

COMPOSICIONES, MÉTODOS Y KITS PARA LA SELECCIÓN DE DONANTES Y RECEPTORES PARA LA FECUNDACIÓN IN VITRO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 **[0001]** La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de patente estadounidense n.º 62/910,802 presentada el 4 de octubre de 2019, cuya solicitud se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia.

ANTECEDENTES

- 10 **[0002]** La fecundación *in vitro* (FIV) y las técnicas de transferencia de embriones se usan comúnmente en la producción de crías de pequeños rumiantes, como la producción de terneros bovinos. La FIV tiene algunas ventajas sobre otros métodos de producción debido a la frecuencia con la que se pueden realizar las aspiraciones de FIV y la capacidad de aumentar la diversidad genética. Por ejemplo, las aspiraciones de FIV de vacas donantes se pueden realizar cada dos semanas y el semen de varios toros diferentes se puede usar para fecundar los ovocitos extraídos para producir una gran cantidad de crías de una sola vaca.
- 15 Si bien las técnicas de transferencia de embriones pueden producir alrededor de cinco o seis embriones por colección cada sesenta días, las extracciones de FIV pueden producir alrededor de 20 ovocitos por aspiración cada dos semanas, de los cuales alrededor del 30 % se convierten en embriones viables. En algunas circunstancias, la FIV se puede utilizar para producir más de 50 terneros de una vaca en un solo año. Además, las vacas donantes preñadas todavía se pueden usar para la extracción de ovocitos hasta
- 20 alrededor del día 100 al día 120 de preñez, lo que hace posible la extracción de ovocitos mientras se sigue produciendo descendencia de una vaca de gran valor.

- 25 **[0003]** Sin embargo, existen algunas desventajas con el uso de técnicas de FIV para la producción de crías de pequeños rumiantes. El procedimiento de FIV puede ser costoso y el método de aspiración de folículos utilizado para extraer ovocitos es un procedimiento invasivo que requiere un técnico capacitado.
- Además, incluso cuando se realizan correctamente, los embriones de FIV recién transferidos dan como resultado una tasa de preñez promedio de solo alrededor del 50 % para las vacas receptoras bien manejadas. De las transferencias que dan como resultado una preñez, entre aproximadamente 6 % hasta alrededor del 16 % de las preñeces se pierden. Por lo tanto, existe la necesidad de composiciones, métodos y kits para mejorar la tasa de éxito tanto del inicio de la preñez como de la conservación de la preñez
- 30 cuando se usa FIV para maximizar la eficacia de la producción de descendencia.

COMPENDIO DE LA INVENCION

[0004] De acuerdo con algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un método para emparejar un sujeto donante hembra y un sujeto receptor hembra para la fecundación *in vitro* que comprende las etapas de (1) obtener muestras microbianas de cada sujeto donante hembra y sujeto receptor hembra, en donde las muestras microbianas se obtienen de uno o más fluidos vaginales, uterinos y foliculares y/o superficiales; (2) identificar un perfil de microbioma para las muestras microbianas vaginales, uterinas y foliculares de cada sujeto donante hembra y de cada sujeto receptor hembra; y (3) obtener uno o más ovocitos u óvulos del sujeto hembra donante, fecundar uno o más ovocitos u óvulos mediante fecundación *in vitro* e implantar el embrión fecundado en el sujeto receptor hembra si el perfil del microbioma del sujeto donante hembra y el perfil del microbioma del sujeto receptor hembra indican una tasa elevada de inicio de preñez y una conservación elevada de la preñez a término.

[0005] En algunas modalidades, el perfil del microbioma folicular del sujeto donante hembra indica la calidad y competencia de un ovocito para la producción de embriones *in vitro*. En algunas modalidades, los perfiles de microbioma vaginal y uterino del sujeto receptor hembra indican un éxito elevado de preñez después de transferir el embrión al sujeto receptor hembra. En algunas modalidades, los perfiles de microbioma se generan mediante amplificación y secuenciación de ARN ribosómico. En algunas modalidades, los perfiles de microbioma comprenden taxonomía microbiana y abundancia microbiana relativa. En algunas modalidades, el sujeto donante hembra y el sujeto receptor hembra son pequeños rumiantes. En algunas modalidades, el pequeño rumiante se selecciona del grupo que consiste en vaca, ciervo, oveja, cabra y búfalo. En algunas modalidades, el perfil de microbioma del sujeto donante hembra y el perfil de microbioma del sujeto receptor hembra indican una tasa de inicio de preñez superior al 75 % y conservación de la preñez superior al 90 %.

[0006] De acuerdo con algunos aspectos, la presente descripción proporciona un método para generar una base de datos de microbiomas para emparejar un sujeto donante hembra y un sujeto receptor hembra para la fecundación *in vitro* que comprende las etapas de: (1) extraer muestras microbianas de una población de sujetos donantes hembras y una población de sujetos receptores hembras, en donde las muestras microbianas se obtienen de una o más de fluido vaginal, uterino y folicular y/o superficial; (2) identificar un perfil de microbioma de una o más muestras microbianas vaginales, uterinas y foliculares de cada sujeto de la población de sujetos donantes hembras y la población de sujetos receptores hembras; (3) obtener uno o más ovocitos u óvulos de uno o más sujetos en la población de sujetos donantes hembras, fecundar uno o más de los ovocitos u óvulos mediante fecundación *in vitro*, e implantar el embrión fecundado en uno o más sujetos de la población de sujetos receptores hembras; y (4) identificar una

asociación del perfil de microbioma, para una o más de las muestras microbianas vaginales, uterinas y foliculares de uno o más del sujeto donante hembra y el sujeto receptor hembra, con una tasa de éxito elevada de fecundación *in vitro*.

[0007] En algunas modalidades, el perfil del microbioma folicular del sujeto donante hembra indica la calidad y competencia de un ovocito para la producción de embriones *in vitro*. En algunas modalidades, los perfiles de microbioma vaginal y uterino del sujeto receptor hembra indican un éxito elevado de preñez después de transferir el embrión al sujeto receptor hembra. En algunas modalidades, los perfiles de microbioma se generan mediante amplificación y secuenciación de ARN ribosómico. En algunas modalidades, los perfiles de microbioma comprenden taxonomía microbiana y abundancia microbiana relativa. En algunas modalidades, se identifica un perfil de microbioma para una o más de las muestras microbianas vaginales, uterinas y foliculares para al menos 300 sujetos donantes hembras y al menos 300 sujetos receptores hembras. En algunas modalidades, el perfil de microbioma para una o más muestras microbianas vaginales, uterinas y foliculares se identifica para los sujetos donantes hembras y para los sujetos receptores hembras clasificados en uno o más intervalos de edad. En algunas modalidades, la población de sujetos donantes hembras y la población de sujetos receptores hembras son pequeños rumiantes. En algunas modalidades, el pequeño rumiante se selecciona del grupo que consiste en vaca, ciervo, oveja, cabra y búfalo.

[0008] De acuerdo con algunos aspectos, en la presente descripción se proporciona un método para mejorar la tasa de éxito de preñez por fecundación *in vitro* que comprende las etapas de (1) obtener muestras microbianas de uno o más sujetos donantes hembras y sujetos receptores hembras, en donde las muestras microbianas se obtienen de uno o más fluidos vaginales, uterinos, foliculares y/o superficiales; (2) identificar un perfil de microbioma para una o más de las muestras microbianas vaginales, uterinas y foliculares de uno o más de los sujetos donantes hembras y los sujetos receptores hembras; y (3) administrar una intervención a uno o más de los sujetos donantes hembras y los sujetos receptores hembras, en donde la intervención es eficaz para proporcionar a uno o más sujetos donantes hembras y sujetos receptores hembras un perfil de microbioma asociado a una tasa elevada de éxito de fecundación *in vitro*.

[0009] En algunas modalidades, la intervención se administra al sujeto donante hembra y es eficaz para proporcionar un perfil de microbioma del líquido folicular y/o superficial que se asocia con una calidad y competencia elevadas de los ovocitos para la producción de embriones *in vitro*. En algunas modalidades, la intervención se administra al sujeto receptor hembra y es eficaz para proporcionar un

perfil de microbioma del fluido vaginal y uterino y/o superficial que se asocia con un éxito elevado de preñez luego de la transferencia del embrión. En algunas modalidades, los perfiles de microbioma se generan mediante amplificación y secuenciación de ARN ribosómico. En algunas modalidades, los perfiles de microbioma comprenden taxonomía microbiana y abundancia microbiana relativa. En algunas modalidades, los sujetos donantes hembras y/o los sujetos receptores hembras son pequeños rumiantes. En algunas modalidades, el pequeño rumiante se selecciona del grupo que consiste en vaca, ciervo, oveja, cabra y búfalo. En algunas modalidades, la intervención es un antibiótico. En algunas modalidades, la intervención es uno o más microbios (por ejemplo, un probiótico). En algunas modalidades, la intervención es una composición nutricional no digerible que estimula selectivamente el crecimiento y la actividad de uno o más microbios beneficiosos para el hospedador (por ejemplo, un prebiótico). En algunas modalidades, la intervención se administra en la cavidad vaginal o uterina del sujeto donante hembra o el sujeto receptor hembra.

[0010] De acuerdo con algunos aspectos, la presente descripción proporciona un kit para emparejar un sujeto donante hembra y un sujeto receptor hembra para fecundación *in vitro* que comprende (1) una o más herramientas analíticas para determinar un perfil de microbioma de uno o más fluidos foliculares, vaginales y uterinos y/o superficiales del sujeto donante hembra y del sujeto receptor hembra; (2) un transmisor para comunicar/conectar una base de datos de uno o más perfiles de microbioma de uno o más fluidos foliculares, vaginales y uterinos y/o superficiales; (3) un dispositivo para comparar el perfil de microbioma de uno o más fluidos foliculares, vaginales y uterinos y/o superficiales del sujeto donante hembra y el sujeto receptor hembra con la base de datos de uno o más perfiles de microbioma para identificar qué sujetos donantes hembras y sujetos receptores hembras tienen perfiles de microbioma que indiquen tasas elevadas de éxito de fecundación *in vitro*; y (4) instrucciones para su uso.

[0011] En algunas modalidades, una o más de las herramientas analíticas para determinar un perfil de microbioma comprenden reactivos para la amplificación y la secuenciación del ARN ribosómico. En algunas modalidades, los perfiles de microbioma comprenden taxonomía microbiana y abundancia microbiana relativa. En algunas modalidades, los sujetos donantes hembras y/o los sujetos receptores hembras son pequeños rumiantes. En algunas modalidades, el pequeño rumiante se selecciona del grupo que consiste en vaca, ciervo, oveja, cabra y búfalo. En algunas modalidades, una o más de las herramientas analíticas comprenden un ensayo colorimétrico. En algunas modalidades, una o más de las herramientas analíticas comprenden un dispositivo de secuenciación.

[0012] En algunas modalidades, un método para seleccionar un sujeto donante hembra para la

fecundación *in vitro* que comprende las etapas de: (1) obtener muestras microbianas vaginales del sujeto donante hembra; (2) identificar un perfil de microbioma para las muestras microbianas vaginales del sujeto donante hembra; y (3) obtener uno o más ovocitos u óvulos del sujeto donante hembra para la fecundación *in vitro* cuando el perfil de microbioma para las muestras microbianas vaginales indique que el sujeto donante hembra producirá una gran cantidad de cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en ovocitos, óvulos y embriones.

[0013] Un método para generar una base de datos de microbioma para seleccionar un sujeto donante hembra para la fecundación *in vitro* que comprende las etapas de: (1) extraer muestras microbianas vaginales de una población de sujetos donantes hembras; (2) identificar un perfil de microbioma para las muestras microbianas vaginales de cada sujeto de la población de sujetos donantes hembras; (3) obtener ovocitos u óvulos de cada sujeto en la población de sujetos donantes hembras y hacer un conteo de la cantidad de cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en ovocitos, óvulos y embriones producidos; y (4) identificar una asociación del perfil de microbioma para las muestras microbianas vaginales con la producción de una cantidad elevada de cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en ovocitos, óvulos y embriones.

[0014] Un método para mejorar la tasa de éxito de la preñez por fecundación *in vitro* que comprende las etapas de: (1) obtener muestras microbianas vaginales de un sujeto donante hembra; (2) identificar un perfil de microbioma para las muestras microbianas vaginales; y (3) administrar una intervención al sujeto donante hembra, en donde la intervención es eficaz para proporcionar al sujeto donante hembra un perfil de microbioma asociado con una producción elevada de cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en ovocitos, óvulos y embriones.

[0015] Un kit para seleccionar un sujeto donante hembra para la fecundación *in vitro* que comprende: (1) una o más herramientas analíticas para determinar un perfil de microbioma de una muestra microbiana vaginal del sujeto donante hembra; (2) un transmisor para comunicar/conectar una base de datos de uno o más perfiles de microbiomas de muestras microbianas vaginales; (3) un dispositivo para comparar el perfil de microbioma de la muestra microbiana vaginal del sujeto donante hembra y con la base de datos de uno o más perfiles de microbioma para identificar qué sujetos donantes hembras tienen perfiles de microbioma que indiquen una producción elevada de cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en ovocitos, óvulos y embriones; y (4) instrucciones para su uso.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0016] El expediente de la patente o de la solicitud contiene al menos una figura a color. La Oficina proporcionará copias de esta publicación de solicitud de patente o patente con figuras a color previa solicitud y pago de la tasa necesaria.

[0017] En la Fig. 1 se muestra LEfSe a nivel de especie. El análisis discriminante lineal (LDA, por sus iniciales en inglés) combinado con las medidas del tamaño del efecto (LEfSe) reveló una lista de bacterias que permite la discriminación entre las donantes clasificadas como Bajas o Elevadas en las muestras de hisopados vaginales. Un valor de P de $< 0,05$ y una puntuación $\geq 2,0$ se consideraron significativos en las pruebas de Kruskal-Wallis y de Wilcoxon por parejas, respectivamente.

[0018] En las Fig. 2A-2D se muestra LEfSe adicional a nivel de especie. Histogramas con la abundancia relativa de comunidades bacterianas que se encontraron en muestras de hisopados vaginales, presentes en mayor cantidad en el grupo de donantes clasificadas como Bajas en relación con las hembras Elevadas. Un valor de P de $< 0,05$ y una puntuación $\geq 2,0$ se consideraron significativos en las pruebas de Kruskal-Wallis y de Wilcoxon por parejas, respectivamente. La línea recta horizontal en el panel indica las medias del grupo y la línea punteada indica las medianas del grupo. Las especies bacterianas representativas del grupo Bajo, que mostraron una cantidad mayor significativa desde el punto de vista estadístico que las hembras del grupo Elevado, fueron *Mogibacterium sin clasificar*, *Mobilibacterium sin clasificar*, *Planococcus sin clasificar* y *Salinicoccus sin clasificar*, presentes en los histogramas de las Fig. 2A-2D, respectivamente.

[0019] En las Fig. 3A-3D se muestra LEfSe adicional a nivel de especie. Histogramas con la abundancia relativa de comunidades bacterianas que se encontraron en muestras de hisopados vaginales, presentes en mayor cantidad en el grupo de donantes clasificadas como Elevadas en relación con las hembras Bajas. Un valor de P de $< 0,05$ y una puntuación $\geq 2,0$ se consideraron significativos en las pruebas de Kruskal-Wallis y de Wilcoxon por parejas, respectivamente. La línea recta horizontal en el panel indica las medias del grupo y la línea punteada indica las medianas del grupo. Las especies bacterianas representativas del grupo Elevado, que mostraron una cantidad mayor significativa desde el punto de vista estadístico que las hembras del grupo Bajo, fueron *Anaerofustis sin clasificar*, *Bacteriodaceae sin clasificar*, *Abiotrophia sin clasificar* y *Akkermansiaceae sin clasificar*, presentes en los histogramas de las Fig. 3A-3D, respectivamente.

[0020] En las Fig. 4A-4D se muestra LEfSe adicional a nivel de especie. Histogramas con la abundancia relativa de comunidades bacterianas que se encontraron en muestras de hisopados vaginales, presentes en mayor cantidad en el grupo de donantes clasificadas como Elevadas en relación con las

hembras Bajas. Un valor de P de $< 0,05$ y una puntuación $\geq 2,0$ se consideraron significativos en las pruebas de Kruskal-Wallis y de Wilcoxon por parejas, respectivamente. La línea recta horizontal en el panel indica las medias del grupo y la línea punteada indica las medianas del grupo. Las especies bacterianas representativas del grupo Elevado, que mostraron una cantidad mayor significativa desde el punto de vista estadístico que las hembras del grupo Bajo, fueron *Liberibacter sin clasificar*, *Halomonas sin clasificar*, *Exiguobacterium sin clasificar* y *Gemmatirosa sin clasificar*, presentes en los histogramas de las Fig. 4A-4D, respectivamente.

[0021] En las Fig. 5A-5D se muestra LEfSe adicional a nivel de especie. Histogramas con la abundancia relativa de comunidades bacterianas que se encontraron en muestras de hisopados vaginales, presentes en mayor cantidad en el grupo de donantes clasificadas como Elevadas en relación con las hembras Bajas. Un valor de P de $< 0,05$ y una puntuación $\geq 2,0$ se consideraron significativos en las pruebas de Kruskal-Wallis y de Wilcoxon por parejas, respectivamente. La línea recta horizontal en el panel indica las medias del grupo y la línea punteada indica las medianas del grupo. Las especies bacterianas representativas del grupo Elevado, que mostraron una cantidad mayor significativa desde el punto de vista estadístico que las hembras del grupo Bajo, fueron *Pseudomonas litoralis*, *Prodoshia sp D12*, *Oscillatoriohyphaceae unclassified* y *Negativibacillus massiliensis*, presentes en los histogramas de las Fig. 5A-5D, respectivamente.

[0022] En las Fig. 6A-6C se muestra LEfSe adicional a nivel de especie. Histogramas con la abundancia relativa de comunidades bacterianas que se encontraron en muestras de hisopados vaginales, presentes en mayor cantidad en el grupo de donantes clasificadas como Elevadas en relación con las hembras Bajas. Un valor de P de $< 0,05$ y una puntuación $\geq 2,0$ se consideraron significativos en las pruebas de Kruskal-Wallis y de Wilcoxon por parejas, respectivamente. La línea recta horizontal en el panel indica las medias del grupo y la línea punteada indica las medianas del grupo. Las especies bacterianas representativas del grupo Elevado, que mostraron una cantidad mayor significativa desde el punto de vista estadístico que las hembras del grupo Bajo, fueron *Ruminiclostridium sin clasificar*, *Suicoccus sin clasificar*, *Pseudomonas saudiensis*, presentes en los histogramas de las Fig. 6A-6C, respectivamente.

[0023] En la Fig. 7 se muestra una serie de etapas para la extracción de muestras de líquido folicular según algunas modalidades descritas en la presente.

[0024] En la Fig. 8 se muestra una serie de etapas para la extracción de muestras uterinas/vaginales según algunas modalidades descritas en la presente.

[0025] En la Fig. 9 se muestra un flujo de trabajo para analizar muestras foliculares, vaginales y/o uterinas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0026] La presente descripción proporciona composiciones, métodos y kits para la selección de sujetos donantes y sujetos receptores para la fecundación in vitro. De acuerdo con algunos aspectos, la presente descripción proporciona un método que utiliza una base de datos de perfiles de microbioma de líquido folicular, tejido vaginal y tejido uterino para la selección complementaria de donantes y receptores hembras para mejorar la eficiencia de la fecundación in vitro.

[0027] De acuerdo con algunos aspectos, la presente descripción proporciona un método para emparejar un sujeto donante hembra y un sujeto receptor hembra para la fecundación *in vitro* que comprende la etapa de obtener muestras microbianas de cada sujeto donante hembra y cada sujeto receptor hembra. En algunas modalidades, las muestras microbianas se obtienen de uno o más fluidos vaginales, uterinos y foliculares y/o superficiales. En algunas modalidades, el método comprende además la etapa de identificar un perfil de microbioma para las muestras microbianas vaginales, uterinas y foliculares de cada sujeto donante hembra y cada sujeto receptor hembra. En algunas modalidades, los perfiles de microbioma se generan mediante secuenciación del ARN ribosómico (ARNr) de las muestras microbianas. Por ejemplo, los perfiles microbianos pueden generarse al secuenciar el gen del ARN ribosómico 16S. En algunas modalidades, el ARNr secuenciado se usa para la clasificación taxonómica, como filo, orden, clase, familia, género y especie. En algunas modalidades, el ARNr secuenciado se cuantifica para determinar la abundancia relativa de microbios presentes en las muestras microbianas. En algunas modalidades, el ARNr se amplifica por PCR antes de la secuenciación.

[0028] De acuerdo con algunas modalidades, los perfiles de microbioma obtenidos del sujeto donante y/o el sujeto receptor se comparan con una base de datos de perfiles de microbiomas. En algunas modalidades, si el perfil del microbioma del sujeto donante y el sujeto receptor está asociado con una tasa elevada de inicio de la preñez y una conservación elevada de la preñez a término, entonces se obtienen uno o más ovocitos u óvulos del sujeto donante, se fecundan por fecundación in vitro, y se implantan en el sujeto receptor.

[0029] En algunas modalidades, el perfil del microbioma folicular del sujeto donante hembra indica la calidad y competencia de un ovocito para la producción de embriones in vitro. En algunas modalidades, los perfiles de microbioma vaginal y uterino del sujeto receptor hembra indican un éxito elevado de preñez después de transferir el embrión al sujeto receptor hembra.

[0030] En algunas modalidades, el sujeto donante hembra y el sujeto receptor hembra son pequeños rumiantes. Como se usa en la presente, «rumiante» significa cualquier mamífero que rumia el alimento regurgitado de su rumen, tal como vacas, ciervos, antílopes, ovejas, cabras y búfalos y sus parientes. En algunas modalidades, el pequeño rumiante se selecciona del grupo que consiste en vaca, 5 ciervo, antílope, oveja, cabra y búfalo. En algunas modalidades, el sujeto donante hembra y el sujeto receptor hembra son animales ungulados. Como se usa en la presente, «animal ungulado» significa cualquier mamífero con pezuñas. A modo de ejemplo no taxativo, los animales ungulados incluyen ungulados de dedos impares como caballos y rinocerontes, y ungulados de dedos pares como vacas, cerdos, jirafas, camellos, ciervos e hipopótamos, así como subungulados como elefantes. En algunas 10 modalidades, los sujetos donantes hembras y los sujetos receptores hembras pueden ser de cualquier edad.

[0031] En algunas modalidades, el perfil de microbioma del sujeto donante hembra y el perfil de microbioma del sujeto receptor hembra indican una tasa de inicio de preñez superior al 50 %. En algunas modalidades, el perfil de microbioma del sujeto donante hembra y el perfil de microbioma del sujeto receptor hembra indican una tasa de inicio de preñez superior al 55 %. En algunas modalidades, el perfil 15 de microbioma del sujeto donante hembra y el perfil de microbioma del sujeto receptor hembra indican una tasa de inicio de preñez superior al 60 %. En algunas modalidades, el perfil de microbioma del sujeto donante hembra y el perfil de microbioma del sujeto receptor hembra indican una tasa de inicio de preñez superior al 65 %. En algunas modalidades, el perfil de microbioma del sujeto donante hembra y el perfil de microbioma del sujeto receptor hembra indican una tasa de inicio de preñez superior al 70 %. En 20 algunas modalidades, el perfil de microbioma del sujeto donante hembra y el perfil de microbioma del sujeto receptor hembra indican una tasa de inicio de preñez superior al 75 %. En algunas modalidades, el perfil de microbioma del sujeto donante hembra y el perfil de microbioma del sujeto receptor hembra indican una tasa de inicio de preñez superior al 80 %. En algunas modalidades, el perfil de microbioma del sujeto donante hembra y el perfil de microbioma del sujeto receptor hembra indican una tasa de inicio 25 de preñez superior al 85 %. En algunas modalidades, el perfil de microbioma del sujeto donante hembra y el perfil de microbioma del sujeto receptor hembra indican una tasa de inicio de preñez superior al 90 %.

[0032] En algunas modalidades, el perfil de microbioma del sujeto donante hembra y el perfil de microbioma del sujeto receptor hembra indican una tasa de conservación de la preñez superior al 50 %. En algunas modalidades, el perfil de microbioma del sujeto donante hembra y el perfil de microbioma del 30 sujeto receptor hembra indican una tasa de conservación de la preñez superior al 55 %. En algunas modalidades, el perfil de microbioma del sujeto donante hembra y el perfil de microbioma del sujeto

receptor hembra indican una tasa de conservación de la preñez superior al 60 %. En algunas modalidades, el perfil de microbioma del sujeto donante hembra y el perfil de microbioma del sujeto receptor hembra indican una tasa de conservación de la preñez superior al 65%. En algunas modalidades, el perfil de microbioma del sujeto donante hembra y el perfil de microbioma del sujeto receptor hembra indican una

5 tasa de conservación de la preñez superior al 70 %. En algunas modalidades, el perfil de microbioma del sujeto donante hembra y el perfil de microbioma del sujeto receptor hembra indican una tasa de conservación de la preñez superior al 75 %. En algunas modalidades, el perfil de microbioma del sujeto donante hembra y el perfil de microbioma del sujeto receptor hembra indican una tasa de conservación de la preñez superior al 80 %. En algunas modalidades, el perfil de microbioma del sujeto donante hembra y

10 el perfil de microbioma del sujeto receptor hembra indican una tasa de conservación de la preñez superior al 85 %. En algunas modalidades, el perfil de microbioma del sujeto donante hembra y el perfil de microbioma del sujeto receptor hembra indican una tasa de conservación de la preñez superior al 90 %. En algunas modalidades, el perfil de microbioma del sujeto donante hembra y el perfil de microbioma del sujeto receptor hembra indican una tasa de conservación de la preñez superior al 95 %. En algunas

15 modalidades, el perfil de microbioma del sujeto donante hembra y el perfil de microbioma del sujeto receptor hembra indican una tasa de conservación de la preñez superior al 99 %.

[0033] En algunas modalidades, el perfil del microbioma del sujeto donante hembra indica que el sujeto donante hembra generará un mayor número de embriones después de la fecundación del ovocito. En algunas modalidades, el perfil del microbioma del sujeto donante hembra indica que el sujeto donante

20 hembra generará al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90, o al menos 100 embriones en promedio por tanda de FIV.

[0034] De acuerdo con algunos aspectos, la presente divulgación también proporciona un método

25 para generar una base de datos de microbioma para emparejar un sujeto donante hembra y un sujeto receptor hembra para la fecundación *in vitro*. En algunas modalidades, la base de datos es una colección de información de secuencias (por ejemplo, información de secuencias de ARNr) que está organizada de manera que se pueda acceder, actualizar y comparar fácilmente con otras secuencias, como una base de datos informática. En algunas modalidades, la información de secuencias en la base de datos se obtiene

30 al extraer muestras microbianas de una población de sujetos donantes hembras y una población de sujetos receptores hembras, en donde las muestras microbianas se obtienen de uno o más fluidos vaginales,

uterinos y foliculares y/o superficiales. En algunas modalidades, la información de secuencias se asocia con microbios de las muestras microbianas y se organiza en un perfil de microbioma.

[0035] En algunas modalidades, el método para generar una base de datos de microbioma para emparejar un sujeto donante hembra y un sujeto receptor hembra comprende además la etapa de identificar un perfil de microbioma para una o más de las muestras microbianas vaginales, uterinas y foliculares de cada sujeto de la población de sujetos donantes hembras y de la población de sujetos receptores hembras. En algunas modalidades, se identifica un perfil de microbioma para una o más de las muestras microbianas vaginales, uterinas y foliculares para al menos 25 sujetos donantes hembras y al menos 25 sujetos receptores hembras. En algunas modalidades, se identifica un perfil de microbioma para una o más de las muestras microbianas vaginales, uterinas y foliculares para al menos 50 sujetos donantes hembras y al menos 50 sujetos receptores hembras. En algunas modalidades, se identifica un perfil de microbioma para una o más de las muestras microbianas vaginales, uterinas y foliculares para al menos 75 sujetos donantes hembras y al menos 75 sujetos receptores hembras. En algunas modalidades, se identifica un perfil de microbioma para una o más de las muestras microbianas vaginales, uterinas y foliculares para al menos 100 sujetos donantes hembras y al menos 100 sujetos receptores hembras. En algunas modalidades, se identifica un perfil de microbioma para una o más de las muestras microbianas vaginales, uterinas y foliculares para al menos 150 sujetos donantes hembras y al menos 150 sujetos receptores hembras. En algunas modalidades, se identifica un perfil de microbioma para una o más de las muestras microbianas vaginales, uterinas y foliculares para al menos 200 sujetos donantes hembras y al menos 200 sujetos receptores hembras. En algunas modalidades, se identifica un perfil de microbioma para una o más de las muestras microbianas vaginales, uterinas y foliculares para al menos 300 sujetos donantes hembras y al menos 300 sujetos receptores hembras.

[0036] En algunas modalidades, el método para generar una base de datos de microbioma para emparejar un sujeto donante hembra y un sujeto receptor hembra comprende además la etapa de obtener uno o más ovocitos u óvulos de uno o más sujetos en la población de sujetos donantes hembras, fecundar el uno o más ovocitos u óvulos mediante fecundación *in vitro*, e implantar el embrión fecundado en uno o más sujetos de la población de sujetos receptores hembras y luego identificar una asociación de los perfiles de microbioma con una tasa elevada de éxito de fecundación *in vitro*.

[0037] En algunas modalidades, el perfil del microbioma folicular del sujeto donante hembra indica la calidad y competencia de un ovocito para la producción de embriones *in vitro*. En algunas modalidades, los perfiles de microbioma vaginal y uterino del sujeto receptor hembra indican un éxito

elevado de preñez después de transferir el embrión al sujeto receptor hembra. En algunas modalidades, el perfil de microbioma para una o más muestras microbianas vaginales, uterinas y foliculares se identifica para los sujetos donantes hembras y para los sujetos receptores hembras clasificados en uno o más intervalos de edad.

5 **[0038]** De acuerdo con algunos aspectos, la presente descripción proporciona un método para mejorar la tasa de éxito de preñez por fecundación *in vitro*. En algunas modalidades, el método comprende las etapas de obtener muestras microbianas de uno o más sujetos donantes hembras y sujetos receptores hembras, en donde las muestras microbianas se obtienen de uno o más fluidos vaginales, uterinos, foliculares y/o superficiales; identificar un perfil de microbioma para una o más de las muestras
10 microbianas vaginales, uterinas y foliculares de uno o más de los sujetos donantes hembras y los sujetos receptores hembras; y administrar una intervención a uno o más de los sujetos donantes hembras y los sujetos receptores hembras, en donde la intervención es eficaz para proporcionar a uno o más sujetos donantes hembras y sujetos receptores hembras un perfil de microbioma asociado a una tasa elevada de éxito de fecundación *in vitro*.

15 **[0039]** En algunas modalidades, la tasa de éxito de preñez por fecundación *in vitro* se mide por el inicio de la preñez. En algunas modalidades, la tasa de éxito de la fecundación *in vitro* es un inicio de preñez mayor que el 50 %. En algunas modalidades, la tasa de éxito de la fecundación *in vitro* es un inicio de preñez mayor que el 55 %. En algunas modalidades, la tasa de éxito de la fecundación *in vitro* es un inicio de preñez mayor que el 60 %. En algunas modalidades, la tasa de éxito de la fecundación *in vitro*
20 es un inicio de preñez mayor que el 65 %. En algunas modalidades, la tasa de éxito de la fecundación *in vitro* es un inicio de preñez mayor que el 70 %. En algunas modalidades, la tasa de éxito de la fecundación *in vitro* es un inicio de preñez mayor que el 75 %. En algunas modalidades, la tasa de éxito de la fecundación *in vitro* es un inicio de preñez mayor que el 80 %. En algunas modalidades, la tasa de éxito de la fecundación *in vitro* es un inicio de preñez mayor que el 85 %. En algunas modalidades, la tasa de
25 éxito de la fecundación *in vitro* es un inicio de preñez mayor que el 90 %.

[0040] En algunas modalidades, la tasa de éxito de la fecundación *in vitro* se mide con la conservación de la preñez a término. En algunas modalidades, la tasa de éxito de la fecundación *in vitro* es la conservación de la preñez a una tasa mayor que el 50 %. En algunas modalidades, la tasa de éxito de la fecundación *in vitro* es la conservación de la preñez a una tasa mayor que el 55 %. En algunas
30 modalidades, la tasa de éxito de la fecundación *in vitro* es la conservación de la preñez a una tasa mayor que el 60 %. En algunas modalidades, la tasa de éxito de la fecundación *in vitro* es la conservación de la

preñez a una tasa mayor que el 65 %. En algunas modalidades, la tasa de éxito de la fecundación in vitro es la conservación de la preñez a una tasa mayor que el 70 %. En algunas modalidades, la tasa de éxito de la fecundación in vitro es la conservación de la preñez a una tasa mayor que el 75 %. En algunas modalidades, la tasa de éxito de la fecundación in vitro es la conservación de la preñez a una tasa mayor que el 80 %. En algunas modalidades, la tasa de éxito de la fecundación in vitro es la conservación de la preñez a una tasa mayor que el 85 %. En algunas modalidades, la tasa de éxito de la fecundación in vitro es la conservación de la preñez a una tasa mayor que el 90 %. En algunas modalidades, la tasa de éxito de la fecundación in vitro es la conservación de la preñez a una tasa mayor que el 95 %. En algunas modalidades, la tasa de éxito de la fecundación in vitro es la conservación de la preñez a una tasa mayor que el 99 %.

[0041] En algunas modalidades, la intervención utilizada para aumentar la tasa de éxito de la fecundación in vitro es uno o más de un probiótico, prebiótico o antibiótico. En algunas modalidades, la intervención se administra directamente a uno o más folículos, vagina y útero del sujeto donante y/o receptor. En algunas modalidades, la intervención se administra al sujeto donante hembra y es eficaz para proporcionar un perfil de microbioma del líquido folicular y/o superficial que se asocia con una calidad y competencia elevadas de los ovocitos para la producción de embriones *in vitro*. En algunas modalidades, la intervención se administra al sujeto receptor hembra y es eficaz para proporcionar un perfil de microbioma del fluido vaginal y uterino y/o superficial que se asocia con un éxito elevado de preñez luego de la transferencia del embrión.

[0042] De acuerdo con algunos aspectos, la presente divulgación también proporciona un kit para emparejar un sujeto donante hembra y un sujeto receptor hembra para la fecundación *in vitro*. En algunas modalidades, el kit comprende una o más herramientas analíticas para determinar un perfil de microbioma de uno o más fluidos foliculares, vaginales y uterinos y/o superficiales del sujeto donante hembra y del sujeto receptor hembra. En algunas modalidades, una o más de las herramientas analíticas para determinar un perfil de microbioma comprenden un aparato y/o reactivos para la amplificación y/o la secuenciación del ARN ribosómico. En algunas modalidades, una o más de las herramientas analíticas comprenden un dispositivo portátil en tiempo real para la secuenciación de nucleótidos y reactivos para su uso.

[0043] En algunas modalidades, el kit comprende además un transmisor para comunicar/conectar una base de datos de uno o más perfiles de microbioma a un dispositivo para comparar el perfil de microbioma del sujeto donante hembra y del sujeto receptor hembra con la base de datos de uno o más perfiles de microbioma para identificar qué sujetos donantes hembras y qué sujetos receptores hembras

tienen perfiles de microbioma que indiquen una tasa elevada de éxito de la fecundación *in vitro*.

[0044] En algunas modalidades, el kit comprende una base de datos con una colección de información de secuencias (por ejemplo, información de secuencias de ARNr) que está organizada de manera que se pueda acceder, actualizar y comparar fácilmente con otras secuencias, tal como una base de datos informática. En algunas modalidades, la información de secuencias en la base de datos se obtiene al extraer muestras microbianas de una población de sujetos donantes hembras y una población de sujetos receptores hembras, en donde las muestras microbianas se obtienen de uno o más fluidos vaginales, uterinos y foliculares y/o superficiales. En algunas modalidades, la información de secuencias se asocia con microbios de las muestras microbianas y se organiza en un perfil de microbioma. En algunas modalidades, el transmisor que se va a comunicar/conectar con una base de datos es por cable o inalámbrica. En algunas modalidades, el kit comprende además instrucciones para su uso.

[0045] De acuerdo con algunos aspectos, la presente descripción proporciona un método para seleccionar un sujeto donante hembra para la fecundación *in vitro* que comprende las etapas de: (1) obtener muestras microbianas vaginales del sujeto donante hembra; (2) identificar un perfil de microbioma para las muestras microbianas vaginales del sujeto donante hembra; y (3) obtener uno o más ovocitos u óvulos del sujeto donante hembra para la fecundación *in vitro* cuando el perfil de microbioma para las muestras microbianas vaginales indique que el sujeto donante hembra producirá una gran cantidad de cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en ovocitos, óvulos y embriones.

[0046] En algunas modalidades, el perfil del microbioma vaginal del sujeto donante hembra está asociado a una producción promedio de más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en ovocitos, óvulos y embriones. En algunas modalidades, los perfiles de microbioma se generan mediante amplificación y secuenciación de ARN ribosómico. En algunas modalidades, los perfiles de microbioma comprenden taxonomía microbiana y abundancia microbiana relativa. En algunas modalidades, el sujeto donante hembra es un rumiante pequeño. En algunas modalidades, el pequeño rumiante se selecciona del grupo que consiste en vaca, ciervo, oveja, cabra y búfalo.

[0047] En algunas modalidades, el perfil de microbioma que indica que el sujeto donante hembra produce una gran cantidad de cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en ovocitos, óvulos y embriones, comprende una abundancia relativa más baja de uno o más integrantes del género *Mogibacterium*, *Mobilibacterium*, *Planococcus* y *Salinicoccus*; y/o una mayor abundancia relativa de uno o más géneros de *Anaerofustis*, *Bacteriodaceae*, *Abiotrophia*, *Akkermansiaceae*, *Liberibacter*,

Halomonas, *Exiguobacterium*, *Gemmatirosa*, *Pseudomonas*, *Prodoshia*, *Oscillatoriohaptophyceae*, *Negativibacillus*, *Ruminiclostridium*, *Suicoccus* y *Pseudomonas*. Las abundancias relativas de microbios se pueden determinar, según ciertas modalidades, mediante análisis discriminante lineal (LDA) combinado con mediciones de tamaño efectivo (LEfSe), como se describe en la presente. Por ejemplo, en una modalidad, el perfil de microbioma que indica que el sujeto donante hembra produce una mayor cantidad de cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en ovocitos, óvulos y embriones es aquel en el que faltan uno o más integrantes del género *Mogibacterium*, *Mobilibacterium*, *Planococcus* y *Salinicoccus*; y/o que tiene presente uno o más del género *Anaerofustis*, *Bacteroidaceae*, *Abiotrophia*, *Akkermansiaceae*, *Liberibacter*, *Halomonas*, *Exiguobacterium*, *Gemmatirosa*, *Pseudomonas*, *Prodoshia*, *Oscillatoriohaptophyceae*, *Negativibacillus*, *Ruminiclostridium*, *Suicoccus* y *Pseudomonas*.

[0048] En algunas modalidades, el perfil de microbioma que indica que el sujeto donante hembra produce una gran cantidad de cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en ovocitos, óvulos y embriones, comprende una abundancia relativa más baja de uno o más de *Mogibacterium*, *Mobilibacterium*, *Planococcus* y *Salinicoccus* sin clasificar; y/o una mayor abundancia relativa de uno o más de *Anaerofustis*, *Bacteroidaceae*, *Abiotrophia*, *Akkermansiaceae*, *Liberibacter*, *Halomonas*, *Exiguobacterium*, *Gemmatirosa*, *Pseudomonas litoralis*, *Prodoshia* sp D12, *Oscillatoriohaptophyceae*, *Negativibacillus massiliensis*, *Ruminiclostridium*, *Suicoccus* y *Pseudomonas saudiensis*. Por ejemplo, en algunas modalidades, el perfil de microbioma que indica que el sujeto donante hembra produce una gran cantidad de cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en ovocitos, óvulos y embriones es aquel que carece de uno o más de *Mogibacterium*, *Mobilibacterium*, *Planococcus* y *Salinicoccus* sin clasificar; y/o que tiene presente uno o más de *Anaerofustis*, *Bacteroidaceae*, *Abiotrophia*, *Akkermansiaceae*, *Liberibacter*, *Halomonas*, *Exiguobacterium*, *Gemmatirosa*, *Pseudomonas litoralis*, *Prodoshia* sp D12, *Oscillatoriohaptophyceae*, *Negativibacillus massiliensis*, *Ruminiclostridium*, *Suicoccus* y *Pseudomonas saudiensis*.

[0049] De acuerdo con algunos aspectos, la presente descripción proporciona un método para generar una base de datos de microbioma para seleccionar un sujeto donante hembra para fecundación *in vitro* que comprende las etapas de (1) extraer muestras microbianas vaginales de una población de sujetos donantes hembras; (2) identificar un perfil de microbioma para las muestras microbianas vaginales de cada sujeto de la población de sujetos donantes hembras; (3) obtener ovocitos u óvulos de cada sujeto en la población de sujetos donantes hembras y hacer un conteo de la cantidad de cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en ovocitos, óvulos y embriones producidos; y (4) identificar una

asociación del perfil de microbioma para las muestras microbianas vaginales con la producción de una cantidad elevada de cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en ovocitos, óvulos y embriones. En algunas modalidades, el perfil del microbioma vaginal del sujeto donante hembra está asociado a una producción promedio de más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en ovocitos, óvulos y embriones. En algunas modalidades, los perfiles de microbioma se generan mediante amplificación y secuenciación de ARN ribosómico. En algunas modalidades, los perfiles de microbioma comprenden taxonomía microbiana y abundancia microbiana relativa. En algunas modalidades, el sujeto donante hembra es un rumiante pequeño. En algunas modalidades, el pequeño rumiante se selecciona del grupo que consiste en vaca, ciervo, oveja, cabra y búfalo. En algunas modalidades, el perfil de microbioma que indica que el sujeto donante hembra produce una gran cantidad de cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en ovocitos, óvulos y embriones comprende una abundancia relativa más baja de uno o más integrantes del género *Mogibacterium*, *Mobilibacterium*, *Planococcus* *Salinicoccus*; y/o una mayor abundancia relativa de uno o más del género *Anaerofustis*, *Bacteriodaceae*, *Abiotrophia*, *Akkermansiaceae*, *Liberibacter*, *Halomonas*, *Exiguobacterium*, *Gemmatirosa*, *Pseudomonas*, *Prodoshia*, *Oscillatoriohyphycideae*, *Negativibacillus*, *Ruminiclostridium*, *Suicoccus* *Pseudomonas*. En algunas modalidades, el perfil de microbioma que indica que el sujeto donante hembra produce una gran cantidad de cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en ovocitos, óvulos y embriones comprende una abundancia relativa más baja de uno o más de *Mogibacterium*, *Mobilibacterium*, *Planococcus* *Salinicoccus* sin clasificar; y/o una mayor abundancia relativa de uno o más de *Anaerofustis*, *Bacteriodaceae*, *Abiotrophia*, *Akkermansiaceae*, *Liberibacter*, *Halomonas*, *Exiguobacterium*, *Gemmatirosa*, *Pseudomonas* *litoralis*, *Prodoshia* sp D12, *Oscillatoriohyphycideae*, *Negativibacillus* *massiliensis*, *Ruminiclostridium*, *Suicoccus* *Pseudomonas* *saudimassiliensis*.

[0050] De acuerdo con algunos aspectos, la presente descripción proporciona un método para mejorar la tasa de éxito de la preñez por fecundación *in vitro* que comprende las etapas de (1) obtener muestras microbianas vaginales de un sujeto donante hembra; (2) identificar un perfil de microbioma para las muestras microbianas vaginales; y (3) administrar una intervención al sujeto donante hembra, en donde la intervención es eficaz para proporcionar al sujeto donante hembra un perfil de microbioma asociado a una producción elevada de cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en ovocitos, óvulos y embriones.

[0051] En algunas modalidades, el perfil del microbioma vaginal del sujeto donante hembra está

asociado a una producción promedio de más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en ovocitos, óvulos y embriones. En algunas modalidades, los perfiles de microbioma se generan mediante amplificación y secuenciación de ARN ribosómico. En algunas modalidades, los perfiles de microbioma comprenden taxonomía microbiana y abundancia microbiana relativa. En algunas modalidades, el sujeto donante hembra es un rumiante pequeño. En algunas modalidades, el pequeño rumiante se selecciona del grupo que consiste en vaca, ciervo, oveja, cabra y búfalo.

[0052] En algunas modalidades, el perfil de microbioma que indica que el sujeto donante hembra produce una gran cantidad de cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en ovocitos, óvulos y embriones, comprende una abundancia relativa más baja de uno o más integrantes del género *Mogibacterium*, *Mobilibacterium*, *Planococcus* *Salinicoccus*; y/o una mayor abundancia relativa de uno o más géneros de *Anaerofustis*, *Bacteriodaceae*, *Abiotrophia*, *Akkermansiaceae*, *Liberibacter*, *Halomonas*, *Exiguobacterium*, *Gemmatirosa*, *Pseudomonas*, *Prodoshia*, *Oscillatoriophycideae*, *Negativibacillus*, *Ruminiclostridium*, *Suicoccus* *Pseudomonas*. En algunas modalidades, el perfil de microbioma que indica que el sujeto donante hembra produce una gran cantidad de cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en ovocitos, óvulos y embriones, comprende una abundancia relativa más baja de uno o más de *Mogibacterium*, *Mobilibacterium*, *Planococcus* *Salinicoccus sin clasificar*; y/o una mayor abundancia relativa de uno o más de *Anaerofustis*, *Bacteriodaceae*, *Abiotrophia*, *Akkermansiaceae*, *Liberibacter*, *Halomonas*, *Exiguobacterium*, *Gemmatirosa*, *Pseudomonas litoralis*, *Prodoshia sp D12*, *Oscillatoriophycideae*, *Negativibacillus massiliensis*, *Ruminiclostridium*, *Suicoccus* *Pseudomonas saudimassiliensis*.

[0053] En algunas modalidades, la intervención es un antibiótico. En algunas modalidades, la intervención es uno o más microbios. En algunas modalidades, la intervención es un prebiótico. En algunas modalidades, la intervención se administra en la cavidad vaginal del sujeto donante hembra. En algunas modalidades, la intervención es uno o más microbios que comprenden uno o más de *Anaerofustis*, *Bacteriodaceae*, *Abiotrophia*, *Akkermansiaceae*, *Liberibacter*, *Halomonas*, *Exiguobacterium*, *Gemmatirosa*, *Pseudomonas litoralis*, *Prodoshia sp D12*, *Oscillatoriophycideae*, *Negativibacillus massiliensis*, *Ruminiclostridium*, *Suicoccus* y *Pseudomonas saudimassiliensis*. En algunas modalidades, la intervención es eficaz para disminuir la abundancia relativa de uno o más de *Mogibacterium*, *Mobilibacterium*, *Planococcus* y *Salinicoccus sin clasificar* y es eficaz para aumentar la abundancia relativa de uno o más de *Anaerofustis*, *Bacteriodaceae*, *Abiotrophia*, *Akkermansiaceae*, *Liberibacter*,

Halomonas, *Exiguobacterium*, *Gemmatirosa*, *Pseudomonas litoralis*, *Prodoshia* sp D12, *Oscillatoriothricaceae*, *Negativibacillus massiliensis*, *Ruminiclostridium*, *Suicoccus* y *Pseudomonas saudiensis*.

[0054] De acuerdo con algunos aspectos, la presente descripción proporciona un kit para
5 seleccionar un sujeto donante hembra para la fecundación in vitro que comprende: (1) una o más
herramientas analíticas para determinar un perfil de microbioma de una muestra microbiana vaginal del
sujeto donante hembra; (2) un transmisor para comunicar/conectar una base de datos de uno o más perfiles
de microbiomas de muestras microbianas vaginales; (3) un dispositivo para comparar el perfil de
microbioma de la muestra microbiana vaginal del sujeto donante hembra y con la base de datos de uno o
10 más perfiles de microbioma para identificar qué sujetos donantes hembras tienen perfiles de microbioma
que indiquen una producción elevada de ovocitos u óvulos; y (4) instrucciones para su uso. En algunas
modalidades, el perfil del microbioma vaginal del sujeto donante hembra está asociado a una producción
promedio de más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en
ovocitos, óvulos y embriones. En algunas modalidades, los perfiles de microbioma se generan mediante
15 amplificación y secuenciación de ARN ribosómico. En algunas modalidades, los perfiles de microbioma
comprenden taxonomía microbiana y abundancia microbiana relativa. En algunas modalidades, el sujeto
donante hembra es un rumiante pequeño. En algunas modalidades, el pequeño rumiante se selecciona del
grupo que consiste en vaca, ciervo, oveja, cabra y búfalo.

[0055] En algunas modalidades, el perfil de microbioma que indica que el sujeto donante hembra
20 produce una gran cantidad de cualquiera de los seleccionados del grupo que consiste en ovocitos, óvulos
y embriones, comprende una abundancia relativa más baja de uno o más integrantes del género
Mogibacterium, *Mobilibacterium*, *Planococcus* *Salinicoccus*; y/o una mayor abundancia relativa de uno
o más géneros de *Anaerofustis*, *Bacteriodaceae*, *Abiotrophia*, *Akkermansiaceae*, *Liberibacter*,
Halomonas, *Exiguobacterium*, *Gemmatirosa*, *Pseudomonas*, *Prodoshia*, *Oscillatoriothricaceae*,
25 *Negativibacillus*, *Ruminiclostridium*, *Suicoccus* *Pseudomonas*. En algunas modalidades, el perfil de
microbioma que indica que el sujeto donante hembra produce una gran cantidad de cualquiera de los
seleccionados del grupo que consiste en ovocitos, óvulos y embriones, comprende una abundancia relativa
más baja de uno o más de *Mogibacterium*, *Mobilibacterium*, *Planococcus* *Salinicoccus* sin clasificar;
y/o una mayor abundancia relativa de uno o más de *Anaerofustis*, *Bacteriodaceae*, *Abiotrophia*,
30 *Akkermansiaceae*, *Liberibacter*, *Halomonas*, *Exiguobacterium*, *Gemmatirosa*, *Pseudomonas litoralis*,
Prodoshia sp D12, *Oscillatoriothricaceae*, *Negativibacillus massiliensis*, *Ruminiclostridium*, *Suicoccus*

Pseudomonas saudiensis.

[0056] En algunas modalidades, una o más de las herramientas analíticas comprenden un ensayo colorimétrico. En algunas modalidades, una o más de las herramientas analíticas comprenden un dispositivo de secuenciación.

- 5 [0057] Se presentan los siguientes ejemplos para ilustrar adicionalmente determinados aspectos de la presente invención. Estos ejemplos son meramente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención de forma alguna.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

10 **Materiales y métodos**

[0058] *Animales y clasificación de las hembras donantes*

- [0059] En el presente estudio se utilizaron 47 hembras Jersey (*Bos taurus taurus*) de 8 a 15 meses de edad, provenientes de predios ubicados en Oregon - EUA. Las hembras fueron sometidas a la extracción de óvulos - OPU (por sus iniciales en inglés), y los ovocitos recuperados se destinaron a la producción de embriones in vitro (IVEP, por sus iniciales en inglés). Se realizaron al menos 3 procedimientos OPU por hembra. Luego, a partir del número de embriones obtenidos durante cada OPU, las hembras se clasificaron como Bajas, cuando el promedio de embriones obtenidos durante todos los procedimientos estuvo entre 0 - 1,9, o donantes Elevadas, cuando el promedio de embriones obtenidos durante todos los procedimientos fue > 4,0.
- 15

- 20 [0060] *Extracción de hisopados vaginales*

- [0061] Los hisopos se retiraron del empaque solo en el momento de la extracción. Después de la contención adecuada de los animales, los genitales externos de las hembras se limpiaron con pañuelos de papel para eliminar toda la suciedad y las heces para evitar la contaminación del hisopo. Los hisopos se insertaron de 4 a 5 cm en la vagina y se realizaron círculos completos a lo largo de las paredes vaginales durante 20 segundos. Luego, se cortaron los hisopos, se colocaron en crioviales correctamente identificados y se almacenaron inmediatamente en nitrógeno líquido hasta el momento de la extracción del ADN.
- 25

[0062] *Extracción de ADN de muestras de hisopados vaginales*

- [0063] El ADN genómico de los hisopados vaginales se extrajo con el kit de aislamiento de ADN PowerSoil (MO BIO Laboratory Inc., Carlsbad, CA) después de romper la muestra con un homogeneizador de perlas (Mini-Beadbeater-8, Biospec Products), de acuerdo con el protocolo del
- 30

fabricante. La concentración de ADN y la pureza de las muestras se midieron con NanoDrop® ND-2000 (NanoDrop Technologies).

[0064] *Secuenciación de ADN de lectura larga y análisis bioinformático*

[0065] La amplificación por PCR dirigida y la secuenciación de alto rendimiento (secuenciación de amplicones) de fragmentos del gen de ARNr 16S se usan ampliamente para perfilar comunidades microbianas. Sin embargo, los métodos de generación de perfiles de 16S actuales no brindan suficiente resolución taxonómica y precisión para realizar estudios asociativos a nivel de especie para condiciones específicas. Esto se debe a la amplificación y secuenciación de solo regiones cortas del gen de ARNr 16S, lo que generalmente proporciona solo una taxonomía a nivel de familia o género. Sin embargo, secuencias más largas del gen de ARNr 16S bacteriano podrían proporcionar mayores resoluciones filogenéticas y taxonómicas y avanzar en el conocimiento de la dinámica de la población dentro de comunidades naturales complejas, y además, proporciona datos de microbioma a nivel de especie. En este contexto, el método de secuenciación utilizado fue la secuenciación de una sola molécula en tiempo real (SMRT, por sus iniciales en inglés) de Pacific Biosciences (PacBio) basada en la polimerización del ADN, una prometedora técnica de alto rendimiento de tercera generación.

[0066] Inicialmente, a partir del ADN genómico, se produjeron amplicones V1–V9 duplicados y agrupados para el análisis del chip PacBio RS SMRT. Las muestras se desnaturalizaron (95 °C, 5 min), seguido de 28 ciclos de desnaturalización (95 °C, 45 s), hibridación (55 °C, 1 min) y extensión (68 °C, 2 min) con una extensión final (68 °C, 7 min). Los amplicones de PCR se visualizaron en gel de agarosa, se purificaron con el kit de purificación QIAquick PCR (Qiagen, Valencia, CA). El control de calidad posterior a la amplificación se realizó en un bioanalizador (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). El ADN amplificado de las muestras de hisopados vaginales se combinó luego en una concentración equimolar.

[0067] Las bibliotecas SMRTbell se prepararon a partir del ADN amplificado mediante ligación roma de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Pacific Biosciences). Las bibliotecas SMRTbell purificadas de las muestras vaginales agrupadas y con código de barras se secuenciaron en una sola celda PacBio Sequel. Las muestras se secuenciaron en el sistema Sequel II.

[0068] Para el análisis bioinformático se utilizó el software Mothur según el método descrito por Kozich et ál. (2013) [1] para alinear las lecturas con la base de datos SILVA. Luego, se realizó la clasificación taxonómica utilizando el Ribosomal Database Project [Proyecto de base de datos ribosómicos] (RDP, por sus iniciales en inglés) 11.1.

[0069] *Análisis discriminante lineal (LDA) junto con mediciones del tamaño del efecto (LEfSe)*

[0070] Después de la clasificación taxonómica, los datos fueron analizados en LEfSe, un algoritmo para descubrir y explicar biomarcadores de gran dimensión que identifican características genómicas (taxones, por ejemplo) que caracterizan las diferencias entre dos o más condiciones (o clases) biológicas [2]. Este enfoque puede enfatizar la importancia estadística, la coherencia biológica y la relevancia del efecto, e identificar características diferencialmente abundantes coherentes con categorías biológicamente significativas.

[0071] LEfSe identifica primero vigorosamente las características que son estadísticamente diferentes entre las clases biológicas. Luego realiza pruebas adicionales para evaluar si estas diferencias son coherentes con el comportamiento biológico esperado. Inicialmente, se realiza una suma del factor no paramétrico por la prueba de intervalo de Kruskal-Wallis (KW) [3] para detectar características con abundancia de referencia significativa en relación con la clase de interés; la coherencia biológica se investiga posteriormente utilizando un conjunto de pruebas de pares entre subclases utilizando la prueba de suma de intervalos de Wilcoxon (sin emparejar) [4,5]. Finalmente, LEfSe usa LDA [6] para estimar el tamaño del efecto de cada característica diferencialmente abundante. Un valor de P de $< 0,05$ y una puntuación $\geq 2,0$ se consideraron significativos en las pruebas de Kruskal-Wallis y de Wilcoxon por parejas, respectivamente.

Resultados

[0072] A través del análisis discriminante lineal (LDA) combinado con mediciones del tamaño del efecto (LEfSe), fue posible encontrar una lista que contiene 19 especies de bacterias de las muestras de hisopados vaginales, que permite discriminar entre donantes hembras clasificadas como productoras Bajas y Elevadas de embriones (Fig. 1).

[0073] Las especies de bacterias representativas del grupo de hembras clasificadas como Bajas (un total de 4 comunidades bacterianas), y que tuvieron una abundancia relativa significativamente mayor a las hembras clasificadas como donantes Elevadas, se describen en la Figura 2.

[0074] En oposición, el total de 15 comunidades bacterianas, especies de bacterias representativas del grupo de hembras clasificadas como Elevadas, tuvieron una abundancia relativa significativamente mayor en comparación con las hembras del grupo Bajo, que se representan en las Figuras 3-6.

[0075] Con base en los resultados obtenidos, fue posible observar un perfil diferenciado de especies bacterianas presentes en la microbiota vaginal de hembras bovinas clasificadas como donantes Bajas o Elevadas de ovocitos para la producción de embriones in vitro. De esta forma, dichas comunidades

bacterianas pueden estudiarse y analizarse mejor posteriormente en un mayor número de hembras, como posibles objetos de intervención o incluso para seleccionar hembras donantes de ovocitos con mejores resultados en la producción de embriones in vitro.

Ejemplo 2

5 **Métodos**

[0076] *Animales y toma de muestras*

[0077] Extracción de líquido folicular de donantes: El líquido folicular se extraerá de donantes Holstein prepúberes y púberes. Después de la OPU (lo más estéril posible) se recuperarán los ovocitos y el líquido folicular restante se almacenará en tubos falcon estériles de 15 mL (por duplicado) correctamente identificados (líquido folicular - FL (por sus iniciales en inglés), código del animal, edad y granja). Los tubos se almacenarán inmediatamente en nitrógeno líquido y/o se almacenarán en un congelador a -80 C hasta el momento de la extracción del ADN.

[0078] Extracción de hisopados vaginales y uterinos de las receptoras: Durante el procedimiento de transferencia de embriones (rutina Vytelle), se extraerán hisopados vaginales y uterinos de 50 receptoras. Los hisopos para esta etapa pueden ser los más simples, siempre y cuando estén estériles. Los hisopos se retirarán del empaque solo en el momento de la extracción. En primer lugar, se limpiará el exterior de la vulva con toallas de papel. El veterinario enguantado abrirá los labios e introducirá el hisopo en la vagina, cuidando de no tocar suciedad ni heces, promoviendo movimientos de frotis durante aproximadamente 20 segundos. Luego se retirará el hisopo, nuevamente con cuidado de no contaminar.

20 Se cortará el tallo del hisopo (con la ayuda de unas tijeras limpias) y se colocará en microtubos de 1,5 mL (por duplicado) correctamente identificados (hisopado vaginal - VS (por sus iniciales en inglés), código del animal, edad y granja). Los microtubos se almacenarán inmediatamente en nitrógeno líquido y/o se almacenarán en un congelador a -80 C hasta el momento de la extracción del ADN. Como alternativa, se cortará el tallo del hisopo y se colocará en una solución para la extracción de muestras y la estabilización

25 de ácidos nucleicos para el análisis del perfil de microbioma, tal como un sistema que sea capaz de lisar las células extraídas y estabilizar la muestra para su posterior análisis y evaluación. Un ejemplo no taxativo del tipo de sistema de extracción que podría ser adecuado puede ser uno similar al del kit de extracción y estabilización Omnigene-Vaginal disponible en el mercado (# de catálogo: OMR-130), entre otros posibles kits de extracción y estabilización microbiana. De los mismos animales, también se

30 extraerán hisopados uterinos (por ejemplo, hisopado de cultivo uterino de doble protección Har-Vet™ 86 87 McCullough, Spring Valley, WI) que se introdujo en la vagina superior. Para evitar la contaminación

vaginal del hisopo, se dirigirá la pipeta cubierta con una lámina de plástico hacia el cuello uterino. Dentro del cuello uterino, se romperá la funda de plástico (primera capa de protección) y se manipulará la pipeta a través del cuello uterino hacia el útero. Una vez dentro del útero, se hará avanzar el hisopo a través de la pipeta de plástico sellada (segunda capa de protección) exponiendo el hisopo de algodón estéril a la secreción uterina, promoviendo movimientos de frotis durante aproximadamente 20 segundos. Se tirará del hisopo en la pipeta y se retirará mientras la pipeta se mantendrá dentro del útero para evitar la contaminación con fluidos vaginales. Luego de retirar el hisopo uterino, se cortará el tallo y se colocarán en microtubos de 1,5 mL (por duplicado) identificados correctamente (hisopado uterino - UTS (por sus iniciales en inglés), código del animal, edad y granja). Los microtubos se almacenarán inmediatamente en nitrógeno líquido y/o se almacenarán en un congelador a -80 C hasta el momento de la extracción del ADN. Alternativamente, se cortará el tallo del hisopo y se colocará en una solución disponible en el mercado para la extracción de muestras y la estabilización de ácidos nucleicos, como por ejemplo un sistema similar al kit de extracción y estabilización Omnigene-Vaginal descrito anteriormente (# de catálogo: OMR-130).

15 **[0079]** *Extracción de ARN*

[0080] Se extraerá el ADN genómico de muestras de líquido folicular e hisopados uterinos con el kit QIAamp DNA Mini (Qiagen). El ADN genómico de los hisopados vaginales se extraerá con el kit de aislamiento de ADN PowerSoil (MO BIO Laboratory Inc., Carlsbad, CA) después de romper la muestra con un homogeneizador de perlas (Mini-Beadbeater-8, Biospec Products). La concentración de ADN de las muestras se midió con NanoDrop® ND-2000 (NanoDrop Technologies).

20 **[0081]** *Amplificación por PCR de la región hipervariable V4 de los genes del ARNr 16S bacteriano*

[0082] Para examinar la comunidad bacteriana, la región V4 del gen del ARN ribosómico (ARNr) 16S bacteriano se amplificará por PCR y la secuenciación se realizará en la plataforma Illumina MiSeq. Las muestras que no pasarán el control de calidad serán excluidas de la clasificación taxonómica.

25 **[0083]** *Análisis de los datos*

[0084] La taxonomía de bacterias (filo, orden, clase, familia, género y especie) y la abundancia relativa se evaluarán a partir de secuencias de datos generados. Finalmente, todos los resultados generados aquí compondrán una base de datos de perfiles de microbiomas de hembras donantes y receptoras con diferentes intervalos de edad. Luego, estudios de asociación entre el perfil bacteriano y la generación de ovocitos y, en consecuencia, la calidad de los embriones (mediante la evaluación de las tasas obtenidas en

la producción de embriones in vitro), de las donantes o receptoras que quedaron preñadas después de la transferencia de embriones.

[0085]

[0086] Las modalidades descritas en la presente descripción se pueden combinar de diversas formas. Cualquier aspecto o elemento descrito para una modalidad puede incorporarse en cualquier otra modalidad mencionada en la presente descripción. Si bien se han ilustrado, descrito e indicado diversas características de la invención de los principios aplicados a modalidades particulares de la presente, se debe comprender que los expertos en la técnica pueden realizar diversas omisiones y sustituciones, así como cambios, sin desviarse del espíritu de la presente descripción. Los expertos en la técnica observarán que los principios de la invención pueden ponerse en práctica con modalidades distintas a las descritas, que se presentan con fines ilustrativos y no taxativos. Las descripciones de todas las patentes y bibliografía científica que se citan en la presente se incorporan expresamente en su totalidad mediante referencia.

Referencias

1. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(17):5112-20.
2. Segata N, Izard J, Walron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett W, Huttenhower C. Metagenomic Biomarker Discovery and Explanation. *Genome Biology*, 2011, 12(6):R60.
3. Kruskal WH, Wallis WA: Use of ranks in one-criterion variance analysis. *J Am Stat Assoc*, 1952, 47:583-621.
4. Wilcoxon F. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics*, 1945,1:80-83.
5. Mann HB, Whitney DR. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Ann Math Stat*, 1947, 18:50-60.
6. Fisher RA. The use of multiple measurements in taxonomic problems. *Ann Eugenics*, 1936, 7:179-188.