prolongado. Suelen participar en funciones fisiológicas, y por tanto, han evolucionado conjuntamente con el ser humano. La alóctona está presente en el ser humano durante un tiempo menos duradero y generalmente no forman parte de funciones fisiológicas [2].

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 [3].

Si bien es conocida la presencia de microbioma en nuestro organismo, no ha resultado nunca fácil identificar el tipo o número de cada una de las especies que lo compone. Hasta ahora, la microbiología tradicional se basaba en el estudio de los microorganismos como especies aisladas. Sin embargo, la mayoría de los microorganismos de nuestro

cuerpo no han podido ser aislados [3]. Hoy en día, gracias a la mejora de las técnicas de secuenciación de ADN se ha descubierto que el número y variedad del microbioma es mucho mayor del esperado. La metagenómica revela que la mayoría de la diversidad microbiológica 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 [4].

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 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 [5].

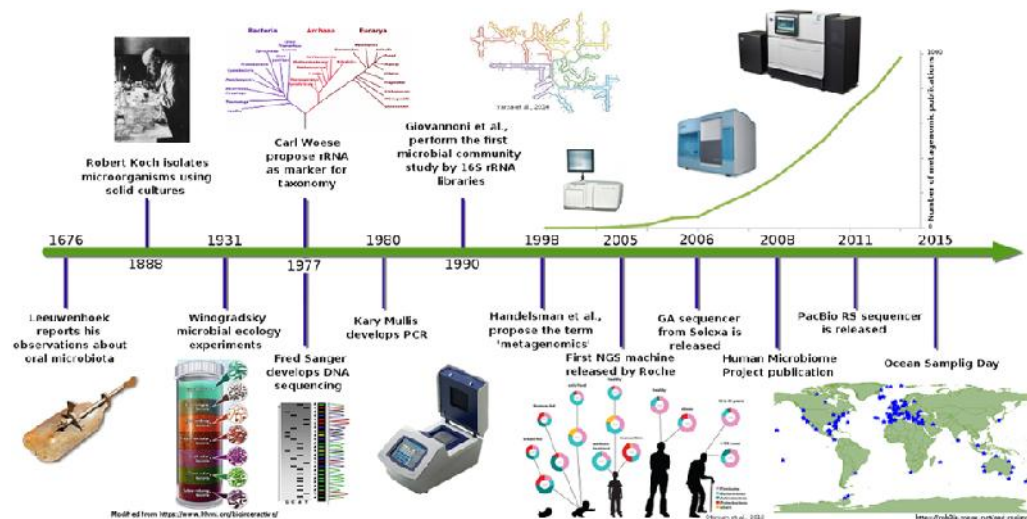


Figure 3. Hitos de la metagenómica. Desde los estudios de Leeuwenhoek hasta la secuenciación masiva. Tomado de *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2:104.

El microbioma vaginal

El microbioma vaginal comprende el conjunto de microorganismos presentes en la vagina. El microbioma vaginal posee un papel muy importante en el mantenimiento de la salud integral de la mujer. 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 [6]. Cuando la flora vaginal se altera por el uso de antibióticos, hormonas, contraceptivos, duchas vaginales, medicamentos, enfermedades de transmisión sexual, cambios de pareja, etc, se produce un cambio en el pH por disminución de los lactobacilos y consecuentemente una proliferación de patógenos oportunistas. Este desequilibrio da lugar a veces a infecciones como la vaginosis bacteriana -el tipo más frecuente de infección vaginal o la Candidiasis, que es la segunda causa de vaginitis en mujeres en edad fértil y adolescentes.

Se ha observado que el microbioma vaginal presente en la mujer gestante difiere del existente en la mujer en otras etapas de su vida (tanto en época fértil como postmenopausia). Posiblemente debido tanto a factores hormonales más estables, como a su función protectora frente a posibles agentes patógenos [7]. A pesar de que la relación entre el patrón de microbioma vaginal y la evolución del embarazo está bastante estudiada, los estudios sobre microbiota vaginal en otros aspectos de la fertilidad femenina son escasos y recientes.

El microbioma vaginal y la fertilidad

Se considera que existe un problema de fertilidad cuando tras un año de relaciones sexuales sin anticoncepción no se ha logrado el embarazo. Este periodo de espera se acorta a 6 meses cuando la mujer tiene más de 35 años y no se debe demorar la orientación terapéutica en mujeres mayores de 40 años. El acceso tardío de la mujer a su primera maternidad y el estilo de vida actual, están provocando un aumento del número de parejas que no pueden concebir un hijo de forma natural. Se

estima que la infertilidad afecta del 10% al 15% de las parejas [8]. Cuando una pareja acude a una clínica de reproducción asistida con problemas de fertilidad, es de capital importancia averiguar sus causas para poder sugerir el tratamiento más adecuado. Sin embargo, todavía existe un gran desconocimiento en los ámbitos científicos de muchos de los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que ocurren durante el proceso de fecundación, implantación uterina y gestación, lo que provoca que muchas parejas no sean diagnosticadas correctamente, no pudiéndose ofrecer soluciones certeras que permitan superar esta limitación.

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 H₂O₂ 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 [9, 10].

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 [11]. Un reciente meta-análisis que revisa los resultados de los tratamientos de fecundación in vitro en pacientes diagnosticados con vaginosis bacteriana concluye que existe una asociación entre infertilidad tubárica y la vaginosis así como una mayor tasa de aborto clínico [12]

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 [7]. El grupo de gestantes presentan mayoritariamente un microbioma compuesto principalmente por bacterias del grupo de *Lactobacillus spp*, con una mayor abundancia de *L. vaginalis*, *L. crispatus*, *L. gasseri* y *L. jensenii*. La prevalencia de un microbioma compuesto mayoritariamente por especies de *Atopobium*, así como *Prevotella*, *Sneathia*, *Gardnerella*, etc relacionadas con mayor incidencia de vaginosis, es minoritaria en las mujeres gestantes con parto a término. Estos resultados podrían establecer las bases de la existencia de un microbioma en la mujer gestante relacionada con buenos resultados obstétricos. El factor inmunológico mediado por una respuesta inflamatoria podría explicar el efecto perjudicial de ciertos patrones del microbioma en la infertilidad. Para ello se llevó a cabo un estudio en el que se comparó el microbioma de pacientes infértiles con presencia o ausencia de anticuerpos IgG frente a diferentes microorganismos como por ejemplo *C. trachomatis*. Se observa que aquellos pacientes diagnosticados con infertilidad infecciosa tras poseer una serología positiva frente a diferentes microorganismos responsables de vaginosis bacteriana poseen un patrón de microbioma diferente comparado con el grupo de pacientes sin infertilidad infecciosa [13]. Se concluye que existe un patrón de microbioma propio no solo del problema reproductivo si no asociada a la posible etiología.

Otro aspecto relevante entre la asociación entre la infertilidad y el microbioma consistía 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* [14]. 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 [15].

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. El único estudio que evidencia que el microbioma afecta a la implantación embrionaria tras un ciclo de FIV ha sido publicado 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 [16].

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 proponer tratamientos farmacológicos adecuados que permitan eliminar esta barrera infecciosa.

2.2 Objetivos

El objetivo principal del presente trabajo, consiste en el estudio de la influencia del microbioma vaginal en los resultados de los tratamientos de Fecundación In vitro (FIV). Para poder alcanzar con éxito este objetivo principal será preciso superar los siguientes objetivos secundarios del proyecto:

-) Determinar las poblaciones de microorganismos más habituales en las mujeres con problemas reproductivos. Se tratará de

localizar patrones de alteración de la microbiota vaginal que puedan afectar a la implantación del embrión.

-) Realizar análisis estadísticos que permitan relacionar la presencia de determinadas especies con el fallo en la FIV.

Si se consigue determinar las alteraciones del microbioma que pueden afectar a la consecución del embarazo, se podrá ensayar terapias farmacológicas que permitan su regulación. Y si estas alteraciones influyen negativamente en la implantación y desarrollo del embrión, con su eliminación se podrán mejorar los resultados de las TRA aplicadas habitualmente, reduciendo el número de ciclos necesarios para conseguir un embarazo exitoso y proporcionando una mejor respuesta a las parejas que acuden a las clínicas de reproducción con problemas de fertilidad.

2.3 Materiales y métodos

2.3.1 Diseño y población de estudio

El estudio realizado se trata de un estudio prospectivo descriptivo de no intervención de casos y controles.

La población de estudio está formada por pacientes que acudieron a nuestra clínica con un diagnóstico de infertilidad y que se sometieron a técnicas de reproducción asistida, concretamente fecundación in vitro con gametos propios y/o donados, vitrificación de embriones y criotransferencia en ciclo posterior.

En total se incluyeron 31 pacientes. Las pacientes se agruparon en dos grupos:

-) Pacientes que lograron un embarazo valorado mediante un test en orina de HCG (Gonadotropina coriónica humana) positivo (n=17).
-) Pacientes que no consiguieron el embarazo tras el tratamiento de reproducción asistida (n=14).

Con el objetivo de homogeneizar la población de estudio y para evitar sesgos en la selección de pacientes se establecieron una serie de criterios de inclusión y exclusión.

Los criterios de inclusión de las pacientes se detallan a continuación:

-) Mujeres con edad comprendida entre 18 y 50 años. Edad para poder realizar tratamientos de reproducción asistida según la ley 14/2006 de reproducción humana.
-) Tratamiento de reproducción asistida mediante fecundación in vitro con diagnóstico genético preimplantatorio. Se incluyeron pacientes cuyo tratamiento terapéutico de su infertilidad fue la realización de un tratamiento de reproducción asistida empleando gametos propios o donados con fecundación in vitro e inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Además, los embriones generados fueron sometidos a técnicas de diagnóstico genético preimplantacional en fase de blastocisto para identificar y seleccionar embriones euploides. Los embriones aneuploides fueron descartados y no fueron aptos para la transferencia. Los embriones euploides fueron vitrificados para ser transferidos en ciclo posterior.
-) Transferencia de un único embrión euploide en fase de blastocisto en ciclo posterior. En un ciclo posterior al de la estimulación ovárica de la paciente o de la donante, en caso de ser receptora de ovocitos, se llevó a cabo la transferencia del embrión euploide seleccionado. Para ello, se procedió a la desvitrificación del embrión y posterior transferencia al útero materno. Dado que los embriones se encuentran en fase de blastocisto la transferencia se realizó tras 5 días de suplementación con progesterona para poder ajustar la ventana de implantación.
-) Menos de 3 meses previos sin tratamiento antibiótico. Con el objetivo de evitar que la terapia con antibióticos pudiera alterar el microbioma vaginal solo se incluyeron pacientes que en un periodo superior a 3 meses no hubieran tomado antibióticos.

-) Aceptación y firma del consentimiento informado. Las pacientes fueron informadas del proyecto, objetivos y posibles conclusiones, así mismo firmaron el consentimiento informado correspondiente.

Las pacientes que cumplieran algunos de los siguientes criterios no fueron incluidas en el estudio. Criterios de exclusión:

-) Malformaciones uterinas. Las malformaciones uterinas pueden causar problemas de implantación embrionarias impidiendo que el embrión anide en el útero materno. Con el objetivo de evitar la influencia de este factor sobre el embarazo fueron excluidas pacientes con esta patología.
-) Hidrosalpinx no tratado. El hidrosalpinx es una acumulación de líquido de origen desconocido a nivel de la trompa de Falopio. La presencia de hidrosalpinx influye negativamente en la implantación embrionaria y por tanto en la consecución del embarazo. Al igual que en el caso anterior las pacientes con hidrosalpinx no tratado fueron excluidas del estudio.
-) Factores conocidos de fallo de implantación. El fallo de implantación se define como la consecución de embarazo tras la transferencia de al menos 3 embriones de buena calidad en un mínimo dos ciclos. Existen factores asociados a este problema reproductivo, como, por ejemplo: fragmentación del ADN espermático, alteraciones cromosómicas, trombofilias e inmunológicas. Dado que las pacientes que sufren esta patología poseen peores tasas de embarazo, fueron excluidas del estudio.

2.3.2 Toma de muestras

Las muestras vaginales para realizar el estudio del microbioma se tomaron obteniendo el flujo vaginal con torunda seca en fondo de saco posterior mediante visualización directa. La visualización directa supone tener a la paciente en posición de litotomía, exactamente igual que

durante una revisión ginecológica habitual mediante visualización con espéculo vaginal. Se tomaron 2 muestras vaginales.

La toma se realizó 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 realizó la transferencia siguiendo los protocolos establecidos para ello.

Todas las muestras se conservaron a -80°C hasta continuar con su análisis posterior.

2.3.3 Extracción del ADN

La extracción del ADN se realizó empleando el kit comercial PureLink microbiome DNA purification kit® (ThermoFisher). Se siguieron las recomendaciones establecidas por el fabricante con alguna modificación. Este kit incluye un paso previo de lisis celular por fricción mecánica con unas perlas (*beads*) que permiten la ruptura de la pared celular de ciertas bacterias resistentes a la lisis. Tras la lisis celular se llevó a cabo la unión del ADN a la columna de purificación y tras varios lavados se eluyó el ADN. El ADN se cuantificó mediante fluorimetría empleando Qubit 2.0® (ThermoFisher). El ADN extraído fue conservado a -20°C para su uso posterior.

2.3.4 Amplificación de la región V3V4 del rRNA 16S.

El rRNA 16S contiene nueve regiones (V1-V9) menos conservadas o hipervariables, que son las que aportan la mayor información útil para estudios de filogenética y taxonomía (figura 4). Las regiones conservadas son de gran ayuda para diseñar iniciadores universales que permitan la amplificación de las diversas regiones hipervariables de la gran mayoría de los rRNA 16S de los microorganismos presentes en una comunidad.

No existe consenso sobre cuál es la región más representativa del microorganismo, existiendo una gran heterogeneidad en los trabajos publicados. En cuanto a las regiones hipervariables del rRNA 16S empleadas para el análisis del microbioma vaginal incluyen V1V2, V3V4, V4 y V4V5 principalmente.

Al inicio del desarrollo del trabajo se planteó emplear la región V3V5, de hecho, la primera fase se logró empleando dicha región. Sin embargo, debido a que empleamos la tecnología Miseq, la larga longitud de la región y al poco solapamiento entre la secuencia forward y reverse dificultaba el análisis ya que muchas secuencias no tenían suficiente calidad y se perdían. Por todo, en la segunda fase del proyecto se escogió como región de estudio del rRNA 16S la región hipervariable V3V4. Dicha región se empleó para completar el TFM



Figura 4. Esquema del rRNA 16S mostrando las regiones hipervariables V1V9 y localización de los oligonucleótidos empleados para su amplificación.

Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de la región V3V4 se detallan a continuación.

357F TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

806R GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

La amplificación por PCR de la región variable V3V4 del gen 16S rRNA se realizó con 1.5 unidades de Taq DNA polimerasa (KAPA HiFi HotStart®, Roche) en presencia de dNTPs, los oligonucleótidos 357F y 806R a una concentración final de 1µM y una media de 100 ng de DNA, a un volumen final de reacción de 25 µlitros.

La PCR se llevó a cabo en el termociclador (Verity, Applied Biosystems) con el siguiente programa de temperatura y tiempo: desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, seguido de 25 ciclos a 95°C durante 30

segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 30 segundos con un paso final de extensión a 72°C durante 5 minutos.

Para la validación de la técnica de PCR, todas las reacciones de amplificación incluyeron controles positivos y negativos sin DNA molde.

Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis de agarosa, comprobando que la banda del ADN amplificado corresponde con el tamaño correcto (449 pb). Todos los productos de amplificados se almacenaron a -20°C para su posterior secuenciación.

2.3.5 Secuenciación de la región V3V4 del rRNA 16S.

Una vez obtenido el amplicón que queremos secuenciar debemos generar la librería con los índices identificativos de cada muestra, así como las secuencias empleadas para poder llevar cabo su secuenciación. Utilizaremos el kit de secuenciación Nextera XT® (Illumina).

Dado que los oligonucleótidos empleados para la amplificación de la región V3V4 contienen una región adaptadora, para introducir los índices debemos realizar una nueva PCR mediante la cual empleando dichos adaptadores podemos incluir los índices a cada muestra. Previamente a la introducción de los índices realizaremos un paso de limpieza (*clean-up*) del amplicón empleando bolitas magnéticas con el objetivo de eliminar reactivos de esta PCR así como oligonucleótidos.

La reacción de PCR que introdujo los índices se realizó con 1.5 unidades de Taq DNA polimerasa (KAPA HiFi HotStart®, Roche) en presencia de dNTPs, los índices Nextera XT® (Illumina) que son denominamos N7XX para la posición forward y S5XX para la reversa y una media de 100 ng de DNA amplificado, a un volumen final de reacción de 50 µlitros.

Una vez realizada la PCR empleando los índices adecuados (Nextera XT indexes, Illumina) deberemos nuevamente eliminar los excesos de reactivos mediante un *clean-up*.

Finalmente, llevamos a cabo una cuantificación de las muestras empleando Qubit 2.0® (ThermoFisher) que debieron ser diluidas todas ellas a una concentración de 4nM antes de ser mezcladas y preparadas para secuenciar. Una vez mezcladas se diluyó el pool final a una concentración de 10pM empleando el buffer de secuenciación HT1 y se procedió a la secuenciación de la librería utilizando los reactivos MiSeq Reagent kit v3 (Illumina). El equipo de secuenciación empleado fue un MiSeq® (Illumina) y el workflow el de metagenómica.

A continuación, mostramos una figura (figura 5) resumen en la que se muestran los diferentes pasos seguidos para obtener la librería de secuenciación.

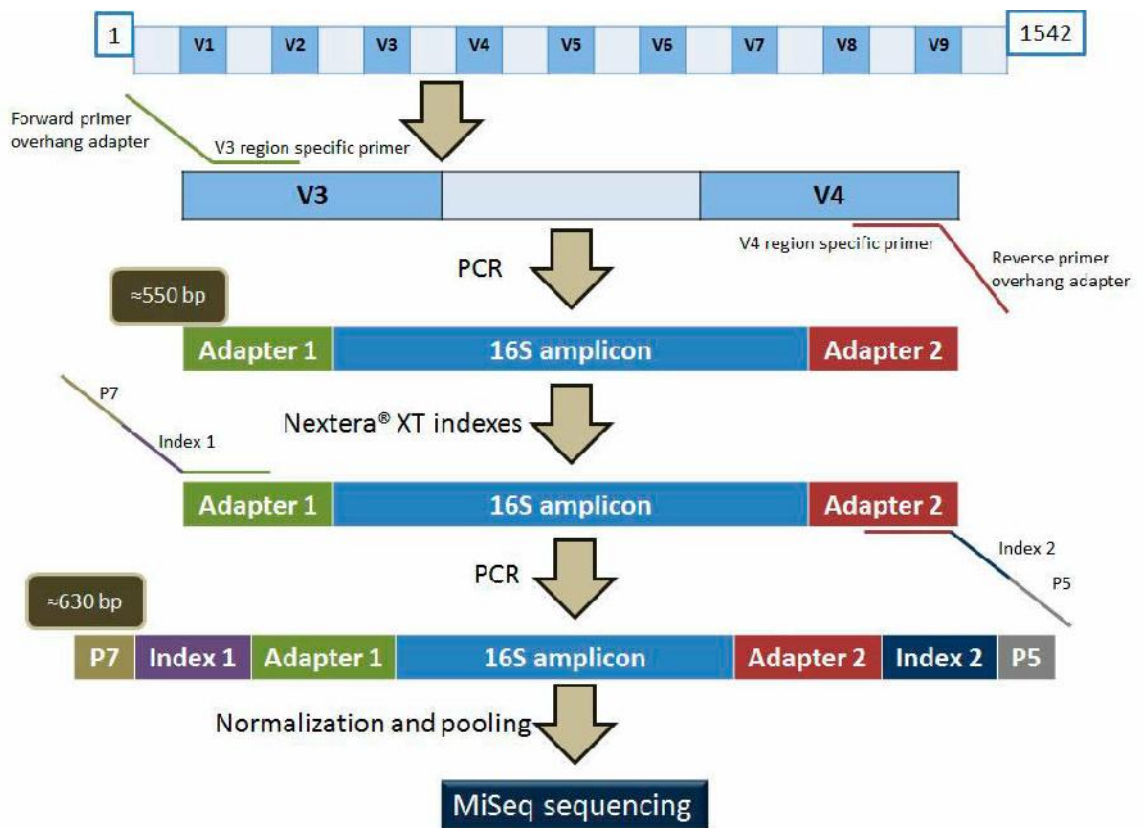


Figura 5. Esquema del proceso seguido para la creación de librerías mediante amplificación del gen del rARN 16S.

2.3.5 Análisis bioinformático de las secuencias.

Una vez finalizada la secuenciación, se realizó el análisis primario de las secuencias obtenidas, que consistió en la demultiplexación de las

mismas, empleando el software MiSeqReporter® (Illumina). Las secuencias paired-end desindexadas de cada muestra fueron exportadas del equipo Miseq para proceder con su análisis en formato *.fastq*.

El análisis bioinformático de las secuencias se llevó a cabo en la Virtual Box del sistema operativo Ubuntu de Linux empleando el paquete QIIME2 [17, 18], mediante el uso de diferentes comandos. Además, para un posterior análisis de datos trabajamos con el programa R (versión 3.4.2) y los paquetes de Bioconductor Phyloseq [19] y MicrobiomeAnalyst [20]. QIIME (*Quantitative Insights Into Microbial Ecology*) es una *pipeline* bioinformática diseñada para el análisis de comunidades microbianas empleando el gen marcador 16S o 18S. Esta aplicación permite llevar a cabo un control de calidad de las secuencias, agrupación en unidades operacionales (OTUs) y anotaciones taxonómicas respecto a una base de datos de referencia. También permite investigar sobre la diversidad alfa y beta y análisis de componentes principales. QIIME2 es una versión rediseñada de QIIME1 que soluciona algunas de las limitaciones de QIIME1 mientras mantiene su potencial universal como herramientas de análisis de microbioma. El paquete phyloseq de Bioconductor integra datos y los analiza formando grupos taxonómicos. Phyloseq permite integrar datos de abundancia, información filogenética y variables consiguiendo su transformación en gráfica y test estadísticos. MicrobiomeAnalyst, es una herramienta on-line de uso sencillo que integra los progresos recientes de los test estadísticos y técnicas de visualización permitiendo un análisis completo de los estudios de microbioma. Contiene 4 módulos, siendo el módulo MDP (Marker Data Profiling) el que permite análisis comparativo y funcional de comunidades microbianas basado en rRNA16S.

Antes de comenzar con el análisis de las secuencias en QIIME2 se generó y se validó un archivo denominado *Metadatadef* que contenía información relativa a las muestras incluidas en el estudio además de la identificación de la muestra y si se consiguió gestación o no en el

tratamiento. En la siguiente tabla se indican las variables recogidas para cada muestra.

VARIABLE	DESCRIPCIÓN
EMBARAZO	Resultado de la prueba de embarazo a 2 semanas post-transfer.
GRUPO	Grupo al que pertenecen las pacientes según su indicación: Control (n=12) o pacientes con fallo de implantación (RIF) de origen desconocido (n=19).
TRATAMIENTO	Tratamiento con pro bióticos vaginales (n=7).

Tabla 1. Variables incluidas en el estudio.

El primer paso del análisis fue la importación de las secuencias empleando el protocolo de secuencias paired-end demultiplexadas. A continuación, visualizamos la calidad de las secuencias con el objetivo de eliminar aquellas de baja calidad. Emplearemos *dada2 denoised-paired* para eliminar las secuencias de baja calidad, quimeras, los primers con el *trimming* adecuado y el truncado forward de 260pb y reverse 220pb ajustado según la calidad de las secuencias obtenidas. El empleo de este protocolo de filtrado requiere un largo tiempo de ejecución por lo que con el objetivo de alcanzar el plazo de entrega de la memoria se optó por un protocolo mucho más rápido como es *deblur*. Tras su aplicación, como resultado obtuvimos la tabla de frecuencias para su posterior análisis filogenético y de diversidad. Las secuencias se agruparon en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) con un porcentaje de similitud del 97%.

Para estimar la diversidad microbiana se realizó un análisis de rarefacción a 1000 secuencias por muestra y posteriormente se llevó a cabo el análisis de alfa diversidad. Se emplearon diferentes medidas: la distancia filogenética, la medida de las OTUs observadas y el índice de Shannon.

El análisis de beta diversidad, diversidad microbiana entre muestras, fue realizada calculando la distancia Weighted Unifrac entre cada par de muestras y realizando un Análisis de Componentes Principales (PCA).

La asignación taxonómica se realizó empleando una clasificación basada en un filtrado de la secuencia de 99_otus de la base de datos Greengenes a la región V3V4. Los resultados obtenidos se filtraron a aquellas secuencias con al menos género asignado. Por último, llevamos a cabo el análisis específico para cada taxón o grupo especificado según los resultados que obtuvimos.

A continuación, mostramos una figura (figura 6) que resume los pasos seguidos en el flujo de trabajo de QIIME.

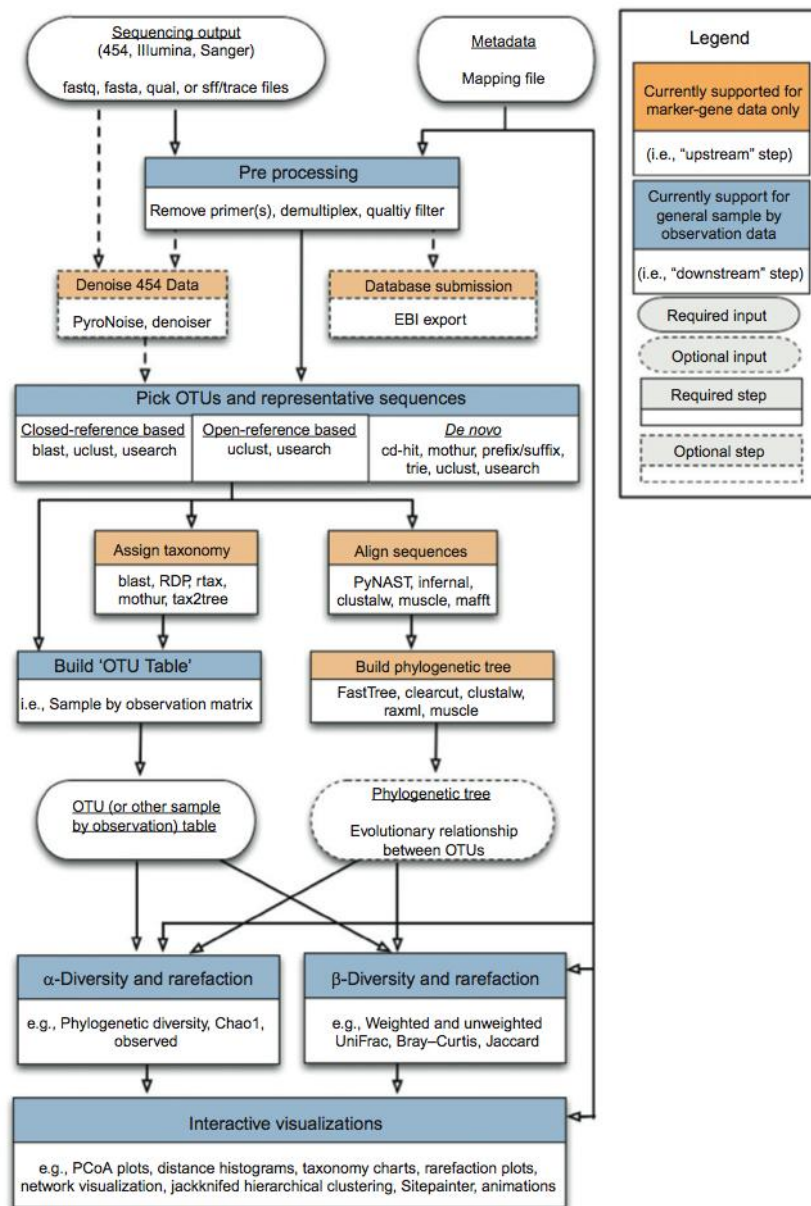


Figura 6. Diagrama de flujo de workflow QIIME. Tomado de Metaproteomics (2013): 371.

Para poder analizar los resultados empleando el paquete phyloseq tuvimos que exportar la tabla de OTUs de QIIME2 convirtiéndola en una *Biom table*. También exportamos el archivo de taxonomía generado así como el árbol. Con todos estos archivos pudimos generar el objeto phyloseq para ser analizado.

Empleamos tanto el paquete de R phyloseq como la herramienta MDP de MicrobiomeAnalyst para comparar los análisis de diversidad generados mediante QIIME2 así como obtener diferentes figuras que se pueden obtener mediante QIIME2. Se especificará mediante cual herramienta se han generado.

2.4 Resultados y Discusión

2.4.1 Análisis de los resultados de secuenciación

El presente trabajo se embarca dentro de un proyecto de mayor envergadura que comprende el inicio de una línea de investigación totalmente nueva en el laboratorio, por lo tanto, constituye el primer análisis de microbioma llevado a cabo en nuestro centro. La puesta a punto de la técnica desde cero lleva a que todos los resultados deban ser analizados con detalle para asegurar la validez de los mismos. Por este motivo, el primer paso que debemos analizar es el número y la calidad de las secuencias obtenidas.

En la Tabla 2 mostramos el número de secuencias obtenidas por cada muestra y tras filtrado.

Nombre de la muestra	Nº de secuencias obtenidas Miseq	Nº de amplicones variantes (ASV) –dada2	Nº de secuencias joined – deblur	Nº de amplicones variantes (ASV) – deblur
2	452.804	5.963	333.015	50.944
7	1.142.892	1.825	851.007	282.706
9	103.025	56	78.279	19.932
13	381.035	25.348	28.357	35.068

15	2.285	0	1.299	114
19	161.301	3.674	115.413	15.128
22	290.384	30.289	212.923	21.039
23	56.098	9.776	43.176	5.372
24	138.730	1.959	11.096	14.022
25	187.272	9.013	155.045	17.421
26	271.783	21.132	189.916	19.556
27	94.253	250	8.061	9.085
28	176.903	4.148	142.396	16.418
29	130.254	352	111.584	12.413
30	277.725	6.138	227.013	27.276
31	173.300	9.279	129.622	14.661
32	36.108	0	31.736	4.455
33	22.500	1.859	17.372	2.499
36	535.677	178.663	292.471	14.738
40	383.562	7.843	297.289	41.978
44	113.626	3.919	89.216	11.201
51	60.934	6.450	39.041	3.816
53	128.719	3.291	99.211	11.539
54	181.364	2.952	148.786	15.796
55	168.575	57.732	104.724	8.614
56	223.617	8.226	179.791	19.979
57	155.221	7.007	119.541	11.244
63	409.297	31.497	30.682	30.232
65	216.276	52.862	113.399	1.626
67	271.017	30.688	159.177	11.154
70	143.162	17.447	93.922	5.002

Tabla 2. Número de secuencias obtenidas en cada muestra.

El número total de secuencias es de 7.089.699 para el total de las 31 muestras, siendo el mínimo 2.285 en la muestra 15 y el máximo 1.142.892 en la muestra 7. La media de secuencias por muestra es de 228. 699. Muy superior al mínimo de 1.000 requerido para el análisis de microbioma.

La calidad de las secuencias obtenidas se muestra en la figura 7 observando el valor de QC en la longitud de la secuencia obtenida.

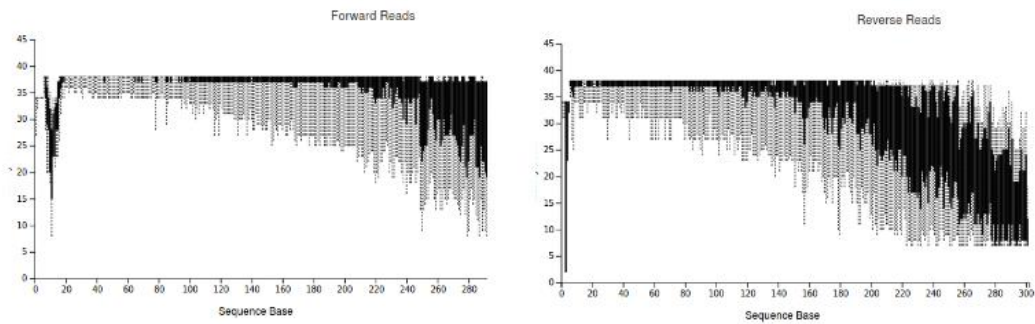


Figura 7. Calidad de las secuencias obtenidas en lecturas *forward* y *reverse*. QIIME2

Observando la Figura 6 podemos emplear un truncado de 260 pb en las secuencias en *forward* y 220pb en *reverse* para llevar a cabo la eliminación del ruido y quimeras y la unión de las secuencias *paired* empleando el pipeline dada2 denoised-paired. De esta manera adicionalmente al filtrado de las secuencias se identificarán los ASV de cada muestra y se calculó su frecuencia. En la tabla 2 mostramos los resultados obtenidos. Por otro lado, aplicamos el protocolo deblur previa unión de las secuencias mediante vsearch para comparar ambos protocolos. A modo de resumen empleando dada2 se han identificado 14.148 ASV diferentes, con frecuencia media total de 539.638, siendo la frecuencia media de ASV por muestra de 38. Como podemos observar en la tabla 2 en las muestras 15 y 32 no se observan ASV. Empleando el protocolo deblur que la frecuencia media total ha sido superior 755.028 además tanto la muestra 15 como la 32 podrían ser analizadas. Por lo tanto, de la comparativa de los dos protocolos de análisis empleados, dada2 y deblur, observamos que se encuentran bastantes diferencias en cuanto al número de secuencias filtradas y que serán empleadas para el análisis posterior. Considerando que deblur nos permite obtener mejores resultados en la mayoría de las muestras a la vez que es su velocidad de ejecución es mayor, será este el que emplearemos para posteriores análisis.

Los resultados de secuenciación de otros estudios sobre poblaciones microbianas vaginales y/o endometriales muestran resultados variables en el número promedio de OTUS filtrados por muestra desde 40 hasta 250. Por lo tanto, se podría concluir que la secuenciación del gen 16S

rRNA debe estar fuertemente influida por factores como el kit empleado para la extracción del DNA, la región hipervariable seleccionada del gen 16S rRNA secuenciada o el par de cebadores utilizado y el kit o sistema de generación de librerías de NGS. Además, las diferencias encontradas en el número promedio de secuencias y su variación, y también en la media y variación del número final de OTUs por muestra, se pueden ver acentuadas por el pipeline empleado, los parámetros escogidos para el depurado de secuencias y la estrategia elegida para la creación de los OTUs. En el estudio de Subramanian y colaboradores [21] sobre microbioma vaginal se obtuvo una media de 137.176 secuencias/muestra, siendo muy superior las obtenidas en el presente estudio, aunque en su caso se mostró menor variabilidad ya que el rango fue menor (66.576-205.488). En cuanto al número de OTUS identificadas en el presente trabajo mediante el protocolo deblur ha sido 116 que se encuentra dentro de los valores esperados para este tipo de muestra vaginales ya que el rango descrito en bibliografía oscila entre 47 [22] y 250 [21].

2.4.2 Análisis de diversidad alpha

La diversidad alpha se corresponde con la riqueza de especies que hay en una determinada comunidad. En nuestro caso en particular, cuantas especies diferentes se identifican en una muestra.

En primer lugar, vamos a calcular las curvas de rarefacción. La rarefacción calcula el número de especies esperadas en el caso de que todas las muestras poseyesen el mismo número de individuos capturados, en nuestro caso hace referencia a la misma profundidad.

Calculamos las curvas para diferentes índices de diversidad a una profundidad de 1000 (figuras 8, 9 y 10).

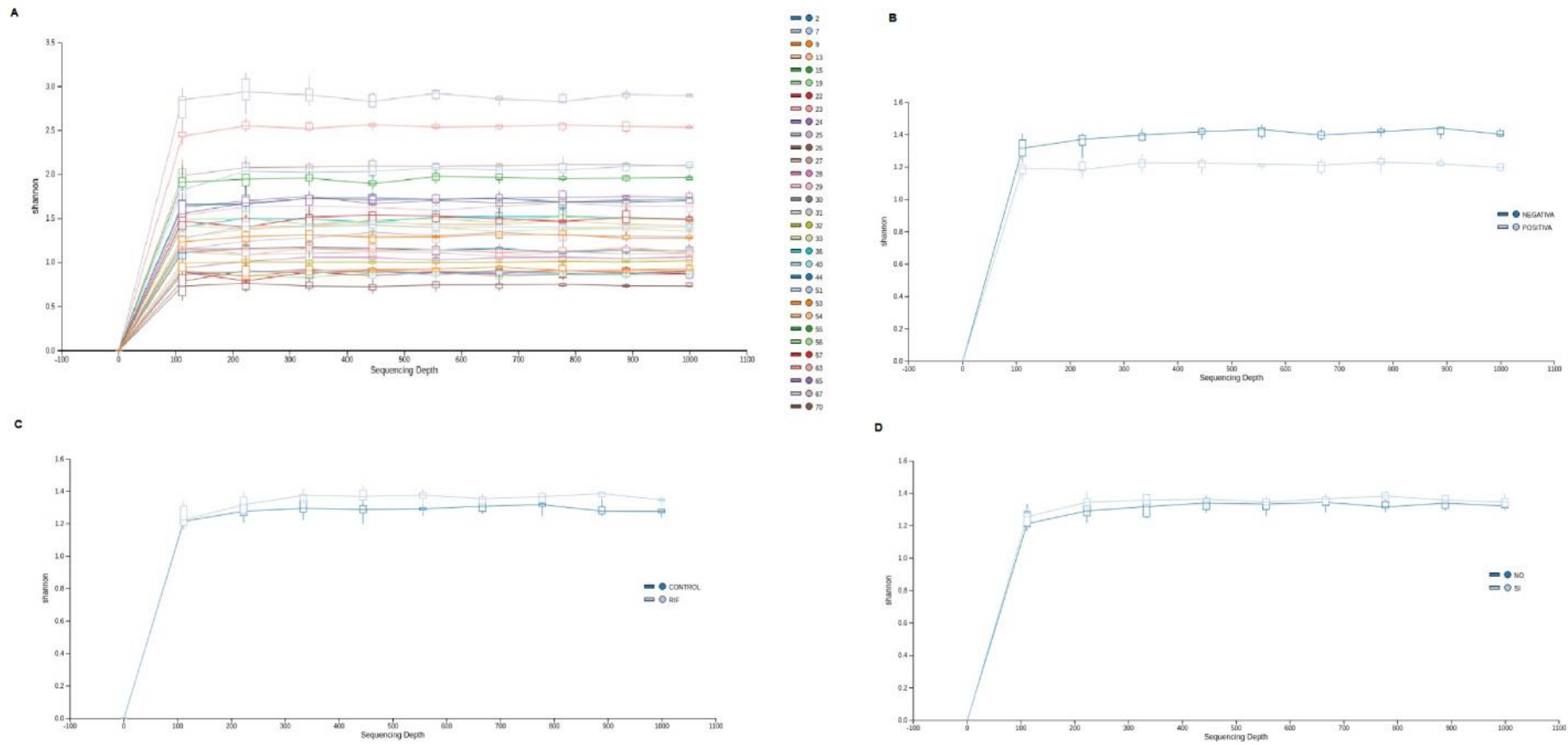


Figura 8. Curvas de rarefacción para el índice Shannon por: (A) muestra, (B) embarazo, (C) grupo, (D) tratamiento. QIIME2

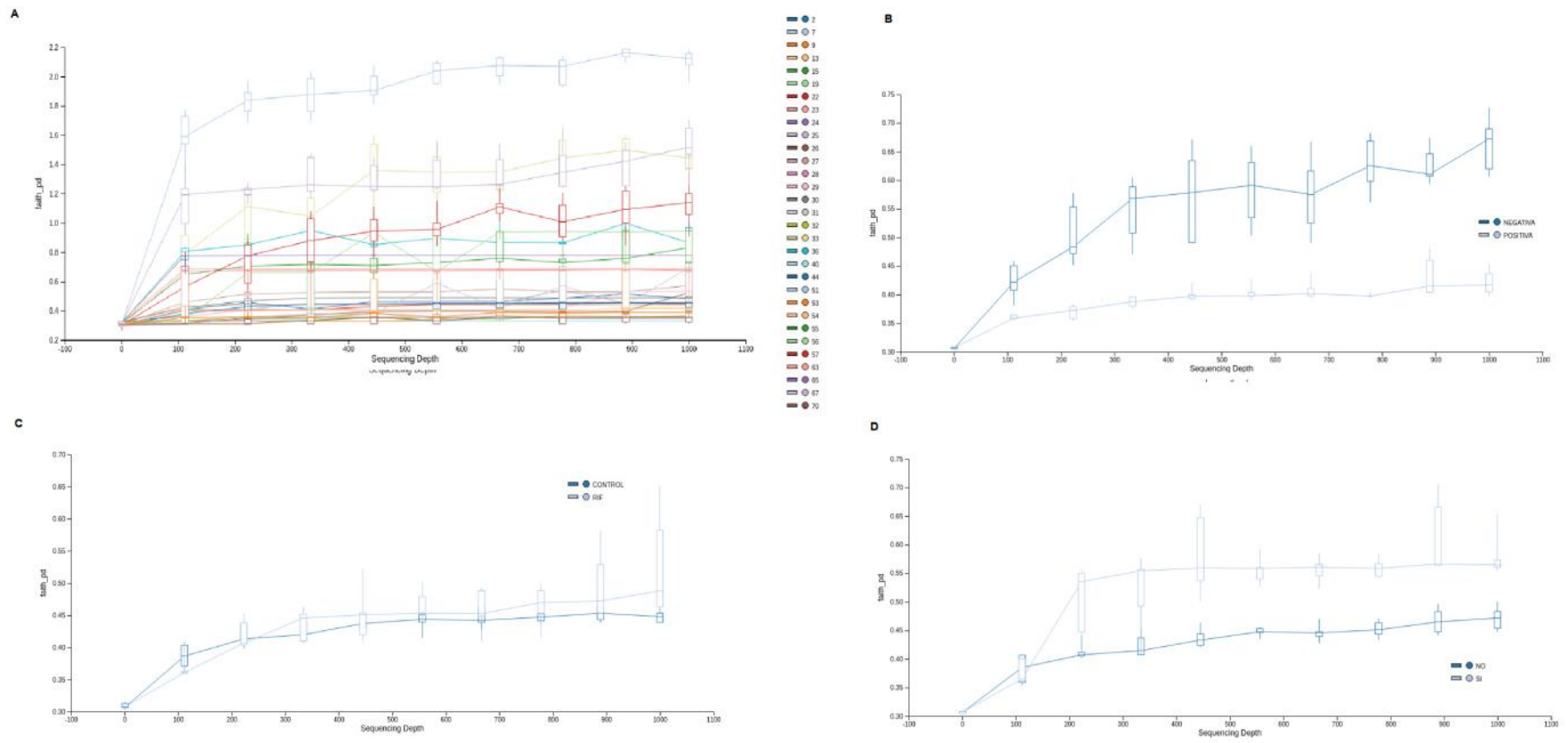


Figura 9. Curvas de rarefacción para la distancia filogenética Faith por: (A) muestra, (B) embarazo, (C) grupo, (D) tratamiento. QIIME2

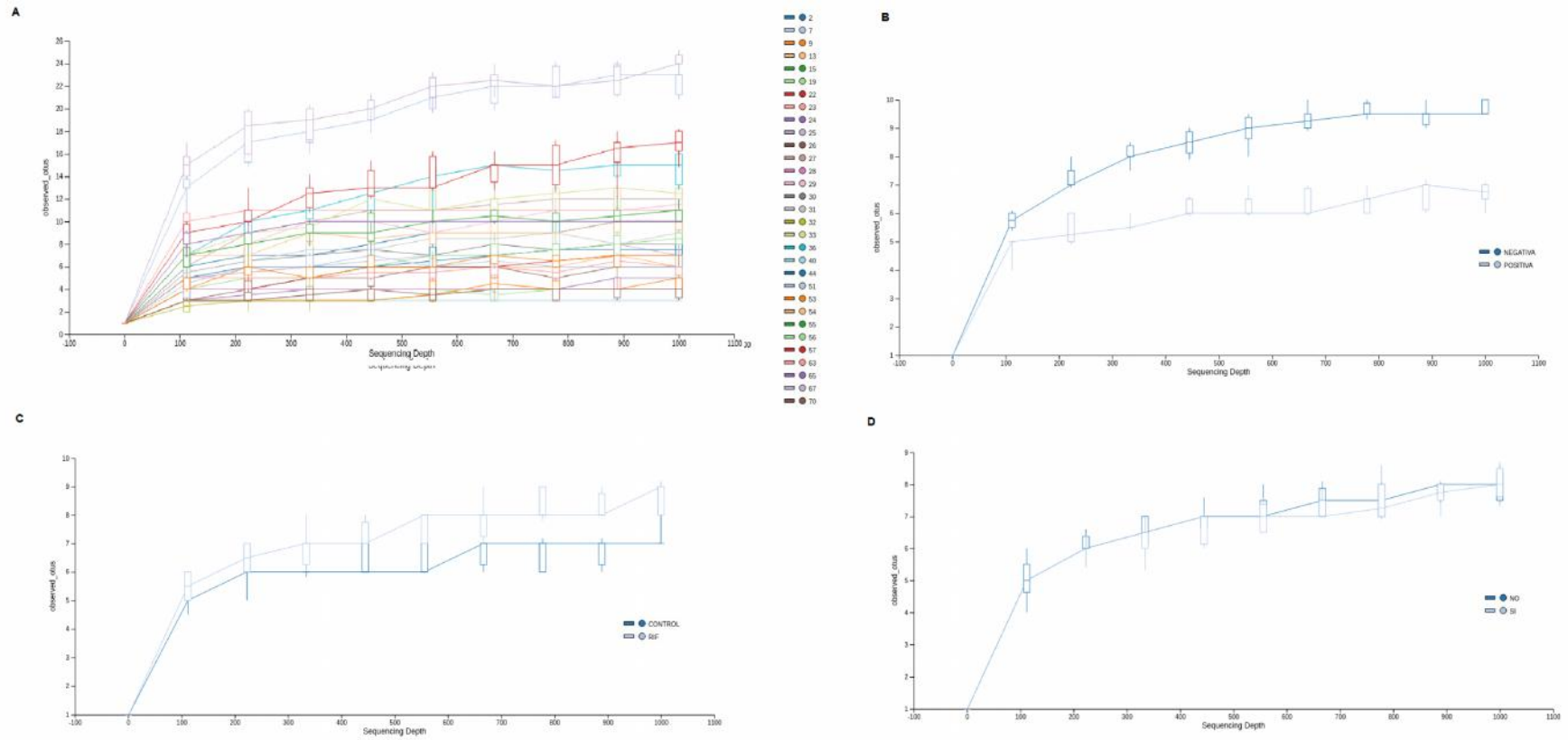


Figura 10. Curvas de rarefacción para el numero de OTUS observadas por: (A) muestra, (B) embarazo, (C) grupo, (D) tratamiento. QIIME2

Como podemos observar en las curvas de rarefacción no se han identificado diferencias en los distintos índices de diversidad para el factor tratamiento y grupo al que pertenece la paciente. Sin embargo, si se observan diferencias para el embarazo.

Para profundizar en la importancia del factor embarazo en la diversidad alpha de las muestras del microbioma vaginal vamos a realizar comparaciones de dichos índices entre el grupo de pacientes que ha logrado embarazo y los que no.

A continuación, mostramos los diagramas de cajas de la comparativa para los 3 factores. En primer lugar, comparamos el índice que nos mide la distancia filogenética (faith_pd) para el factor grupo (figura 11), no observándose diferencias ($p=0.39$).

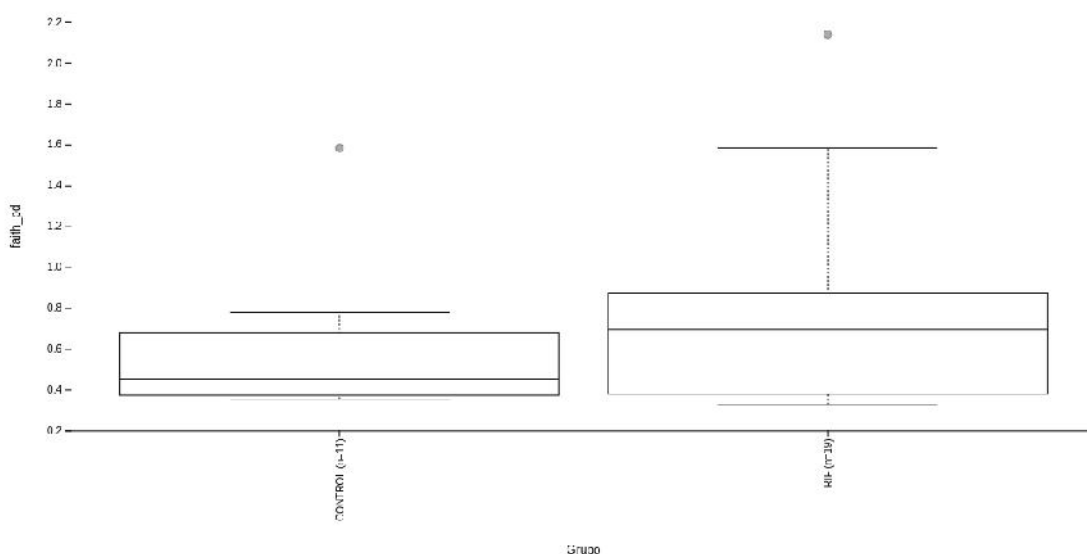


Figura 11. Diagrama de cajas para el índice de diversidad alpha faith_pd para el factor grupo. QIIME2

Obtenemos el diagrama de cajas para el factor tratamiento (figura 12) y el análisis estadístico que nos da como resultado un p-valor 0.91 por lo tanto no existen diferencias en el índice de diversidad alpha entre muestras de pacientes tratadas o no con pro bióticos.

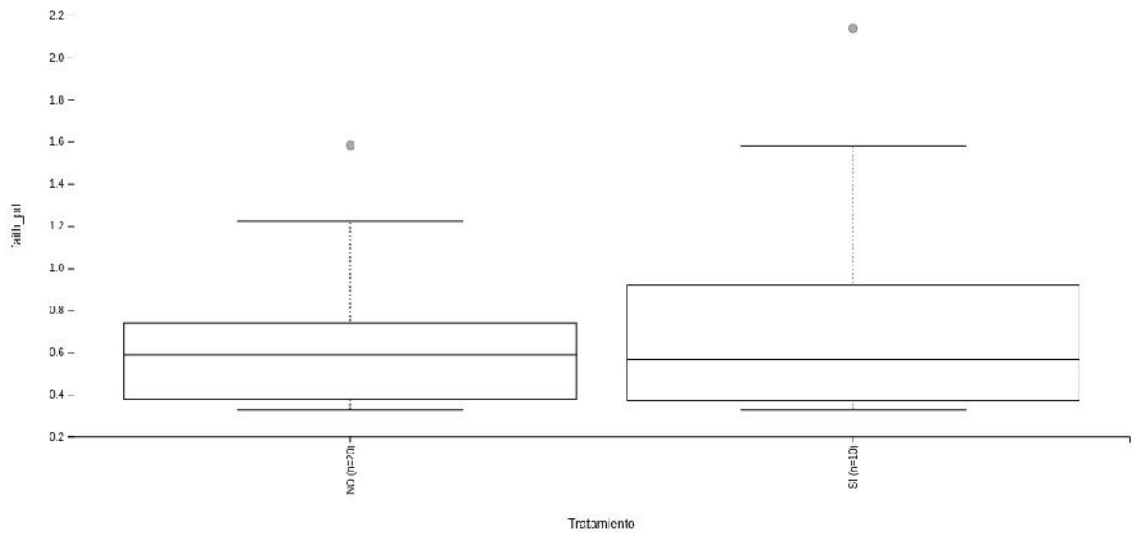


Figura 12. Diagrama de cajas para el índice de diversidad alpha faith_pd para el factor tratamiento. QIIME2

Finalmente, realizamos el mismo análisis considerando el factor embarazo (figura 13). En este caso observamos un mayor índice de diversidad en el grupo de no embarazo, aunque se no alcanza significación estadística ($p=0.088$), pero si una tendencia.

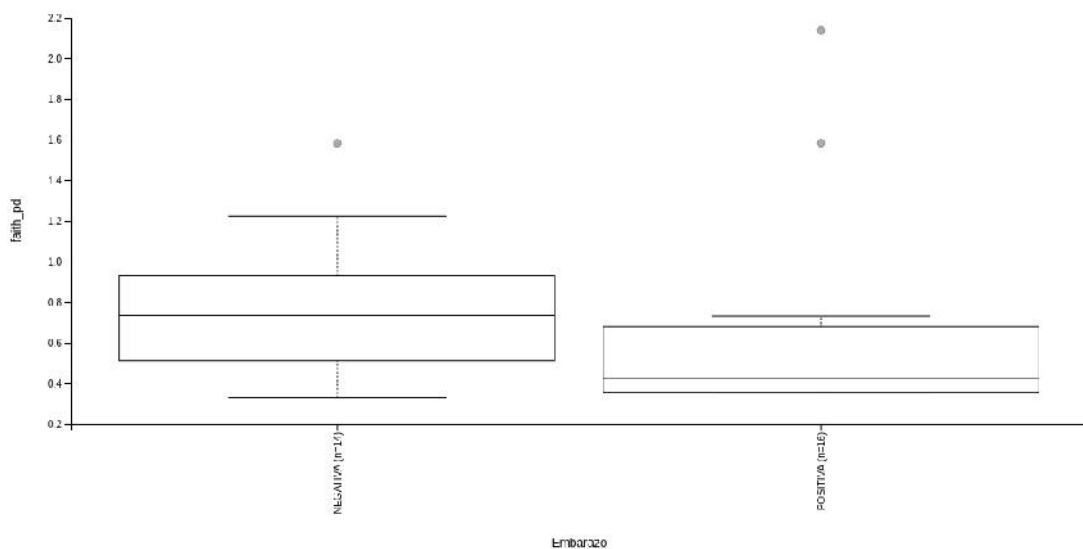


Figura 13. Diagrama de cajas para el índice de diversidad alpha faith_pd para el factor embarazo. QIIME2

Con el objetivo de determinar si existe o no esta posible diferencia con el índice de diversidad alpha se estudió otro índice, el índice Chao1. Chao1 es un estimador del número de especies en una muestra

basado en el número de especies raras presentes. Tal y como se observa en la figura 14 existe diferencia en dicho índice entre las muestras que logran embarazo y no con un p-valor de 0.039. Siendo mayor en las muestras que no logran embarazo.

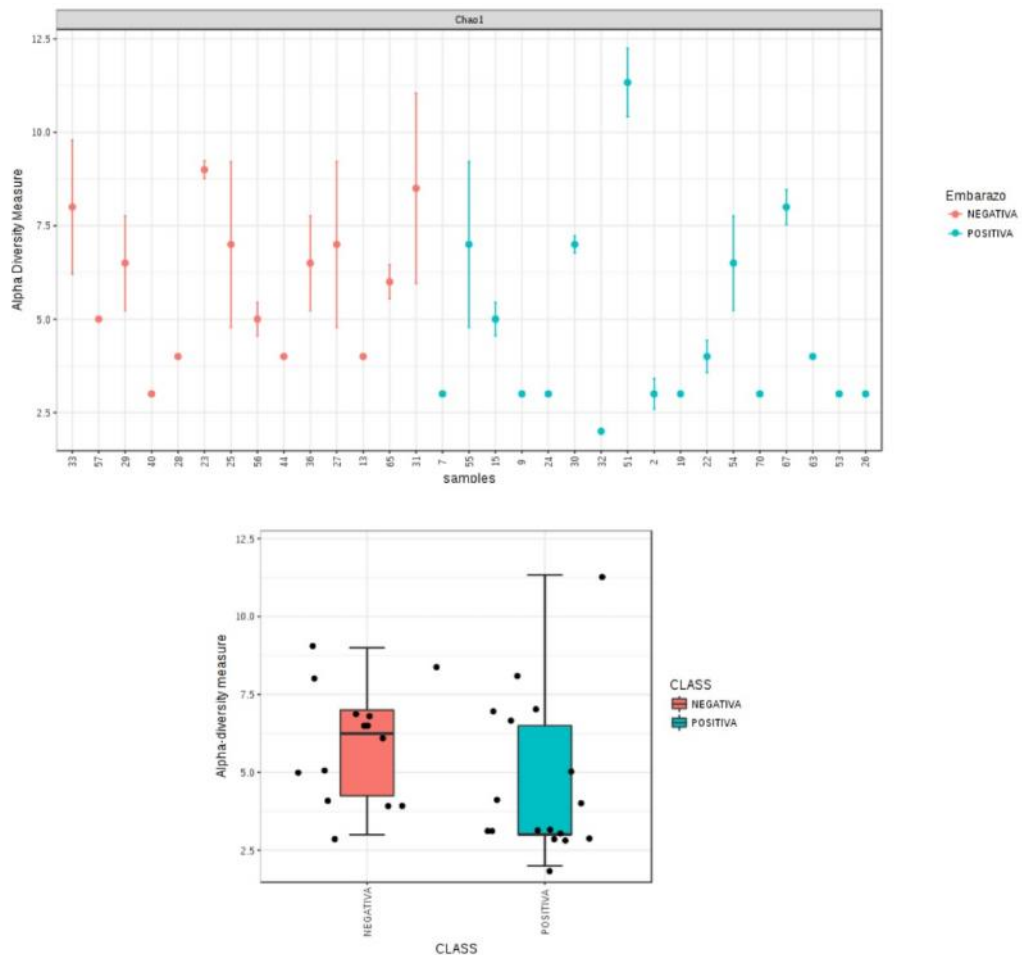


Figura 14. Análisis comparativo para el índice de diversidad Chao1 para el factor embarazo. MicrobiomeAnalyst MDP.

El microbioma vaginal posee bajos niveles de diversidad según los estudios realizados en el marco del proyecto del microbioma humano [23 y 24] existiendo cierta variabilidad en cuanto a la localización dentro de la vagina y la semana del embarazo. En nuestro trabajo, los resultados obtenidos del análisis de diversidad alpha muestran valores bajos y además cuando se comparan para las diferentes variables incluidas en el estudio se puede observar que ni el grupo al que pertenecen las pacientes (control o fallo de implantación) ni si han sido

tratadas con pro bióticos produce cambios a nivel del número total de especies en el microbioma vaginal el día de la transferencia embrionaria. Sin embargo, si se observan diferencias cuando consideramos si la paciente ha conseguido o no embarazo. Las pacientes que no logran embarazo presentan índices de diversidad alpha mayores que aquellas que han logrado el embarazo. No existe hasta la fecha ningún trabajo que correlacione el índice de diversidad alpha del microbioma vaginal con el resultado de los tratamientos de reproducción asistida. Estos resultados únicamente se podrían comparar con el trabajo publicado por Moreno y colaboradores [16] realizado en microbioma endometrial en el que no observan dicha correlación, pero dado que en nuestro trabajo analizamos el microbioma vaginal no son comparables. Además, el microbioma endometrial presenta menor diversidad que el endometrial por lo que las magnitudes de los cambios deben ser mayores para que sean determinantes para observar esta diferencia. Por otro lado, en el trabajo realizado por Walther-Antonio y colaboradores [25] se observa que cuando se analiza el índice de diversidad para la población de *Lactobacillus* fue menor en el grupo de pacientes embarazadas. Además, en estudios longitudinales en los que analizan el microbioma vaginal en función de la semana de gestación se observa menores índices de diversidad en pacientes con embarazos evolutivos [24]. Esto nos haría pensar que el microbioma vaginal se modifique con el embarazo, sin embargo, dado que nuestro trabajo a considerado el microbioma el mismo día de la transferencia embrionaria nuestros resultados apuntan a que es la presencia de un microbioma poco diverso el que predispone a la consecución de un embarazo evolutivo.

2.4.3 Análisis de diversidad beta.

La diversidad beta analiza la diferente composición, en términos de abundancia de los diferentes taxones, entre las diferentes muestras. La diversidad beta se puede medir de forma cuantitativa o cualitativa, en la primera se considera la abundancia de los microorganismos observados, mientras que en la segunda solo se tiene en cuenta la

presencia o ausencia. Los índices de similitud de Sørensen y el Índice de Jaccard determinan la distancia entre muestras basándose únicamente en la presencia o ausencia de OTUs, mientras que los índices de similitud de Bray-Curtis y Unifrac miden la concordancia en base a la abundancia de OTUs en cada muestra, incluyendo además las distancias filogenéticas en el caso de Unifrac.

Dado que nuestro objetivo es valorar la relación entre el microbioma vaginal el día de la transferencia y el embarazo, vamos a analizar la diversidad beta comparando el grupo de embarazo y no embarazo.

Llevamos a cabo el análisis de diversidad beta empleando los diferentes índices no observándose diferencias estadísticamente significativas cuando comparamos el grupo embarazo y no embarazo. Sin embargo, empleando el índice unifrac no ponderado observamos diferencia entre ambos grupos (figura 15), siendo el p-valor obtenido mediante un análisis PERMANOVA de 0.088, no alcanzando significación estadística, pero observándose cierta tendencia.

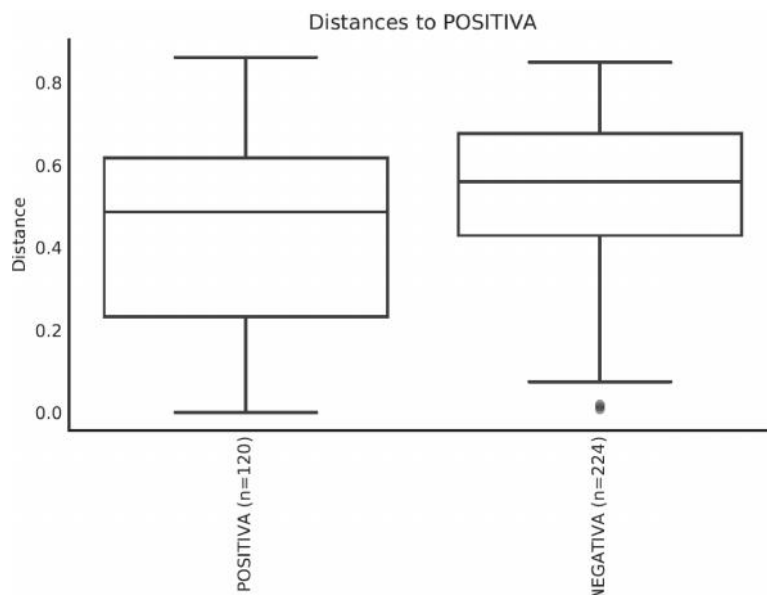


Figura 15. Análisis comparativo para el índice de diversidad beta para el factor embarazo. QIIME2

Los resultados publicados en relación al microbioma vaginal y el embarazo han mostrado que existe diferencias en la diversidad beta en

las semanas de gestación y el lugar de la vagina [23]. Así mismo se ha observado que existe diferencias en la diversidad beta entre pacientes embarazadas y no embarazadas [25]. En nuestro trabajo los resultados apuntan a que existe tal diferencia en la diversidad beta del microbioma vaginal el día de la transferencia y el logro del embarazo, para poder alcanzar significación estadística un mayor tamaño muestral podría hacernos obtener la misma conclusión que en los trabajos previos. Del mismo modo que para los resultados obtenidos en el análisis de la diversidad alpha, dado que en nuestro trabajo nos encontramos en una fase previa al establecimiento del embarazo, quizás sea la causa del embarazo y no viceversa.

Para continuar con el análisis de la relación entre la diversidad del microbioma vaginal y la consecución o no de embarazo llevamos a cabo un análisis de componentes principales (PCoA). Mediante análisis de PCoA se exploran y visualizan las diferencias entre las muestras a partir de la matriz de distancias filogenéticas UniFrac no ponderada, asignando a cada muestra una posición en un gráfico tridimensional. Con distintos colores se representan el logro o no del embarazo (figura 16).

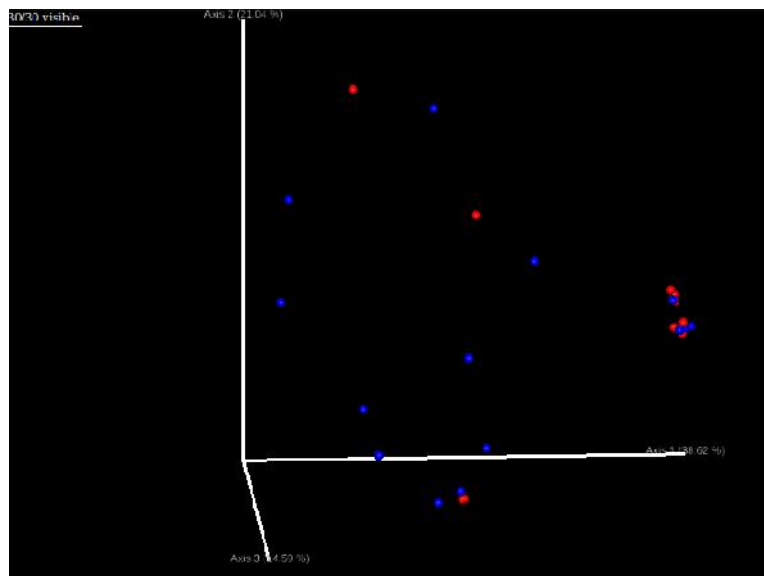


Figura 16. PCoA, construido a partir de la matriz de distancias Unifrac, que representa las muestras del estudio con diferentes colores en función del embarazo (rojo) o no embarazo (azul).QIIME2.

No se observa un patrón claro de separación entre las muestras de pacientes que han conseguido o no embarazo, aunque parece que las muestras que dan lugar a embarazo se agrupan en el extremo derecho del gráfico. Un tamaño muestral mayor nos ayudaría a corroborar esa diferencia. En los ejes se encuentra el porcentaje de la varianza explicada por cada componente (PC1:38.62%, PC2:21.04%, PC3: 14.39%). Con el primer y segundo componente explicaríamos más del 50% de la variabilidad existente entre nuestras muestras. Para poder ahondar aún más en la existencia de posibles patrones diferentes entre los dos grupos de muestras podemos realizar un análisis de clústers de la composición del microbioma y su caracterización taxonómica.

2.4.4 Caracterización taxonómica.

El siguiente paso en el análisis de los resultados consiste en llevar a cabo la caracterización taxonómica.

Comenzamos con una primera descripción global de las muestras utilizando el nivel género (figura 17).

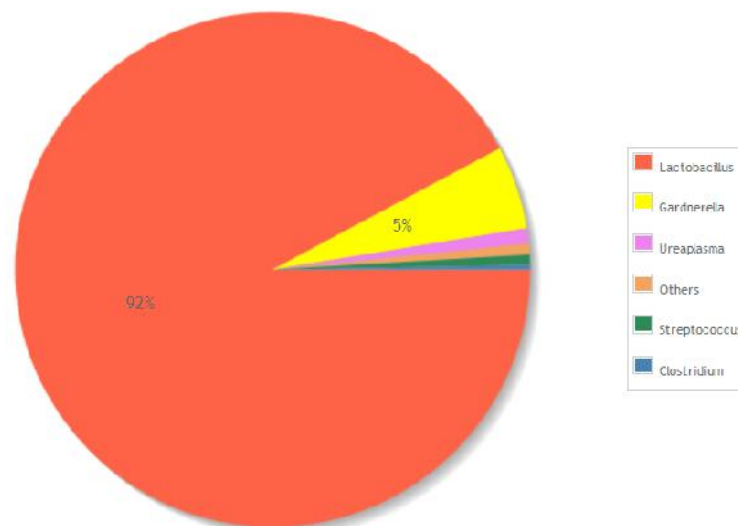


Figura 17. Gráfico pie-chart que muestra la diversidad taxonómica a nivel de género en las muestras incluidas en el estudio. MicrobiomeAnalyst MDP.

Tal y como podemos observar en la gráfica existe una clara dominancia del género *Lactobacillus* en el microbioma vaginal. Obtenemos un

heatmap para observar la abundancia relativa respecto al resto de géneros (figura 18).

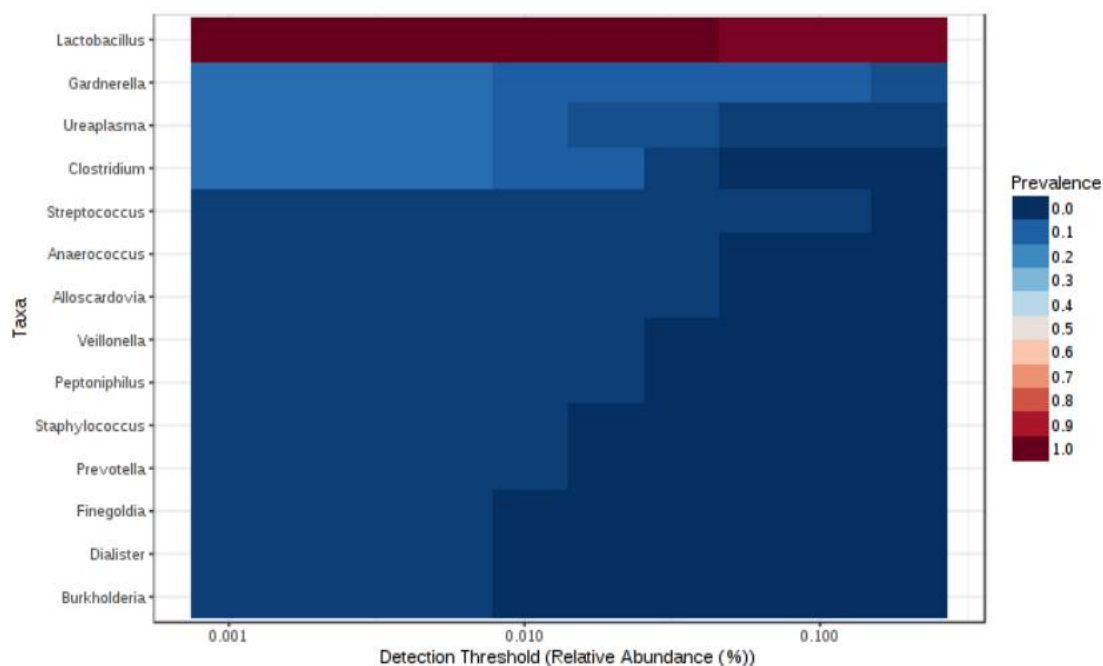


Figura 18. Heatmap de abundancia relativa a nivel de género en las muestras incluidas en el estudio. MicrobiomeAnalyst MDP.

Esta claramente demostrado que el microbioma vaginal se encuentra principalmente formado por microorganismos del género *Lactobacillus* [26], los cuales crean un ambiente ácido que protege frente a las enfermedades de transmisión sexual e infecciones oportunistas. Curiosamente esta predominancia del género *Lactobacillus* es propia de la especie humana, alcanzado valores superiores al 90% mientras que en otras especies de mamíferos no supera el 1% [27]. Una de las posibles explicaciones que justifican este hecho podría estar asociado con el embarazo y el nacimiento. En nuestro estudio se corrobora *Lactobacillus* la abundancia superior al 90% del género *Lactobacillus*. Concretamente se corresponde con el 93.62%, seguido de *Gadnerella* 4,28%, *Streptococcus* 0,72%, *Ureaplasma* 0.52%, *Clostridium* 0,47%, 0,06% *Staphylococcus*, 0,04% *Atopobium*, 0,03% *Alloscardovia*, 0,03% *Finegoldia*, 0,02% *Haemophilus*, 0,02% *Prevotella*, 0,02% *Petoniphilus*, 0,02% *Anaerococcus* y otros con abundancia menor al 0,01%. Más concretamente dentro del género *Lactobacillus* las especies más

representadas son con un 47,05% *L. crispatus*, 22,85% *L. helveticus*, 21,95% *L. iners*, 3,97% *L. jenseii*. En el microbioma humano vaginal se ha podido identificar hasta 5 comunidades (CST, *community state types*). De forma resumida, CSTI, II, III y V están dominadas por especies *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii* respectivamente [28]. Mientras que CSTIV no posee una dominancia específica siendo el grupo más diverso y esta principalmente representado por bacterias anaerobias como los géneros *Prevotella*, *Dialister*, *Atopobium*, *Gardnerella*, *Megasphaera*, *Peptoniphilus*, *Sneathia*, *Eggerthella*, *Aerococcus*, *Finegoldia* y *Mobiluncus*.

Si comparamos la distribución y la composición en especies obtenida en nuestro trabajo podemos ver como es la propia que se encuentra en el microbioma vaginal pudiendo identificar las distintas comunidades. Sin embargo, cabe destacar que en nuestro trabajo no encontramos especies de la CSTII, *L. gasseri*, pero si de la especie *L. helveticus*. El género *Lactobacillus* comprende más de 80 especies diferentes divididas en función de sus relaciones filogenéticas en 7 grupos: Grupo *L. buchneri*, grupo *L. casei*, grupo *L. delbrueckii*, grupo *L. plantarum*, grupo *L. reuteri*, grupo *L. sakei*, y el grupo *L. salivarius* [29]. El grupo *L. delbrueckii* comprende las bacterias homofermentativas que se han aislado típicamente en humanos y animales (*L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*) o en comidas fermentadas (*L. delbrueckii*, *L. helveticus*) [30]. Por lo tanto, *L. helveticus* no puede ser una especie propia del microbioma vaginal, pero dado que se encuentra muy cercana filogenéticamente a *L. gasseri*, la alta similitud de la secuencia rRNA16S podría ser una posible explicación y en ese caso nos encontraríamos ante una incorrecta asignación de la especie. Teniendo en cuenta lo anteriormente explicado podríamos considerar que en nuestros resultados el grupo de *L. helveticus* se corresponde con *L. gasseri*.

Una vez hemos caracterizado en global las muestras incluidas en el estudio podemos analizarlas en función de las variables incluidas en el estudio.

Inicialmente y dado que el objetivo primario se centra en la consecución o no del embarazo vamos a comenzar con el análisis de este factor. En primer lugar vamos a mostrar un diagrama de barras a nivel de género de todas las muestras incluidas en el estudio (figura 19).

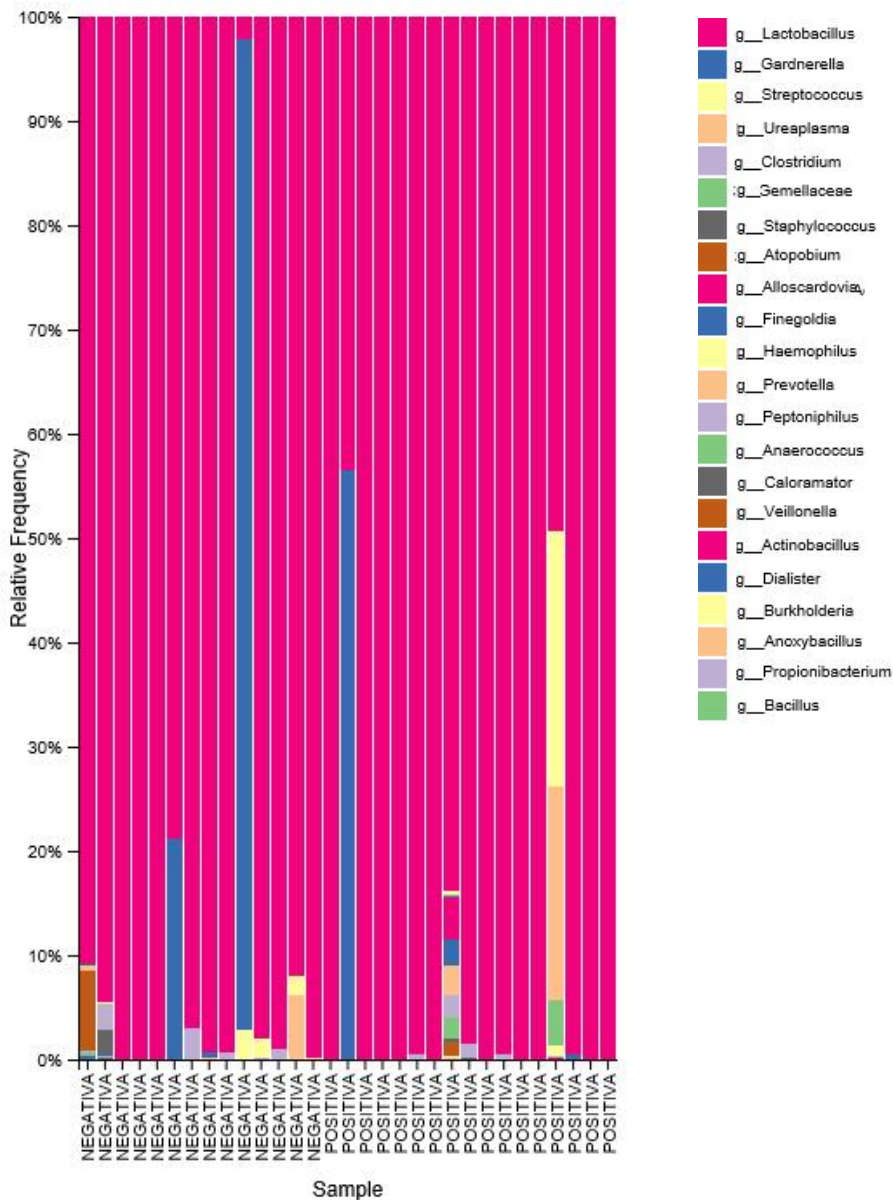


Figura 19. Diagrama de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes por muestra agrupadas por el resultado del test de embarazo (prueba beta-HCG: positiva o negativa). QIIME2.

Observando los resultados por muestra aparentemente las muestras que logran embarazo poseen un mayor porcentaje de especies del género *Lactobacillus*. Para observar con mayor claridad esta posible diferencia mostramos las muestras agrupadas por el resultado de la prueba de embarazo (figura 20).

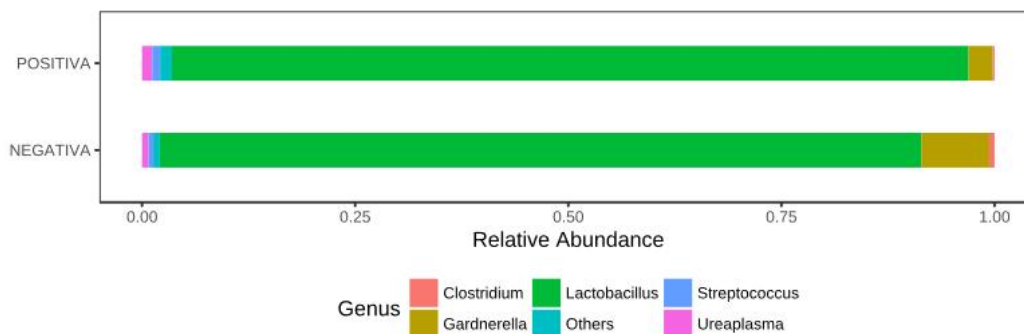


Figura 20. Diagrama de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes agrupadas por el resultado del test de embarazo (prueba beta-HCG: positiva o negativa). MicrobiomeAnalyst MDP.

El análisis univariante realizado sobre la abundancia relativa de los diferentes generos entre muestras que logran o no el embarazo no alcanzó significación estadística para ninguno de ellos. Aunque cabe destacar que para el genero Gardnerella se obtuvo un p-valor de 0.11 y para *Lactobacillus* el p-valor de 0.2.

Los estudios publicados en relación a este aspecto no hacen referencia a la comparación total de abundancia del género *Lactobacillus*, por el contrario consideran la diferenciación en dos grupos, muestras con un porcentaje de *Lactobacillus* superior o inferior al 90%. En este sentido nuestros resultados corroboraría esta hipótesis ya que el porcentaje medio de *Lactobacillus* en el grupo de embarazo es de 92.51% mientras que en el de negativo es 89.35%. En el diagrama de superficie puede observarse de forma gráfica este resultado (figura 21).

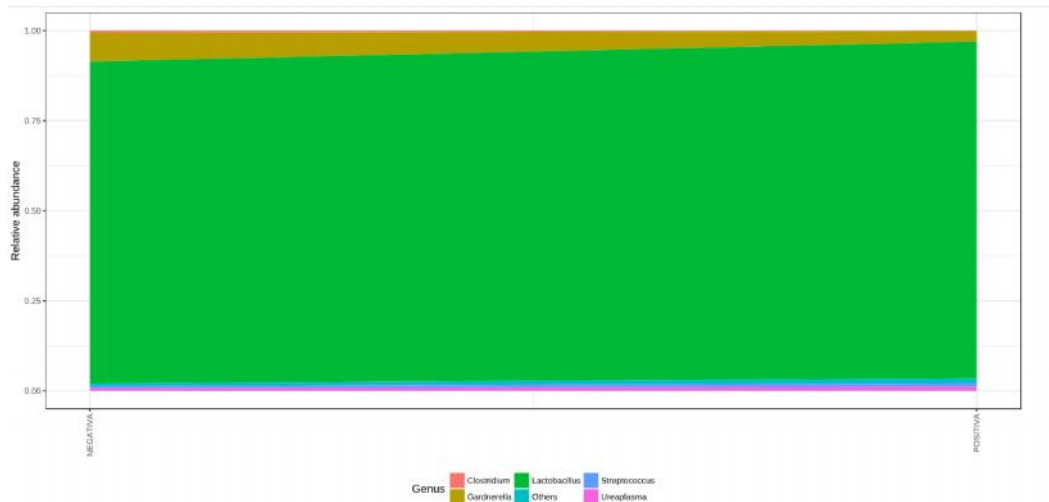


Figura 21. Diagrama de superficie de la abundancia relativa de los géneros más abundantes en función resultado del test de embarazo (prueba beta-HCG: positiva o negativa). MicrobiomeAnalyst MDP.

Por lo tanto según nuestros resultados observamos que una población dominante de *Lactobacillus* en el microbioma vaginal favorece el establecimiento del embarazo en los pacientes que se someten a técnicas de reproducción asistida. Este mismo hecho ha sido reportado en el trabajo de Moreno y colaboradores [19], en el que una microbiota no dominado por *Lactobacillus* presentó mejores tasa de implantación embrionaria, embarazo evolutivo y abortos que aquellas no dominadas por *Lactobacillus*. El efecto beneficioso de *Lactobacillus* que favorece el el embarazo podría estar relacionado con una mejor respuesta inmunologica frente al ataque de patógenos oportunistas. De hecho se ha observado que en pacientes sin vaginosis bacteriana las especies predominantes pertenecen al género *Lactobacillus* [21].

Podemos continuar con el análisis de los otros factores analizados en el estudio como es el grupo al que pertenecen los pacientes (RIF o control (figura 22)).

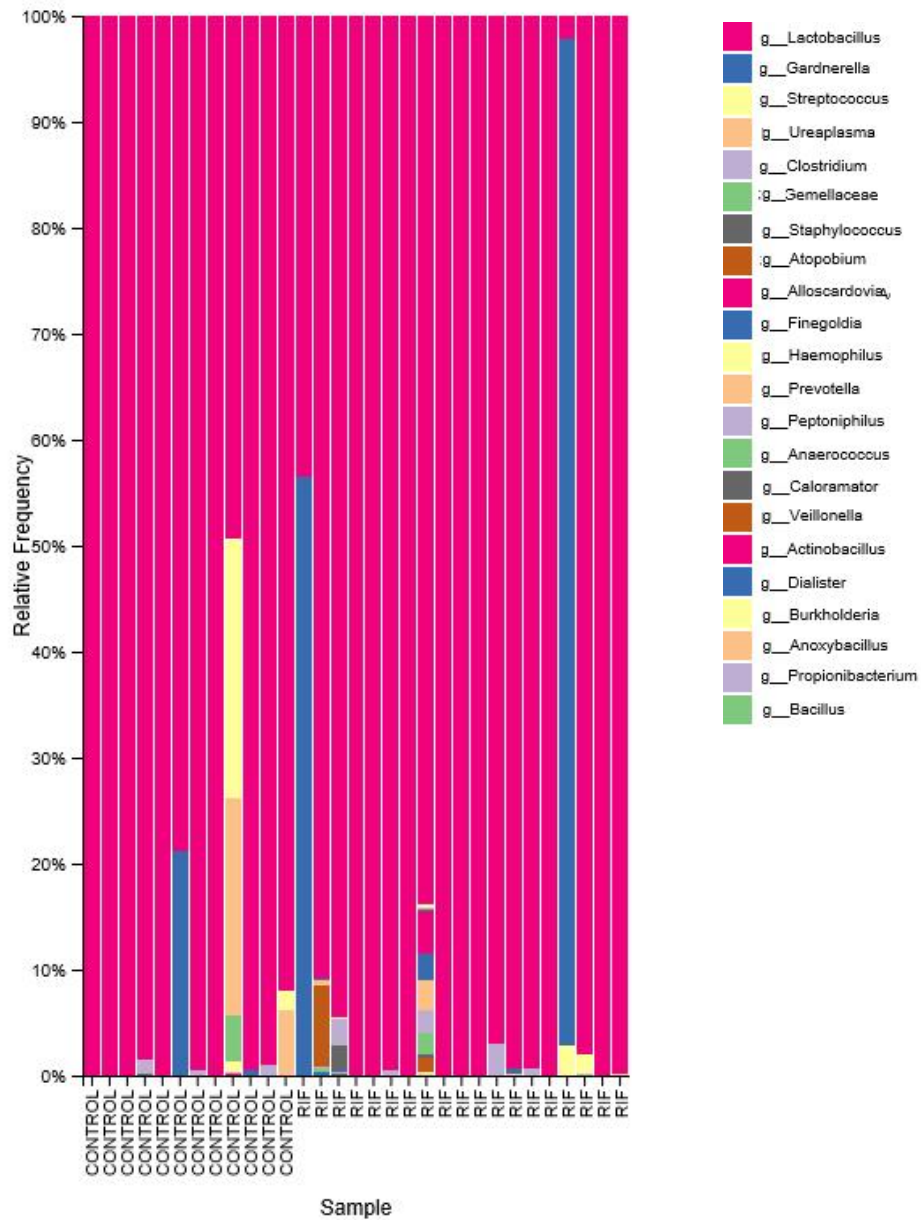


Figura 22. Diagrama de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes por muestra agrupadas por el grupo al que pertenecen las pacientes (control o RIF). QIIME2.

Aparentemente no observamos ninguna diferencia entre ambos grupos. Realizamos una gráfica global para poder detectar la presencia de diferencias entre ambos grupos (figura 23).

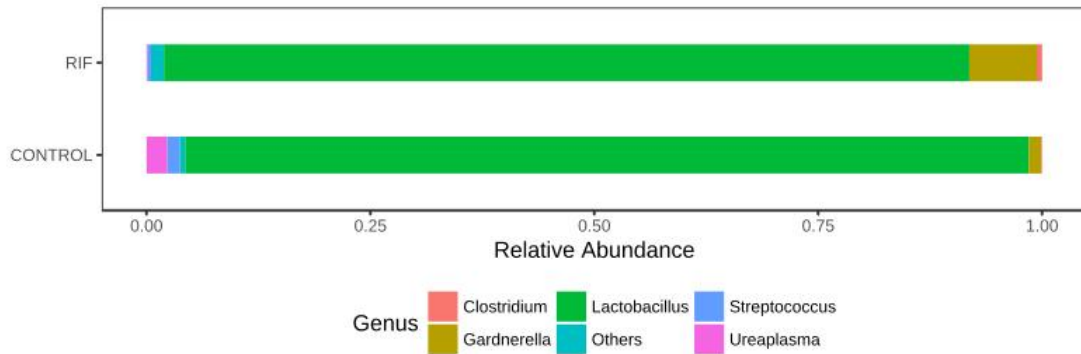


Figura 23. Diagrama de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes agrupadas por grupo al que pertenecen las pacientes (control o RIF). MicrobiomeAnalyst MDP.

Observando la gráfica podemos ver como los cambios en abundancia en los géneros *Ureaplasma*, *Gardnerella* y *Clostridium* son los más llamativos. Realizamos un análisis univariante, en el que ningún género mostro diferencias únicamente obtenemos un p-valor de 0.15 y 0.19 para *Ureaplasma* y *Clostridium* respectivamente. Si realizamos el análisis de influencia de la abundancia de *Lactobacillus* para el grupo no observamos ninguna diferencia ($p=0.935$).

Finalmente mostramos la gráfica de área para el factor grupo (figura 24).

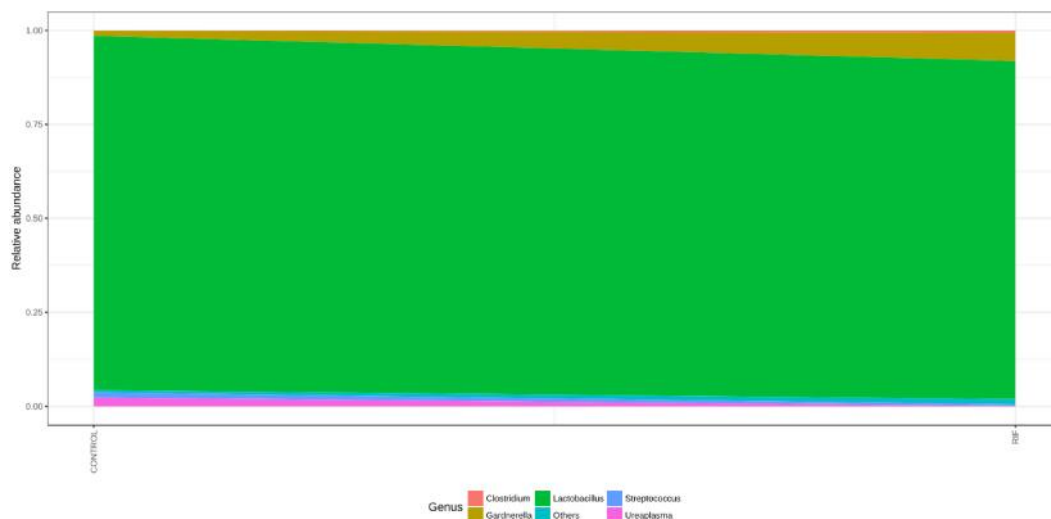


Figura 24. Diagrama de superficie de la abundancia relativa de los géneros más abundantes en función del grupo al que pertenecen las pacientes (control o RIF). MicrobiomeAnalyst MDP.

En la actualidad no existe ningún trabajo que estudie el efecto del microbioma vaginal en el fallo de implantación. Según nuestros resultados podrían apuntar a que la presencia de géneros diferentes de *Lactobacillus* a un mayor riesgo a sufrir fallo de implantación. En esta línea se ha descrito que las pacientes que sufren de vaginosis bacteriana con abundancia del genero *Gardnerella* y *Ureaplasma* poseen mayor riesgo de embarazo pretermino [13].

Finalizamos con el análisis de datos comparando los resultados en función de si las pacientes han sido o no tratadas con probióticos (figura 25).

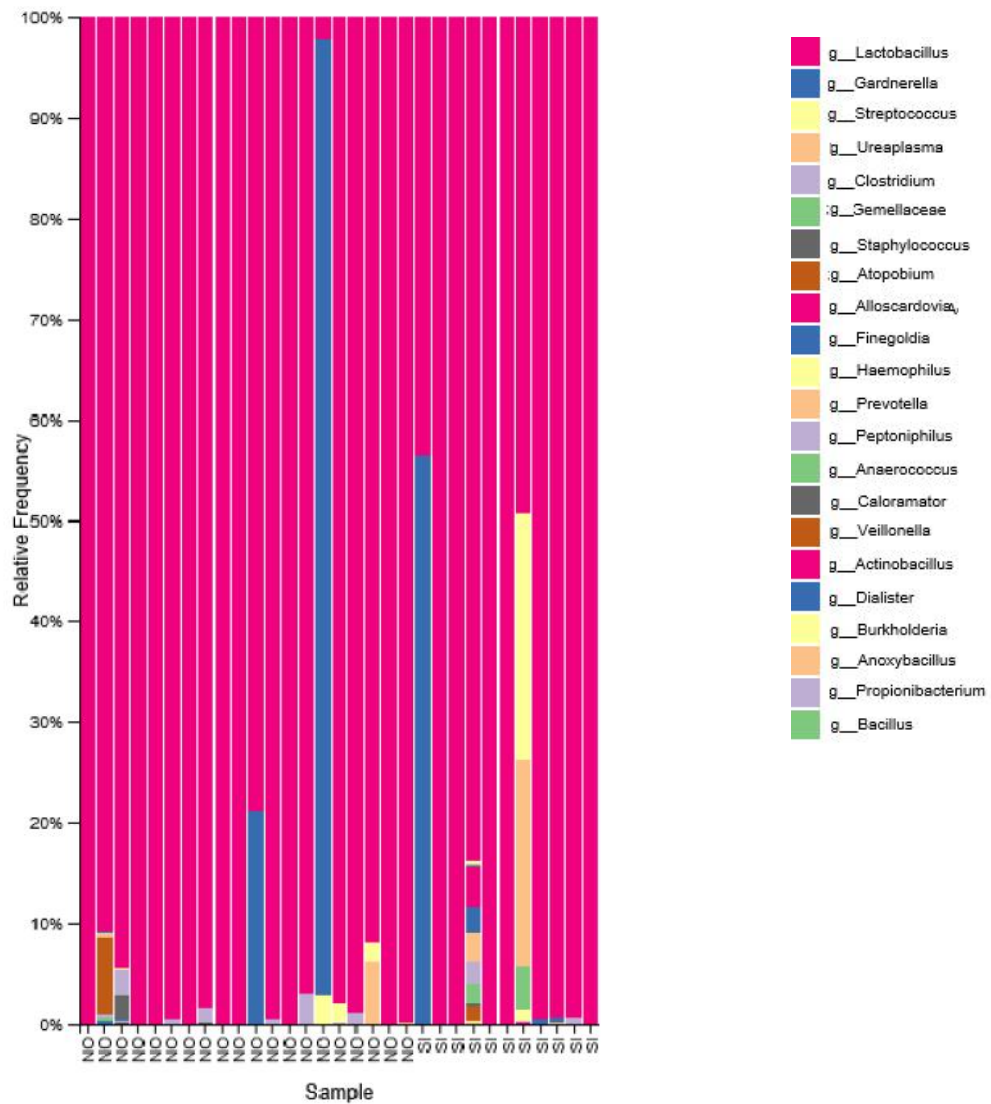


Figura 25. Diagrama de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes por muestra agrupadas por tratamiento con pro bióticos. QIIME2.

Mostramos la comparativa global de ambos grupos (figura 26).

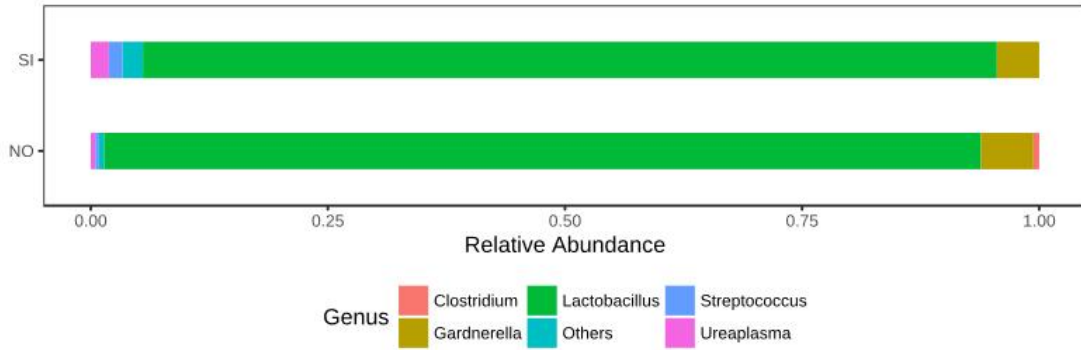


Figura 26. Diagrama de barras de la frecuencia relativa de los géneros más abundantes agrupadas por tratamiento con pro bióticos. MicrobiomeAnalyst MDP.

Finalmente mostramos el gráfico de superficie para la abundancia relativa en función del tratamiento con pro bióticos (figura 27).

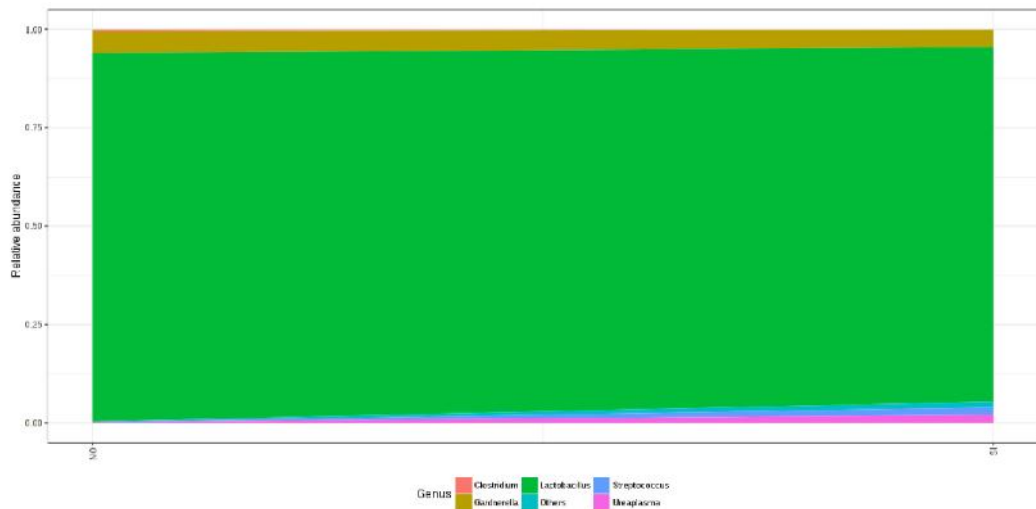


Figura 27. Diagrama de superficie de la abundancia relativa de los géneros más abundantes agrupadas por tratamiento con pro bióticos. MicrobiomeAnalyst MDP.

El análisis univariante no reveló diferencias en ninguno de los géneros entre el grupo de tratamiento y no tratamiento. Deberíamos ahondar con mayor profundidad sobre este factor, dosis, características clínicas, composición...etc. Así como realizar estudios longitudinales en la misma paciente y valorar la bibliografía sobre el efecto de los pro bióticos en el microbioma vaginal. Sin embargo, estos estudios superan los objetivos del presente trabajo.

2.4.5 Búsqueda de patrones.

Por último, para finalizar con el análisis del microbioma vaginal y su relación con la consecución del embarazo en pacientes que se someten a técnicas de reproducción asistida vamos realizar la búsqueda de patrones asociados al embarazo. Para ello emplearemos métodos de *clustering* y de *ordination*.

En primer lugar, realizamos un estudio de clústers. Mediante estos métodos se pretende buscar patrones comunes en las muestras analizadas con el objetivo de identificar posibles grupos o clúster. En la figura 28 se muestra el resultado obtenido para el análisis de clúster de nuestras muestras indicando los diferentes factores estudiados en este trabajo.

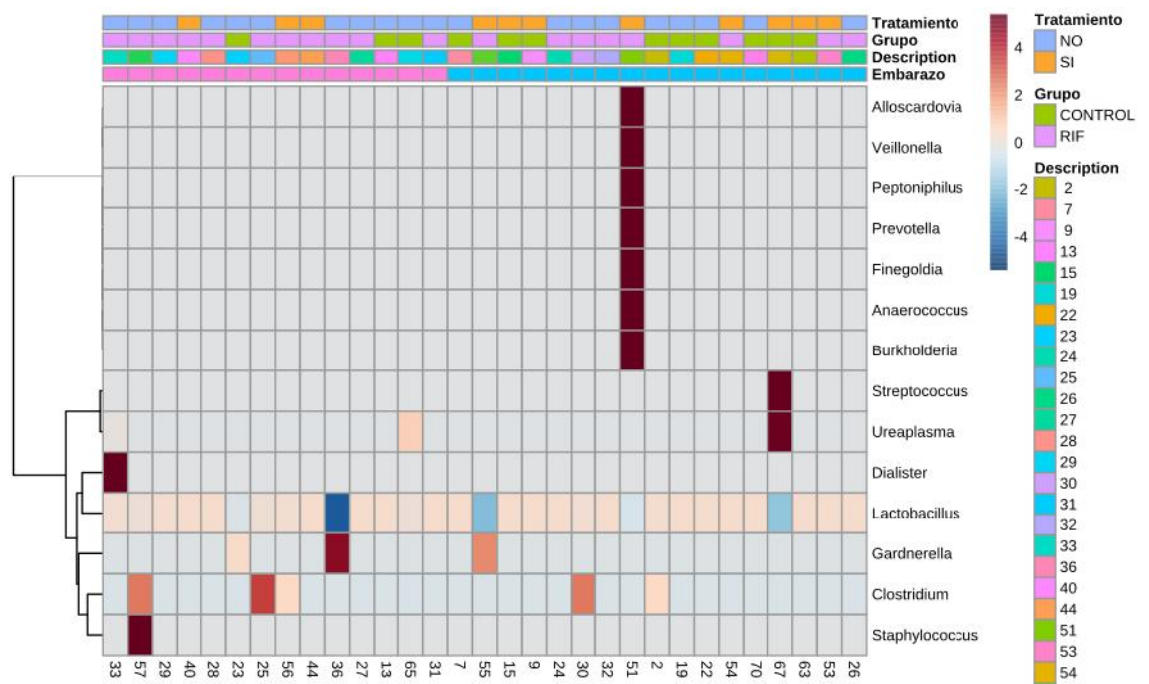


Figura 28. Cluster análisis mediante heatmap a nivel de genero. MicrobiomeAnalyst MDP.

Observando el análisis de clúster realizado podemos identificar dos clústers principales, el primero de ellos englobaría los géneros *Lactobacillus*, *Gardnerella*, *Clostridium*, *Staphylococcus* y *Dialister*. Y en segundo lugar el resto de géneros. También podemos observar

como las muestras de pacientes que han conseguido embarazo contienen principalmente microorganismos del primer clúster.

A continuación, realizamos el análisis de *ordination*. Tanto el *clustering* como el *ordination* son los principales métodos de análisis multivariantes empleados para análisis de comunidades. Hasta cierto punto las dos aproximaciones son complementarias. Mientras que el *clustering* permite clasificar en grupos herárquicos, la *ordination* por el contrario es una aproximación más natural ya que considera la existencia de comunidades con composición intermedia de especies.

Realizamos un análisis para el nivel filo (figura 29) como para el género (figura 30).

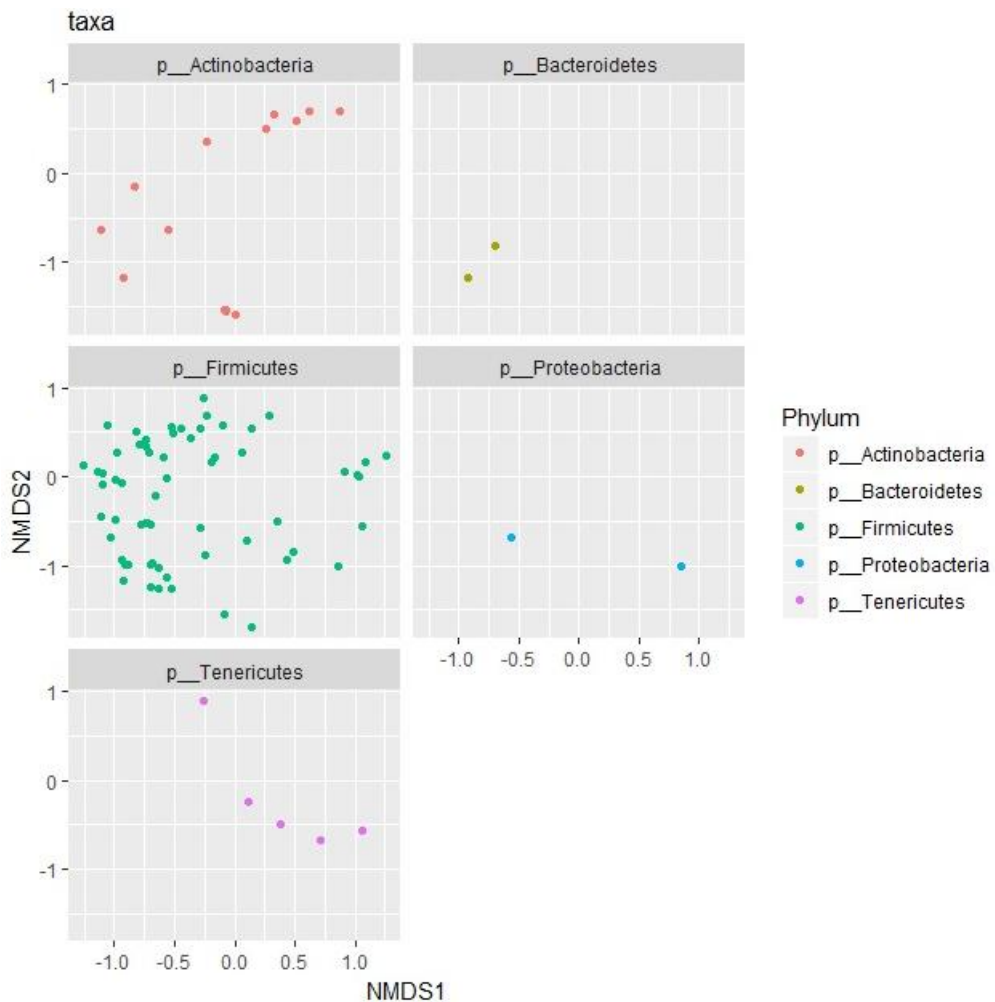


Figura 29. Análisis *Ordination* para las muestras incluidas en el estudio a nivel de filo. R-Phyloseq.

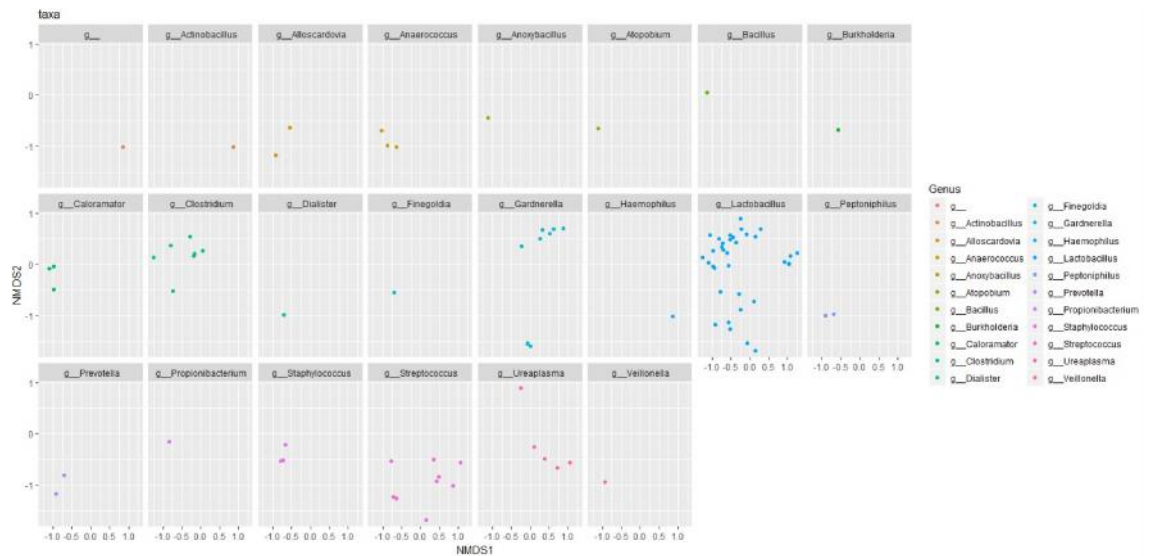


Figura 30. Análisis *Ordination* para las muestras incluidas en el estudio a nivel de género. R-Phyloseq.

No se observa ningún patrón claro, únicamente aquel que ya observamos en el heatmap formado por *Lactobacillus* y *Gardnerella*.

El género *Lactobacillus* es el único que parece mostrar un cierto patrón de distribución junto con *Gardnerella* tal y como observamos en el heatmap, pero no podemos concluir una agrupación clara.

Por último, y dado que parece que *Lactobacillus* es el género que mayor influencia presenta sobre el logro del embarazo vamos a estudiar la posible correlación entre este género y el resto. Realizamos un gráfico de correlación (figura 31).

Top 18 genus correlated with the Lactobacillus

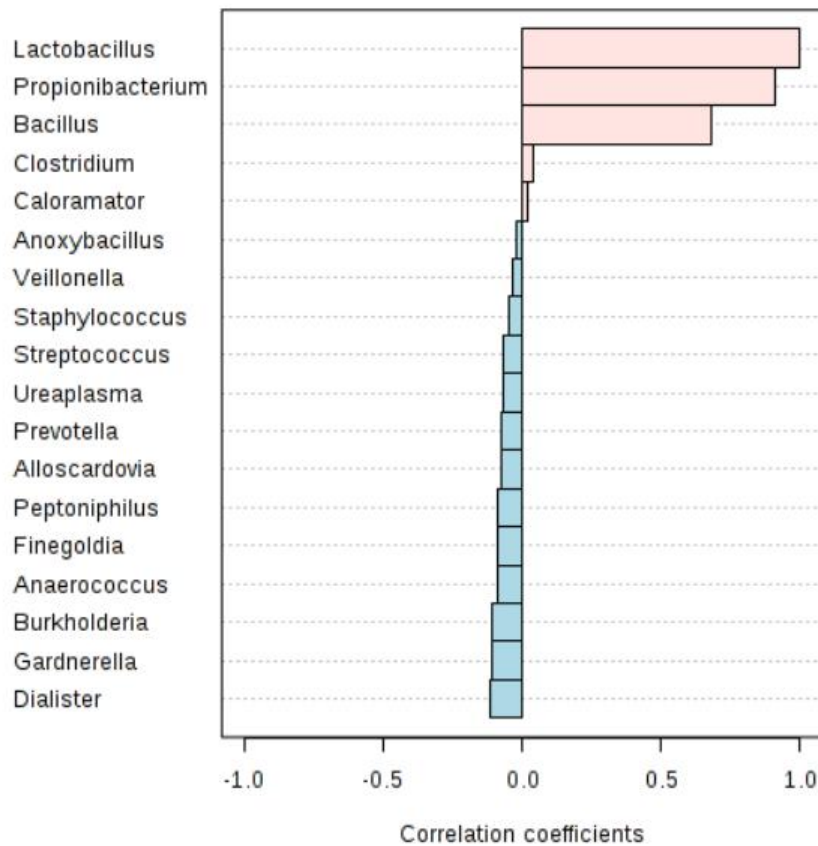


Figura 31. Análisis de correlación con *Lactobacillus*.

El gráfico de correlación indica que *Lactobacillus* correlaciona positivamente con los géneros de *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Clostridium* y *Caloramator*. Por otro lado, correlaciona negativamente con *Gadnerella*, *Dialister*, *Burkholderia* y *Finegoldia* principalmente. El resultado de la correlación nos da más datos hacia la relación entre dos tipos principales de microbiomas vaginales aquellos dominados por *Lactobacillus* que tendrían menor diversidad y se encontrarían relacionados con mayor éxito reproductivo. Y por otro lado, otro perfil que no se encuentra dominado por *Lactobacillus* y en el que aparece el género *Gadnerella*. De acuerdo con resultados previos el porcentaje de bacterias del genero *Gadnerella* supera el 10% en pacientes con infertilidad de origen infeccioso y muestra una correlación negativa con *Lactobacillus* [13].

3. Conclusiones

Considerando la planificación y metodología seguida se ha conseguido alcanzar los objetivos planteados en el proyecto ya que se ha podido obtener los perfiles del microbioma de las pacientes incluidas en el estudio, se han comparado y se ha propuesto un perfil asociado al logro del embarazo.

Las conclusiones del presente trabajo se describen a continuación:

- Se ha puesto a punto un protocolo de trabajo para la obtención y análisis de microbioma vaginal.
- Se ha observado un mayor grado de diversidad alpha Chao1 en pacientes que no logran embarazo.
- No se han observado diferencias ni en la diversidad alpha ni beta en función del grupo al que pertenece la paciente ni al tratamiento o no con pro bióticos.
- Los pacientes que consiguen embarazo poseen un menor grado de diversidad beta aunque no alcanza significación estadística.
- El género *Lactobacillus* es el género más abundante en el microbioma vaginal.
- En cuanto al perfil de microbioma asociado a la consecución del embarazo, los perfiles dominados por *Lactobacillus* están Asociados a la consecución del embarazo, por el contrario el género *Gadnerella* con la no consecución del embarazo. Ambos géneros presentan una correlación negativa.
- Se ha podido observar que en el grupo de pacientes con fallo de implantación existe una presencia de los genero *Gadnerella*, *Clostridium* y *Ureaplasma*.

Este estudio debe continuar aumentando el tamaño muestral para poder obtener mayor poder estadístico y completar el análisis del resto de posibles factores.

4. Glosario

- 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.
- MDP: Marker Data Profiler.
- QIIME: Quantitative Insights Into Microbial Ecology.
- OTU: Unidad taxonómica operacional.
- PCA: Análisis de componentes principales.
- ICSI: Inyección intracitoplasmática de espermatozoides.

5. Bibliografía

- [1] 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.
- [2] Gundogdu A, Nalbantoglu U. Human genome-microbiome interaction: metagenomics frontiers for the aetiopathology of autoimmune diseases. *Microb Genom.* 2017 Apr 26;3(4):e000112.
- [3] Peñalver Bernabé B, Cralle L, Gilbert JA. Systems biology of the human microbiome. *Curr Opin Biotechnol.* 2018 Feb 13;51:146-153.
- [4] 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.
- [5] NIH HMP Working Group. et al., "The NIH Human Microbiome Project.", *Genome Res.* 2009 Oct 9;19(12):2317-23.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S, Stevens GA. National, Regional, and Global Trends in Infertility Prevalence Since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Med.* 2012; 9: e1001356.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] Haahr T, Zacho J, Bräuner M, Shathmigha K, Skov Jensen J, Humaidan P. Reproductive outcome of patients undergoing in vitro fertilization treatment and diagnosed with bacterial vaginosis or abnormal vaginal microbiota: a systematic PRISMA review and meta-analysis. *BJOG.* 2018 Feb 22.
- [13] Graspeuntner S, Bohlmann MK, Gillmann K, Speer R, Kuenzel S, Mark H, Hoellen F, Lettau R, Griesinger G, König IR, Baines JF, Rupp J. Microbiota-based analysis reveals specific bacterial traits and a novel strategy for the diagnosis of infectious infertility. *PLoS One.* 2018 Jan 9;13(1):e0191047.
- [14] 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.

[15] 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.

[16] Moreno I, Codoñer FM, Vilella F, Valbuena D, Martinez-Blanch JF, Jimenez-Almazán J, Alonso R, Alamá P, Remohí J, Pellicer A, Ramon D, Simon C. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *Am J Obstet Gynecol*. 2016 Dec;215(6):684-703.

[17] Lawley B, Tannock GW. Analysis of 16S rRNA Gene Amplicon Sequences Using the QIIME Software Package. *Methods Mol Biol*. 2017;1537:153-163.

[18] Kuczynski J, Stombaugh J, Walters WA, González A, Caporaso JG, Knight R. Using QIIME to analyze 16S rRNA gene sequences from microbial communities. *Curr Protoc Microbiol*. 2012 Nov;Chapter 1:Unit 1E.5.

[19] McMurdie PJ and Holmes S. "phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data." *PLoS ONE* 2013; 8(4), pp. e61217.

[20] Dhariwal, A., Chong, J., Habib, S., King, I., Agellon, LB., and Xia, J. MicrobiomeAnalyst - a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. 2017. *Nucleic Acids Research* 45 W180-188.

[21] Subramaniam A, Kumar R, Cliver SP, Zhi D, Szychowski JM, Abramovici A, Biggio JR, Lefkowitz EJ, Morrow C, Edwards RK. Vaginal Microbiota in Pregnancy: Evaluation Based on Vaginal Flora, Birth Outcome, and Race. *Am J Perinatol*. 2016 Mar;33(4):401-8.

[22] MacIntyre DA, Chandiramani M, Lee YS, Kindinger L, Smith A, Angelopoulos N, Lehne B, Arulkumaran S, Brown R, Teoh TG, Holmes E, Nicholson JK, Marchesi JR, Bennett PR. The vaginal microbiome during pregnancy and the postpartum period in a European population. *Sci Rep*. 2015 Mar 11;5:8988.

[23] Aagaard K, Riehle K, Ma J, Segata N, Mistretta TA, Coarfa C, Raza S, Rosenbaum S, Van den Veyver I, Milosavljevic A, Gevers D, Huttenhower C, Petrosino J, Versalovic J. A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. *PLoS One*. 2012;7(6):e36466.

[24] Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Russell J, Tacket CO, Brotman RM, Davis CC, Ault K, Peralta L, Forney LJ. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 15;108 Suppl 1:4680-7.

[25] Walther-António MR, Jeraldo P, Berg Miller ME, Yeoman CJ, Nelson KE, Wilson BA, White BA, Chia N, Creedon DJ. Pregnancy's stronghold on the vaginal microbiome. *PLoS One*. 2014 Jun 4;9(6):e98514.

[26] Elizabeth A. Miller, DeAnna E. Beasley, Robert R. Dunn, Elizabeth A. Archie. Lactobacilli Dominance and Vaginal pH: Why Is the Human Vaginal Microbiome Unique?. *Front Microbiol*. 2016; 7: 1936.

[27] Stumpf RM, Wilson BA, Rivera A, Yildirim S., Yeoman CJ., Polk JD., et al. The primate vaginal microbiome: comparative context and implications for human health and disease. (2013). *Am.J.Phys.Anthropol*. 152,119–134.

[28] Ma ZS, Li L. Quantifying the human vaginal community state types (CSTs) with the species specificity index. PeerJ. 2017 Jun 27;5:e3366.

[29] Hammes W. P., Weiss N., Holzapel W. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*," in *The Prokaryotes*, 2nd Edn, 1992 Vol. 2, eds Balows A., Trüper H. G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K. H., editors. (Berlin: Springer Verlag;), 1536–1594

[30] Taverniti V., Guglielmetti S. Health-Promoting Properties of *Lactobacillus helveticus*. *Front Microbiol.* 2012; 3: 392.

6. Anexos

Sin anexos.