

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

en

Biología y Tecnología Aplicada a la Reproducción Humana Asistida

MICROBIOMA DEL TRACTO REPRODUCTOR FEMENINO Y APLICACIÓN EN REPRODUCCIÓN ASISTIDA

Autor: Lucía Galeán Gordon

Tutora: Marta Borrallo Fernández

Alcobendas, Septiembre 2022

Indice

| | |
|---|-----------|
| Resumen | 4 |
| Abstract..... | 4 |
| Introducción | 5 |
| <i>Microbioma del tracto reproductor femenino</i> | <i>5</i> |
| <i>Hipótesis</i> | <i>6</i> |
| Objetivos | 6 |
| Materiales y métodos | 6 |
| Resultados..... | 7 |
| <i>Evolución del estudio del microbioma</i> | <i>7</i> |
| <i>Cómo se estudia hoy en día</i> | <i>7</i> |
| <i>Colonización del TRF por los microorganismos e interrelación entre microbiomas de otras zonas corporales.</i> | <i>9</i> |
| <i>Composición vaginal</i> | <i>12</i> |
| <i>Composición cervical</i> | <i>12</i> |
| <i>Composición endometrial</i> | <i>13</i> |
| <i>Composición ovarios y trompas de Falopio</i> | <i>13</i> |
| <i>Fluctuaciones del microbioma de TRF.....</i> | <i>14</i> |
| <i>Disbiosis/problemas obstétricos y ginecológicos y su relación con resultados reproductivos.....</i> | <i>16</i> |
| Vaginosis bacteriana | 18 |
| Endometritis crónica y pólipos endometriales..... | 19 |
| Endometriosis, aborto de repetición y fallo de implantación | 20 |
| <i>Cuales son los retos y cómo mejorar los estudios.....</i> | <i>21</i> |
| <i>Implicaciones en RA</i> | <i>24</i> |
| <i>Cómo puede modularse el microbioma del TRF.....</i> | <i>25</i> |
| Antibióticos y probióticos | 25 |
| Tests de microbiota endometrial | 26 |

| | |
|---------------------------------|-----------|
| Nutrición y estilo de vida..... | 26 |
| Discusión | 28 |
| Conclusiones | 30 |
| Bibliografía | 31 |
| Anexo | 33 |

Resumen

Se sabe que el tracto reproductor femenino no es estéril, sino que está colonizado por comunidades microbianas. A raíz de las nuevas técnicas de secuenciación y mejoras de los sistemas bioinformáticos se ha producido una proliferación de los trabajos para llegar a entender la composición de estos ecosistemas microbianos y su relación con la salud y desórdenes ginecológicos, así como con los resultados reproductivos. El objetivo de este trabajo es ofrecer un resumen del estado actual del tema, dónde existen discrepancias y puntos de mejora y qué se puede esperar al respecto en relación con las técnicas de reproducción asistida y su aplicación en el ámbito clínico.

Abstract

It is known that the female reproductive tract is not sterile, but rather is colonized by microbial communities. As a result of new sequencing techniques and improvements in bioinformatic systems, there has been a proliferation of work to understand the composition of these microbial ecosystems and their relationship with gynecological health and disorders, as well as with reproductive outcomes. The objective of this work is to offer a summary of the current state of the subject, where there are discrepancies and areas that can be improved, and what can be expected in this regard in relation to assisted reproduction techniques and their application in the clinical setting.



Introducción

Los avances en medicina reproductiva han permitido una mayor tasa de fecundación, mientras que las tasas de embarazo se han mantenido muy parecidas a lo largo de los años. El proceso de implantación embrionaria es un punto crítico en las parejas infértiles, el cual sigue siendo una caja negra en el conocimiento del proceso de reproducción. Entre el trofoblasto embrionario y el endometrio materno se produce una interferencia o “cross-talk” que desencadenará una serie de activación e inactivación de genes. Las hormonas esteroides tales como la progesterona o el estrógeno promoverán la implantación de diversas maneras. Así, la implantación requiere de un embrión sano, un endometrio receptivo y una sincronía entre ellos (1). ¿Qué otros factores están impidiendo una mayor tasa de recién nacido vivo?.

Microbioma del tracto reproductor femenino

Existe una correlación entre los cambios en la composición del microbioma del tracto reproductor femenino (TRF) y patologías obstétricas y ginecológicas. Un ecosistema microbiano equilibrado y sano se dice que está en eubiosis mientras que estará en disbiosis si está en desequilibrio homeostático (2). No está clara la relación entre disbiosis y enfermedad, pero el estudio de la configuración del microbioma ayuda a establecer la relación entre comunidades bacterianas y desórdenes reproductivos y ginecológicos, por lo tanto, es importante en el contexto de la reproducción y los tratamientos de fertilidad (3).

Durante casi un siglo (1900) se pensó que la cavidad uterina era estéril. En 1980 se comienza a investigar el microbioma del TRF mediante métodos de microscopía y dependientes de cultivo, a pesar de sólo ser cultivables un 1% de las bacterias. Zonas como la vagina y el cuello uterino eran zonas sencillas de muestrear, pero no ha sido hasta la secuenciación de alto rendimiento conocida como “Next Generation Sequencing” (NGS) y la secuenciación del gen 16S rRNA que han empezado a proliferar los estudios del microbioma del TRF y especialmente el uterino, pudiéndose secuenciar la totalidad de microorganismos (1). El Proyecto Microbioma Humano (HMP por sus siglas en inglés) lanzado en el 2007 tiene como objetivo la identificación y caracterización de los microorganismos asociados a los humanos (2). Sin embargo, con la secuenciación por NGS, comenzaron también a verse limitaciones en este tipo de estudios, como por ejemplo, los controles de los reactivos, el

tamaño de la cohorte y la demografía de los pacientes, así como la elección de pacientes sanas como control, la recolección de la muestra (y la posibilidad de contaminación) y los métodos de secuenciación entre otros (1,4). La complejidad de este tipo de estudios hace difícil establecer un microbioma fisiológico ideal o “core” o central del TRF (cervix, cavidad uterina, trompas de Falopio y ovarios) que está aún por dilucidar y, en mayor medida, el endometrial (2).

Hipótesis

Se plantea la hipótesis: ¿El estudio de la microbiota del tracto reproductor femenino tiene una aplicación clínica real en la reproducción asistida a día de hoy?

Objetivos

1. Llevar a cabo una revisión bibliográfica sobre el estado actual del estudio del microbioma del tracto reproductor femenino (centrado en la edad reproductora), su relación con la salud reproductiva e implicación en el ámbito de la reproducción asistida.
2. Cuáles son los avances en esta materia, hacia dónde apuntan los estudios actuales y cuáles son las perspectivas de futuro.

Materiales y métodos

Se definieron como palabras clave: *Microbiome, Microbiota, Fertility, Infertility Female Reproductive Tract* y *IVF*.

Las bases de datos consultadas fueron *Pubmed, Google Scholar* y *MEDLINE* y el periodo de cobertura fue desde el año 2017 hasta 2022, salvo un artículo de gran relevancia sobre el tema tratado del año 2012. Se recopilaron artículos de revistas indexadas en inglés dando preferencia a las de mayor índice de impacto. Sólo se consideraron los artículos originales en inglés y se excluyeron editoriales, *papers* de conferencias y congresos, opiniones y cartas al director.

Resultados

Evolución del estudio del microbioma

Los métodos para identificar las especies bacterianas han evolucionado desde los basados en métodos de cultivo o culturómica, con baja resolución de las comunidades bacterianas, hasta los más recientes y empleados que son los independientes de cultivo, basados en el estudio molecular del microbioma y el gen rRNA 16S. Los estudios basados en métodos de cultivo y la microscopía son informativos, pero sólo detectan una pequeña proporción de organismos vivos y no son representativos del nicho ecológico a investigar. Aunque la identificación fenotípica o morfológica por microscopía o cultivo aún tiene su lugar, las tecnologías de secuenciación con genes marcadores asociados a la taxonomía, como el 16S rRNA o la secuenciación del genoma completo, son los más empleados en la actualidad. La microbiota gastrointestinal se estima que supone el 29% del total y la urogenital supondría un 9%. El microbioma que habita en simbiosis en los distintos lugares del ser humano tiene un rol importante en la defensa contra enfermedades y el microbioma del TRF en concreto, además, influye en los resultados reproductivos, como su conocido papel en la colonización del recién nacido, impactando en su neurodesarrollo y sistema inmune (2,5).

Cómo se estudia hoy en día

A la hora de diseñar un estudio en el contexto del microbioma, y sobre todo el endometrial, se estudian las diferencias en la estructura de la comunidad microbiana, composición y genética o función entre cohortes separadas (de tipo caso-control o estudios transversales) o a lo largo del tiempo (estudios longitudinales). Se trata de ver la estabilidad de la comunidad microbiana más que los taxones específicos presentes (6).

La falta de estandarización de estos estudios, debido en gran parte a diversas dificultades asociadas a los siguientes puntos, sigue siendo la principal dificultad de estos estudios.

Métodos de muestreo. En general emplean hisopos vaginales o cervicales. Para el muestreo del endometrio por vía transcervical se emplean los catéteres de transferencia embrionaria o la histerectomía (7,8). Uno de los puntos críticos es evitar la contaminación. Hay distintos tipos de hisopos, tubos, o de soluciones tampones y la muestra puede ser

recogida por la propia paciente o por un profesional. Otro punto clave es el almacenamiento hasta el procesado para evitar la contaminación o el sobrecrecimiento bacteriano (6,8).

Los métodos de análisis dependientes de cultivo o culturómica, posterior tinción y observado de la morfología o de reacciones bioquímicas: Llevan mucho tiempo y sólo informan sobre aquellas bacterias a las que se les ha proporcionado el sustrato de crecimiento en el medio de cultivo, por lo que no ofrece una imagen representativa del nicho objeto de estudio. La tinción de las gram junto con morfología permite obtener la evaluación de Nugent, que cuantifica los morfotipos correspondientes de bacilos Gram negativos pequeños, Gram positivos grandes y bacilos Gram variables curvos para el diagnóstico de vaginosis bacteriana principalmente (5).

El uso de las técnicas moleculares independientes de cultivo ha crecido exponencialmente en los últimos diez años. Basadas en el estudio molecular del microbioma y secuenciando del ARNr 16S (o de los genes que lo codifican), que es un componente de la subunidad pequeña de 30S del ribosoma procariota muy conservado. Permitiendo establecer relaciones filogenéticas entre los organismos procariotas y la identificación de las bacterias rápida y precisa. La reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) se emplea para la detección, cuantificación e identificación de distintas especies bacterianas. A la hora de identificar patógenos, la mayor limitación es que se tiene que conocer de antemano la secuencia genética del DNA que se quiere investigar (2,5).

Secuenciación de nueva generación (NGS). A partir de esta tecnología se pudieron estudiar simultáneamente gran número de bacterias secuenciando el rRNA 16S, en combinación con el progreso de la **bioinformática** que establece las agrupaciones en función de las similitudes (2).

La secuenciación genómica completa (WGS) estudia todos los genomas bacterianos, la función de los distintos genes, estructura y organización y no sólo algunas secuencias de interés (2).

Análisis IS-pro o técnica de análisis de espacios intergénicos. Amplifica dichas regiones que son variables y específicas de cada grupo bacteriano. Esta nueva técnica de creación de perfiles basada en qPCR para el análisis de alto rendimiento de la microbiota intestinal humana, combina el reconocimiento de especies bacterianas en función de la

longitud de la región interespacial del ADNr 16S–23S, con la clasificación taxonómica mediante el etiquetado de cebadores de PCR con fluorescencia específica del filo secuencias (5,7).

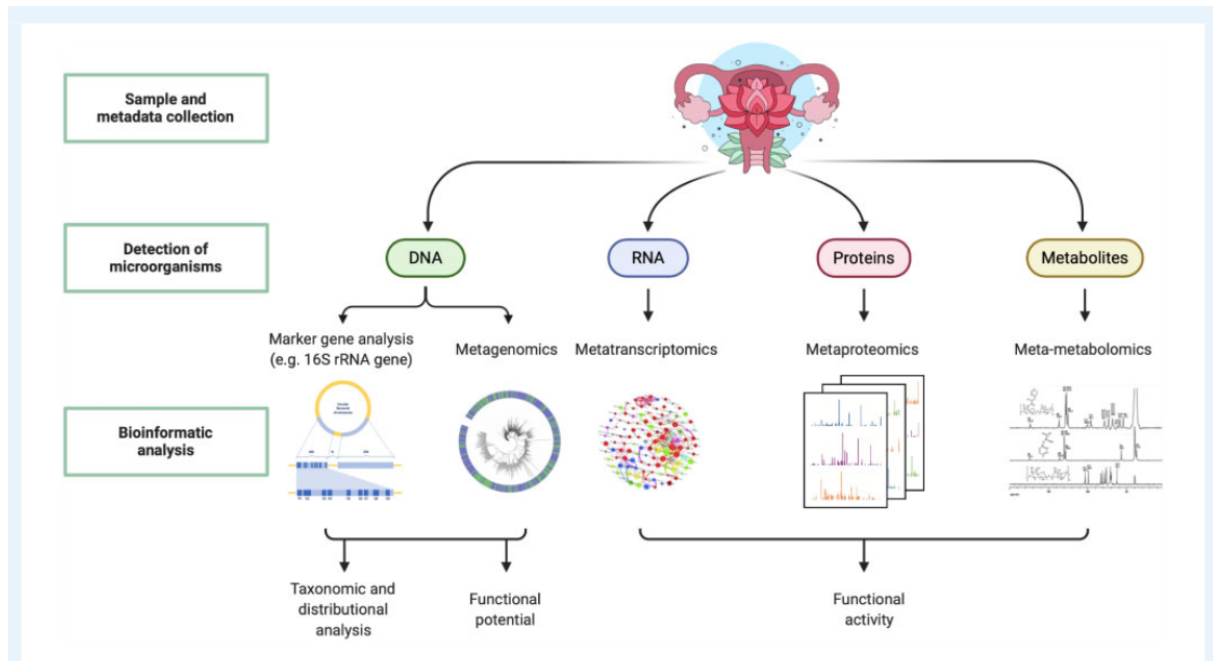


Figura 1. Diagrama de muestreo, detección y análisis bioinformático del microbioma del TRF humano (6).

Colonización del TRF por los microorganismos e interrelación entre microbiomas de otras zonas corporales.

Aunque se pensaba que el tracto genital superior era estéril, con las nuevas técnicas de secuenciación se ha visto que la microbiota del TRF se encuentra en todas las zonas (vagina, cérvix, endometrio, trompas y ovarios) y además es diferente y característica en cada una de ellas. Dentro de un mismo individuo, existe una continuidad microbiana desde la vagina que va cambiando gradualmente en las distintas zonas (9).

Los microorganismos pueden haber llegado a la cavidad uterina por distintas vías como la ascensión por la vagina o semen, el torrente sanguíneo, el intestino e incluso la cavidad oral y ciertamente también se puede dar mediante las intervenciones realizadas en RA. También se especula con que cada zona tiene su propia comunidad (hay algunas bacterias que se encuentran exclusivamente en un lugar o en otro) (1).

Aunque la microbiota intestinal escapa al objeto de este trabajo, debido a la interconexión de las comunidades bacterianas que habitan en las distintas zonas del cuerpo, cabe mencionar el papel que la flora intestinal tiene en el sistema reproductor femenino. La figura 2 de Baker *et al.* (10) recoge la interconexión de ambos microbiomas y el papel estrogénico de la microbiota intestinal. Los fitoestrógenos (estrógenos de origen vegetal provenientes de la alimentación) y estrógenos conjugados de las secreciones ácidas biliares son desconjugados a su forma activa por la β -glucuronidasa, sintetizada a su vez por la microbiota intestinal. Esto permite a los estrógenos y fitoestrógenos ser reabsorbidos y trasladados por el flujo sanguíneo hacia sitios más distales, como el TRF, donde actuarán en los receptores estrogénicos. Los fitoestrógenos tienen efectos opuestos a los estrógenos en el TRF y su activación se da de la misma manera. La disbiosis en el intestino conlleva una disminución de la diversidad microbiana y una cantidad de enzimas capaces de sintetizar menores cantidades de metabolitos, produciendo una disminución en la conjugación de estrógenos que no pasarán a su forma activada y disminuyendo así la circulación de éstos en el torrente sanguíneo. Además, esta disbiosis afecta a la integridad de la membrana intestinal que hace que se pierdan las uniones celulares aumentando la permeabilidad intestinal y facilitando la translocación bacteriana que a su vez produce inflamación sistémica y aumenta el riesgo de enfermedad. El papel fisiológico del estrógeno en el tracto reproductivo femenino se da por regulación del microambiente, por aumento del grosor epitelial, aumentando los niveles de glucógeno, por aumento de la secreción mucosa y disminución del pH vaginal a través del favorecimiento de los *Lactobacilli* y su producción de ácido láctico(10).

Se produce una interacción entre las mucosas de las distintas zonas del cuerpo a través de la respuesta inmune pero también con el intercambio bacteriano y de metabolitos. Una disbiosis en una zona puede impactar sobre el ambiente inmune de la mucosa de otra zona, por ejemplo, hay una asociación entre la infección oral y la colonización de la placenta por especies de flora oral (4).

Existe una fuerte correlación entre el microbioma vaginal, cervical y uterino en una misma mujer. La tendencia es que el microbioma cambia progresivamente desde el tracto genital inferior hasta el superior, siendo mayor la cantidad de *Lactobacillus* en el tracto inferior que en el uterino (11). Las diferencias en la composición del microbioma humano y en concreto del vaginal podrían deberse a exposiciones ambientales únicas y a la dieta (7).

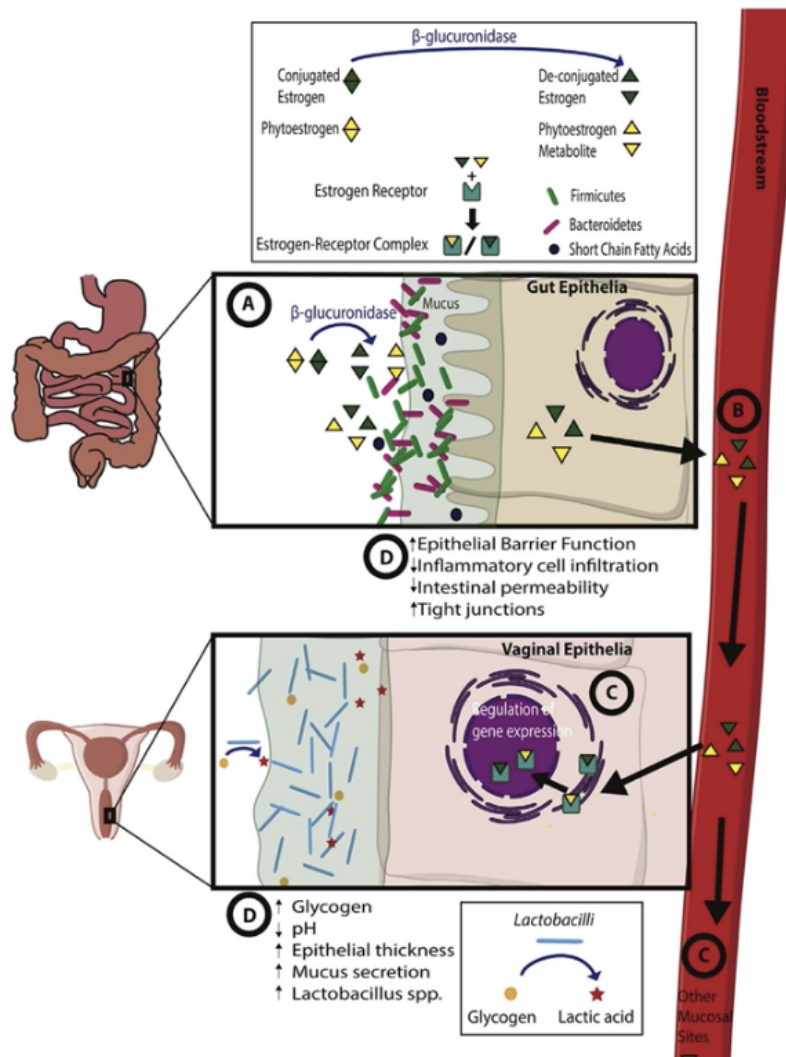


Figura 1. Interconexión entre el intestino y el TRF y el papel estrogénico de la microbiota intestinal. Modificado de Baker *et al.* (10). **A)** Los estrógenos y fitoestrógenos conjugados secretados por ácidos biliares son desconjugados a través de la secreción bacteriana de β -glucuronidasa. Son así metabolizados y translocados desde el intestino al torrente sanguíneo. **B)** Transporte a las mucosas distales a través del sistema circulatorio de los metabolitos de estrógenos y fitoestrógenos. **C)** Los metabolitos de estrógenos y fitoestrógenos luego actúan sobre los receptores de estrógenos en sitios distales (ejemplo, epitelio vaginal). **D)** La unión del receptor de estrógeno en el epitelio vaginal conduce a cambios fisiológicos a través de la activación de genes “downstream”, efectos epigenéticos y cascadas de señalización intracelular. La disbiosis en el microbioma intestinal puede afectar a la homeostasis en este sitio a través de la alteración del metabolismo de los estrógenos. Una disminución en la diversidad de la microbiota intestinal implica una disminución en el metabolismo de los estrógenos por falta de bacterias metabolizadoras de los mismos dándose una reducción de los estrógenos circulantes.

Composición vaginal

La cavidad vaginal es la zona del TRF más fácil de muestrear. Kroon *et al.* (12) clasifican el microbioma vaginal de mujeres sanas en cinco tipos de estados (“community state types” o CST) que se diferencian por sus especies dominantes y sus valores de pH. En el CST I, II, III y V predominan *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii* respectivamente. En CST IV predominan más los géneros estrictamente anaerobios y facultativos (*Dialister*, *Gardnerella*, *Atopobium* y *Sneathia*) en detrimento de *Lactobacilli*. El grupo IV tiene distintas agrupaciones dividiéndose así en los subgrupos CST IV-A y CST IV-B, donde el subgrupo IV-A contiene cantidades moderadas de *Lactobacillus* spp. y anaerobios estrictos, mientras que IV-B tiene una mayor proporción de especies asociadas a vaginosis bacteriana (12). Se han descrito dinámicas temporales de estas CST en la vagina donde ni el cambio en la composición de estas comunidades bacterianas ni los altos niveles de diversidad de especies están relacionados con síntomas o problemas de salud. También se han establecido microbiomas tipo en función del CST más frecuente como CST I y III en muestras de controles sanas. Sin embargo, sigue siendo una tarea pendiente el establecer una firma microbiana vaginal, entendida como un grupo de taxones bacterianos que sea predictivo de un fenotipo sano. Aunque el conocimiento actual apunta a que, en una mujer sana no embarazada, el microbioma vaginal tiene una alta carga bacteriana con especies de *Lactobacillus* (11).

Composición cervical

En el cérvix, la abundancia de *Lactobacillus* está en un 97,56% en el moco cervical siendo *L. crispatus* y *L. iners* las especies más abundantes seguidas por *Gardnerella* spp., *Prevotella* spp., *Veillonella* spp., *Sneathia* spp., o *Fusobacterium* spp. entre otras. Curiosamente, parece que una alta diversidad de especies en el microbioma cervical junto con determinados géneros como *Gardnerella* spp, podrían estar asociados con un mayor riesgo de contraer el papilomavirus humano. Además, existe una correlación entre el microbioma cervical con el encontrado en el saco de Douglass, pudiendo servir el análisis del cérvix para analizar el estado del útero y peritoneo (11).

En cuanto a la flora cervical, se trata de un complejo de bacterias que interaccionan y compiten entre ellas. Como reúnen en su revisión Vitale *et al.* (5) los estudios de las mujeres infértiles tienen una distribución bacteriana cervical parecida a mujeres embarazadas y de

parto, aunque tienen una menor proporción de bacterias aerobias y anaerobias, y en algunos casos bacterias exclusivamente anaerobias en mujeres infértiles. *Mycobacterium tuberculosis* (aerobia estricta) es la bacteria que tras cultivo aparece en mayor grado en pacientes infértiles (5).

Composición endometrial

En un principio se pensaba que el endometrio era estéril ya que no se obtenía información con los cultivos (5). El microbioma endometrial se caracteriza por una baja biomasa (entre 100 y 10000 veces menos que en la vagina) (4). A partir de las técnicas modernas observan presencia de los géneros *Bacteroides* y *Pelomonas* y en algunos casos *Lactobacillus crispatus* e *Iners*, asociados con frecuencia con especies de *Bacteroides* (5). Aunque parece que *Lactobacillus* es el género más abundante en un endometrio sano, sigue sin haber consenso hoy en día sobre cuál sería su configuración bacteriana ya que algunos grupos reportan endometrios no dominados por *Lactobacillus* (1,8,9). Según la revisión de Punzón *et al.* (11) se extraen diferentes composiciones bacterianas como *L. iners*, *Prevotella* spp. y *L. crispatus*; o *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes* y se encuentra *Lactobacillus* spp. en sólo 4/19 de las muestras endometriales; o *Lactobacillus* junto con *Flavobacterium*; o *Lactobacillus* siendo la más abundante seguido de *Gardnerella*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* y *Prevotella* dividiendo las muestras en microbiota *Lactobacillus*-dominante (LD >90% *Lactobacillus* spp.) y no-*Lactobacillus*-dominante (NLD < 90% *Lactobacillus* spp. más >10% de otras bacterias)(1). Esta división realizada por Moreno *et al.* (13,14) de LD y NLD, resulta útil para correlacionarla con resultados reproductivos. Entre las combinaciones endometriales NLD destacan *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Vagococcus* y *Sphingobium*; o *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* y *Moraxella* como los géneros más abundantes y *Cloacibacterium*, *Pseudomonas*, *Comamonadaceae* y *Acinetobacter* (7,11)

Composición ovarios y trompas de Falopio

En los ovarios y trompas de Falopio hay unas comunidades microbianas muy variadas presentándose *Lactobacillus* spp. en menor cantidad que en vagina y cérvix. Se darían unas condiciones más alcalinas que en la vagina dando lugar a una gran variabilidad interindividual.

En cuanto a la firma microbiana del líquido folicular se encontraron *L. iners*, *Actinomyces* spp., *Corynebacterium auromuosum*, *Fusobacterium* spp., *Prevotella* o *Staphylococcus* spp. (11). Faltan datos sobre el microbioma de las trompas de Falopio, debido en parte a la dificultad en su muestreo sobre el que falta consenso. Serían necesarios análisis en métodos independientes de cultivo y en estudios grandes y prospectivos con una inclusión homogénea y criterios de exclusión para poder tener más robustez clínica y poder comparar mejor entre estudios (5).

En la figura 3 se muestra una figura con un resumen de la composición microbiana en el TRF.

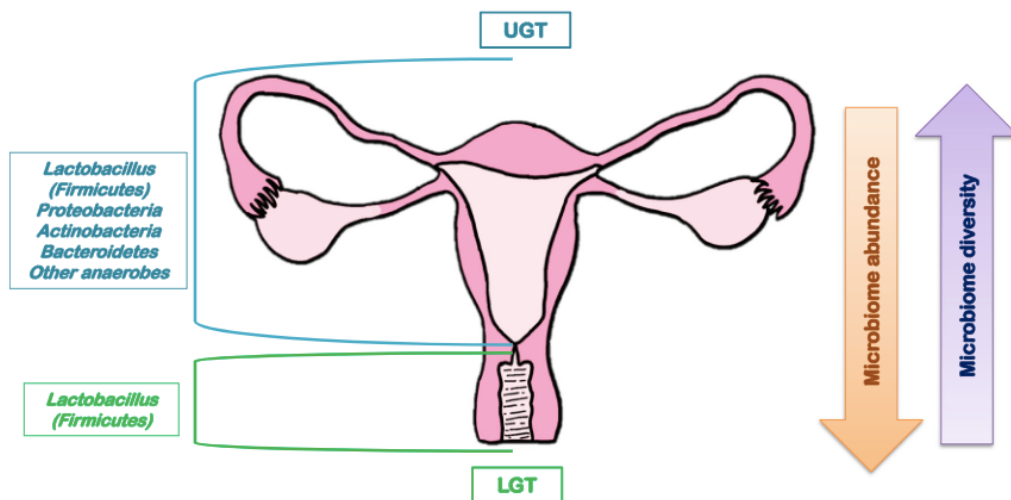


Figura 3. Distribución microbiana en el tracto genital inferior (LGT por “lower genital tract”) y superior (UGT por “upper genital tract”) (11).

Fluctuaciones del microbioma de TRF

Uno de los retos del estudio del microbioma del TRF es correlacionar las fluctuaciones que sufren las comunidades bacterianas con diversos parámetros resumidos a continuación.

Edad. La diversidad alfa (diversidad microbiana en la misma muestra) disminuye con la edad mientras que la diversidad beta (aquella interindividual) es más alta en mujeres por debajo de los veinte años. Se piensa que, a mayor edad, pueden haberse dado más alteraciones como abortos, partos, etc. que hacen que el endometrio y la vagina se parezcan

más en cuanto a microbiota debido en parte a que el cuello uterino pueda verse comprometido (1). En la infancia la mujer tiene un pH vaginal neutro con anaerobios y *E. coli*. En la pubertad, debido a la estimulación estrogénica, las células epiteliales producen glucógeno favoreciendo la dominancia de *Lactobacillus* que se mantendrá durante los años reproductivos. Cuando decaen los niveles de estrógenos en la menopausia, también lo hace el glucógeno y con ello la población de lactobacilos, aunque se sigue manteniendo una dominancia de *L. crispatus* y *L. iners* junto con *Gardnerella* o *Prevotella* (11).

Cambios hormonales. Los anticonceptivos orales y dispositivos intrauterinos alteran la microbiota endometrial disminuyendo la diversidad de los filotipos de *Lactobacillus* spp. La estimulación ovárica y la progesterona suministrada en los tratamientos de RA aumentan el índice de diversidad tanto en la microbiota del endometrio como en la vaginal. Y lo mismo ocurriría durante un ciclo natural, donde también se suceden los cambios en el microbioma.

- *Prevotella* spp. y *Sneathia* spp. se dan más durante las fases proliferativas y secretoras (1).
- *Propionibacterium*, *Pseudomonas* y *Sphingobium* varían a lo largo del ciclo con un incremento bacteriano durante la fase proliferativa (1).
- *Lactobacillus* baja durante la menstruación y sube gradualmente durante el desarrollo folicular alcanzando su máximo durante la fase lútea. Estos cambios también se producen en virus y arqueas (1).
- El microbioma uterino se mantiene estable durante la adquisición de receptividad endometrial (1).
- Durante el embarazo cambia la firma microbiana vaginal. En no embarazadas, puede haber variaciones en la abundancia de *Lactobacillus*, pero en embarazadas este género se mantiene estable, junto con una baja diversidad de especies bacterianas. Podría ser que, aun manteniéndose la dominancia de este género en las embarazadas, haya cambios del CST individual. Al principio del embarazo hay un aumento de *Lactobacillus* spp. pasando a una mezcla bacteriana antiinflamatoria en la placenta con *Proteobacterium*, *Acinetobacterium*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Temericutes* que mantendrían un embarazo sano y de bajo riesgo. Al final del embarazo, el microbioma vaginal de las embarazadas empieza a asemejarse al de las

no embarazadas y el ambiente antiinflamatorio pasaría a pro inflamatorio antes del desencadenamiento del parto. CST IV con bajos niveles de *Lactobacillus* (menor dominancia de *L. crispatus*) y/o valores incrementados de *Sneathia* spp. y *Prevotella* spp. entre otras durante el primer trimestre están asociados con recién nacidos prematuros. Sería interesante la posibilidad de usar en clínica el microbioma y sus funciones para distinguir entre una buena y mala prognosis del embarazo (11).

Etnia. Entre función del grupo étnico y de su origen geográfico se dan con más frecuencia unos tipos de estados comunitarios (CST) u otros. CST I es más frecuente en caucásicas y IV en afroamericanas e hispanas (12). Diferencias en el microbioma del TRF entre diferentes etnias demuestra que no hay un microbioma vaginal “core” o central común a todas las mujeres, sino que varía dependiendo de la etnicidad, lo cual es sumamente importante porque estas diferencias podrían determinar cómo dichas comunidades bacterianas responden a las infecciones (15).

Además, con las relaciones sexuales aparecen y desaparecen una media de dos-cuatro especies. Estos cambios se producen con menor frecuencia en mujeres con una microbiota vaginal normal y más frecuentes en mujeres cuya pareja masculina padecía prostatitis inflamatoria. el embarazo o factores medioambientales como fumar, higiene femenina, etc, afectan al microbioma vaginal y promueven cambios comunitarios (1,12,15). Por otro lado, las variaciones genéticas afectan al mantenimiento y constitución de la microbiota vaginal y que distintos polimorfismos podrían interferir con el sistema inmune y promover cambios en la flora no favorables para la salud (15).

Disbiosis/problemas obstétricos y ginecológicos y su relación con resultados reproductivos.

No está clara aún la relación entre disbiosis y enfermedad, pero la configuración de las comunidades bacterianas y desórdenes reproductivos y ginecológicos es evidente, y por lo

tanto es importante en el contexto de la reproducción. Una vagina sana tiene un ecosistema microbiano estructurado con una menor diversidad alfa y beta que en otros lugares corporales y se caracteriza por la ausencia de síntomas e infecciones (11,15). En la figura 4 se ofrece un esquema de los factores que llevan a disbiosis o eubiosis en la microbiota vaginal, dominada por *Lactobacillus* spp., cuya presencia se vincula con la producción de estrógeno y acumulación de glicógeno en el epitelio. Otras propiedades beneficiosas de estas

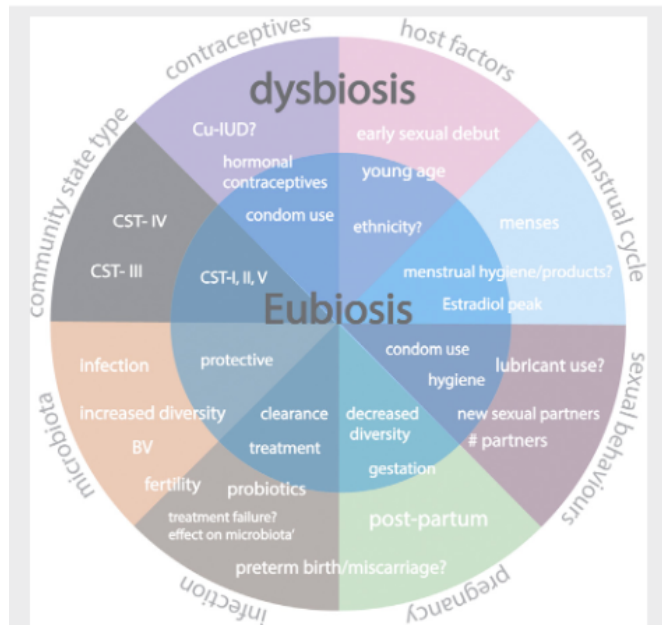


Figura 4. Factores que producen y asociados a disbiosis o eubiosis de la microbiota vaginal en mujeres en edad reproductiva (12).

bacterias serían la producción de bacteriocinas (compuestos antimicrobianos), peróxido de hidrógeno y ácido láctico, lo cual disminuye el pH e impide el crecimiento de bacterias patógenas. Su adherencia al epitelio vaginal produce exclusión competitiva de otras bacterias y la capacidad de usar los nutrientes de manera eficaz. El *stratum corneum* de la vagina (las capas más superficiales del epitelio vaginal) consiste en células unidas débilmente y con almacenes de glucógeno y mediadores de la defensa innata que contribuyen a que este sea un nicho para *Lactobacillus* spp. (7,11,12).

La relación entre el pH y *Lactobacillus* no parece un buen predictor de la microbiota potencial, ya que *Lactobacillus* por sí solo no cambia el pH. En cambio, el estudio del metaboloma y del proteoma de muestras vaginales sí que es un buen predictor de la composición de la microbiota y su relación con la infertilidad, ya que son muy distintos entre pacientes infértiles y sanas. Así mismo, en el flujo endometrial se han encontrado péptidos con actividad microbiana, por lo que desórdenes obstétricos y ginecológicos podrían estar influyendo en la composición bacteriana e impactando en la implantación y desarrollo embrionario (1).

Alteraciones de la microbiota e infertilidad, como en la vaginosis bacteriana, la endometritis crónica, la enfermedad inflamatoria pélvica, la endometriosis y el aborto de repetición presentan bacterias endometriales características (1).

Vaginosis bacteriana

Los estudios tratan de ver qué pacientes tienen una composición bacteriana anormal y cuál es la relación existente con las técnicas de RA y las tasas de embarazo. En cuanto a las infecciones disbióticas, la vaginosis bacteriana (VB) es la afección vaginal más común en mujeres en edad reproductiva (15). Un 28% de la VB es asintomática destacando la presencia de *Escherichia coli*, *Enterococcus* y *Candida* y una baja cantidad de *Lactobacillus* en comparación con mujeres sanas. Además, se observó que sólo el 9% de estas pacientes con microbiota anormal fueron capaces de obtener un embarazo clínico y niveles bajos de *Lactobacillus* y altos de *Proteobacteria* o *Lactobacillus jenseni* en mujeres que no consiguieron embarazo con RA (5). Hay dos perfiles de *Gardnerella vaginalis* distintos de los cuales sólo uno de ellos se correlaciona con pobres resultados reproductivos. En la revisión de Vitale *et al.* (5) destacan un estudio donde más de un 60% de *Lactobacillus crispatus* también da pobres resultados en RA. Con la técnica NGS se compararon el microbioma vaginal de mujeres idiopáticas y no idiopáticas de mujeres infértiles, mujeres sanas y mujeres afectadas con VB con el objetivo de encontrar biomarcadores de infertilidad. El microbioma vaginal de mujeres infértiles idiopáticas era similar al de aquellas con VB. Además, en mujeres sanas *Lactobacillus iners* resultó ser un marcador de microbioma vaginal sano, mientras que niveles de *Lactobacillus crispatus* en mujeres infértiles idiopáticas fueron más bajos en comparación con los de mujeres sanas (12). Esto hace pensar que no se puede generalizar en los efectos positivos de ciertos géneros como *Lactobacillus*, ya que diferentes especies pueden condicionar el resultado en RA. Alegan controversia con respecto a *L. crispatus* ya que en baja cantidad pueden incrementar la susceptibilidad a patógenos que puede llevar a VB, por un lado, mientras que por otro, su sola presencia no es un factor favorable, sino que el grado de dominancia de *L. crispatus* en el microbioma vaginal sería la clave (5).

Por lo tanto, la VB no se produce por la presencia de un único microorganismo, sino que se trata de un desequilibrio ecológico de las comunidades bacterianas vaginales, lo cual añade complejidad al uso de antibióticos (metronidazol o clindamicina) para su tratamiento. En

la VB se crean biofilms que son difíciles de eliminar por medio del tratamiento con antibióticos o el sistema inmune por lo que las VBs suelen ser recurrentes. Si bien no hay una relación directa entre infertilidad y VB, sí que aumenta el riesgo de aborto. Las infecciones intrauterinas provocan nacimientos prematuros y se suelen dar por ascensión desde la vagina y el cérvix (entre otras) (15).

Endometritis crónica y pólipos endometriales

Los pólipos endometriales y la endometritis crónica están asociados a una microbiota dominada por *Firmicutes* a nivel filo y por *Bifidobacterium*, *Gardnerella*, *Streptococcus*, *Alteromonas* y *Lactobacillus* a nivel de género. Este último hasta tres veces más en comparación con mujeres sanas, lo que Baker *et. al* (4) atribuyen a un posible incremento de la permeabilidad cervical que permitiría la mayor colonización de bacterias vaginales en el útero. En cuanto a la comparación de la microbiota endometrial de mujeres infértiles con y sin endometritis crónica, el no padecer esta inflamación está asociado con una mayor abundancia de otros taxones como *Lactobacillus* (1,89% vs. 80,7%) con menor cantidad de *L. crispatus* en el grupo con EC, mientras que *Gardnerella* y *Anaerococcus* se correlacionan negativamente con la abundancia relativa de *Lactobacillus* en el microbioma de EC en la revisión de Vitale *et al*. Examinando la presencia de *Lactobacillus* en el líquido folicular, se vio que había una asociación con la maduración embrionaria y transferencia y que la presencia de otras bacterias contaminantes (no identificadas) afectaban negativamente al resultado de la RA (5). Este grupo concluye que la falta de *Lactobacilli* podría afectar negativamente los resultados de la RA y explicar en parte los fallos de implantación. Niveles de *L. crispatus* tienen un papel protector contra la VB (contra *Ureaplasma* y *G. vaginalis*), mientras que niveles de bacterias Gram-negativas como *Chlamydia trachomatis* y *G. vaginalis* y la falta de *Lactobacillus* podría estar relacionado con la infertilidad. Un endometrio con una flora no *Lactobacillus* dominante podría estar relacionado con los fallos repetidos de implantación y también con la presencia de *Bacteroides* en mujeres que no consiguen un embarazo (5).

Toson B, *et al* (1), en su revisión sugieren la utilidad del uso de bacterias que actuarían como biomarcadores endometriales en mujeres que se someten a tratamientos de RA, ya que en su mayoría coinciden en una cantidad casi inexistente de *Lactobacillus* y presentan especies tales como *Kocuria dechangensis*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Stenotoponomas maltophilia*,

Agrogacterium tumefaciens, *Delftia tsuruhatensis* y *Cutibacterium acnes*, aunque parece que algunas de estas bacterias podrían ser contaminantes.

Endometriosis, aborto de repetición y fallo de implantación

La presencia de bacterias en el útero se asocia con pobres resultados reproductivos y endometriosis, aunque la causa-efecto aún no ha sido establecida. La asociación entre endometriosis y la disminución de la fertilidad sí ha sido bien documentada y se sabe que mujeres con endometriosis tienen una microbiota endometrial muy distinta a las que no la padecen, en general con menor cantidad de *Lactobacillus* y menor biodiversidad. Tras tratamiento de las mujeres endometriósicas con antibióticos se obtienen mejores resultados reproductivos que aquellas sin tratar, sugiriendo que el impacto de la endometriosis sobre la fertilidad podría deberse en parte a la microbiota (1,4).

Se ha visto que, durante la receptividad endometrial, la microbiota endometrial es muy estable en mujeres sometidas a RA, pero en función de su composición darán lugar a distintos resultados reproductivos. Endometrios con una microbiota *Lactobacillus*-no-dominante (<90% de especies de *Lactobacillus* con >10% de otras bacterias) se asocian con menores tasas de implantación, embarazo, embarazo evolutivo y RNV, pudiendo ser esta falta de flora LND una causa del fallo de implantación y aborto de repetición. En mujeres sanas la flora LD se mantiene estable durante los cambios hormonales del ciclo. Comparando bacterias específicas de la microbiota vaginal con la endometrial en relación con el fallo repetido de implantación, se vio que no había diferencias entre cavidad vaginal y endometrial salvo por una mayor diversidad bacteriana en el endometrio. *Gardnerella vaginalis* era detectada más frecuentemente en el flujo endometrial del grupo de fallo repetido de implantación, pero sin significancia estadística y *Burkholderia* se detectaba en un 25% en el grupo de fallo repetido de implantación y nada en el grupo control (5).

Los procesos inflamatorios están relacionados con infertilidad. En la revisión de Toson *et al.* (1) recogen estudios que muestran cómo en la endometritis crónica y en el aborto de repetición hay una expresión elevada de IgM, IgA e IgG. Además, en pacientes con endometriosis hay un aumento de citoquinas proinflamatorias como interleucina 6, proIL-1 β , IL-1 β . Podría ser que las fluctuaciones bacterianas propiciaran una respuesta inmune inflamatoria dentro del tracto reproductor afectando de manera negativa a la implantación

embrionaria y a los ciclos de RA. Sin embargo, no está claro si una desestabilización inmunológica es la consecuencia de cambios en composición bacteriana o por el contrario es el ambiente el que propicia distintas bacterias. Queda por conocer los mecanismos de interacción huésped-microbiota para entender cómo estas fluctuaciones de microbiota endometrial afectan al resultado de los ciclos de FIV. Se ha visto que el uso de antibióticos en pacientes con aborto de repetición no mejora los resultados, reforzando la idea del efecto negativo añadido de la inflamación. Como factores que afectan negativamente al resultado reproductivo estarían por un lado la composición alterada del microbioma y por otro la respuesta del TRF a dicha alteración, mecanismos de interacción claves para mejorar el éxito de los tratamientos de RA (1).

En la revisión de Vitale *et al.* (5) se menciona que a través de la secuenciación metagenómica del rRNA y también tras el cultivo de isopos cervicales en mujeres infértiles con cervicitis (inflamación del cuello del útero), no encontraron diferencias en la flora salvo por la presencia de *Chlamydia trachomatis* en el suero cervical en un 88% frente al 28% en mujeres fértiles. Su presencia está asociada a infertilidad y conlleva la aparición de otros parásitos con más frecuencia. Comparando los anticuerpos anti-*Chlamydia* en mujeres con infertilidad infecciosa, infertilidad no infecciosa y con mujeres sanas, se encuentra más *Chlamydia trachomatis* en mujeres con infertilidad infecciosa que las de infertilidad no infecciosa, y una cantidad de *Lactobacillus* en mujeres sanas del 78,3%, infértiles no infecciosas del 69% y no infecciosas del 58%, mientras que *Gardnerella vaginalis* aumenta en los mismos grupos (5%, 6% y 10%) con tendencias similares para *Sneathia* y *Prevotella*. En pacientes sometidas a RA, encontraron una predominancia de *E. coli* y *Streptococcus* en aquellas en las que el embarazo clínico, evolutivo y las tasas de implantación eran significativamente menores que en las que tuvieron un cultivo negativo a estas especies (24% vs. 37%; 17% vs. 28% y 9% vs. 16% respectivamente) (5).

Cuáles son los retos y cómo mejorar los estudios

En el caso del microbioma endometrial la primera dificultad a la hora de establecer un perfil microbiano central es la imposibilidad de comparar los estudios antiguos basados en el cultivo con los nuevos de secuenciación masiva (6). Las nuevas técnicas de secuenciación metagenómica permiten ahondar a nivel de especie, pero la sola presencia de DNA no implica

que haya una bacteria viva, por lo que las técnicas como la metatranscriptómica analizan los procesos de transcripción del RNA bacteriano, plasmando así las funciones que llevan a cabo un determinado conjunto de especies microbianas (2). Los nuevos estudios se enfocan en determinar la configuración del microbioma y de su transcriptómica en determinados estados fisiológicos como las distintas fases del ciclo menstrual. El entendimiento del microbioma del TRF y su modulación dirigida sería esa ansiada herramienta clínica para restaurar el estado fisiológico (11).

Debido a la baja biomasa bacteriana, el estudio del nicho microbiano endometrial supone un reto. Llevar a cabo experimentos bien controlados y diseñados para evitar contaminación, especialmente proveniente del tracto genital inferior, es bastante complicado y suele ser el talón de Aquiles de muchos estudios. En la revisión de Molina *et. al* (6) se recogen una serie de consideraciones metodológicas y unas recomendaciones de buenas prácticas como guía para estandarizar los estudios futuros del microbioma endometrial. Muchos de los trabajos llevados a cabo hasta la fecha son difícilmente comparables entre sí o bien sus resultados hay que tomarlos con cautela por la manera en la que se tomaron las muestras. El muestreo transcervical es proclive a la contaminación desde el tracto genital inferior mientras que la biopsia desde una histerectomía, laparoscopia o durante una cesárea reducen el riesgo de contaminación de la vagina al cérvix significativamente, pero son demasiado invasivas y se estarían llevando a cabo en la mayoría de los casos en mujeres de cierta edad y con patologías subyacentes (7).

Diseño del estudio. Un ejemplo donde el tipo de muestreo lleva a resultados distintos es el caso de dominancia o no de *Lactobacillus* en el endometrio como algunos autores defienden (13,14), e incluso hacen que se cuestione que exista un microbioma endometrial único en todas las mujeres (7). Es de gran importancia la meticulosidad en el diseño, el análisis y la interpretación de los estudios del microbioma y en especial el endometrial. Numerosos factores de confusión como la selección del paciente, los métodos de muestreo y manejo de la muestra, los experimentos de laboratorio y los análisis estadísticos entre otros, pueden llevar a sesgo y poner en peligro la validez, la generalización y confianza en el estudio. Además, el incremento exponencial de los trabajos relativos al microbioma ha crecido de manera exponencial por lo que es importante ser capaz de hacer comparaciones entre ellos facilitando los meta-análisis (6).

Hasta la fecha la mayoría de los estudios carecen de poder estadístico, por lo que el tamaño muestral es otro de los puntos débiles. Para que los estudios sean comparables hay que diseñar estudios de cohortes grandes específicamente adaptados a este nicho de baja biomasa bacteriana (6).

Reproducibilidad. Molina *et. al* (6) hacen hincapié en la importancia de la accesibilidad de los metadatos pudiendo estar disponibles públicamente junto con los datos crudos o sin tratar. Lo que suele suceder es que o los datos no están disponibles o no hay una estandarización de estos. La selección precisa de los pacientes y los controles también determina la calidad del estudio y en los de este tipo hay multitud de variantes en juego (nulípara, múltipara, etc.).

Reducir el alto riesgo de contaminación. Es importante el uso de catéteres especiales y detallar el método de muestreo y el almacenaje de la muestra. Aunque la congelación directa a -80 C es el método de referencia, la opción más sencilla son las soluciones tampón como alternativa ya que estabilizan los ácidos nucleicos a 4°C o incluso a temperatura ambiente (6).

Gran variabilidad técnica de extracción del ácidos nucleicos. Cada técnica tiene sus fortalezas y limitaciones. Muchos programas informáticos emplean estos métodos de homología en base a filogenias calculadas bastante precisos, pero no infalibles. El campo de mejora estaría en la mayor resolución en la secuenciación, una mejor base de datos y más muestra para cubrir todo el espectro microbiano (6).

Análisis metatranscriptómico. Emplea la secuenciación del RNA para aportar información sobre la expresión génica y actividad funcional del microbioma. El punto débil de este análisis es la dificultad en la identificación y eliminación del RNA del paciente. Además, más del 90% del RNA bacteriano que se extrae es de rRNA no codificante y por tanto no informativo (6).

Herramientas bioinformáticas en metagenómica y metatranscriptómica. Molina *et. al* (6) también proponen una lista de las mismas a tener en cuenta. Para armonizar los metadatos de los estudios metagenómicos humanos surge el proyecto “HumanMetagenomeDB”, que explora las posibilidades de los metagenomas humanos de distintos sitios del cuerpo en una “interface” de fácil uso permitiendo un meta-análisis más preciso y “Vaginal Microbiome Consortium” es una base de datos específica de muestras vaginales, quedando pendiente la del endometrio.

Contaminación. Tratándose el endometrio de una zona con una muy baja biomasa, es por lo tanto muy sensible a la contaminación y por tanto la malinterpretación de los datos. El DNA contaminante puede venir de los reactivos, los investigadores, la técnica de muestreo, el ambiente del laboratorio o fungibles de plástico entre otros. El proveniente de los kits de análisis se denomina “kitome” y proviene de las enzimas y compuestos que son de origen bacteriano. La recomendación es llevar a cabo el procesado de todas las muestras una al lado de la otra usando los mismos lotes de reactivos. Se hace de especial importancia en este tipo de muestras de baja biomasa el tener controles durante todo el proceso de muestreo para evitar la contaminación cruzada y distinguir entre contaminantes y la verdadera abundancia de microorganismos provenientes del lugar del muestreo mediante el empleo de tres tipos de controles negativos. Las especies contaminantes identificadas tienen que ser tenidas en cuenta en los análisis e interpretación de los resultados y para evaluar el impacto de la contaminación en los datos hay métodos como restar los contaminantes de las muestras biológicas y usando modelos predictivos. Recomiendan en cualquier caso incluir los datos sin procesar, los meta-datos así como hacer mención a las limitaciones (6).

Implicaciones en RA

En el Proyecto Microbioma Humano proponen que la microbiota vaginal normal constaría de una mayoría de varias especies de *Lactobacillus* junto pequeñas cantidades de *Gardnerella*, *Atopobium* y *Prevotella* entre otras bacterias (2). La combinación de la abundancia de *Lactobacillus* (CST I, II, III y V) junto con una baja diversidad de especies está asociado a mejores resultados reproductivos. Sucede al contrario que con CST IV rico en especies anaeróbicas como *Gardnerella*, *Prevotella* o *Atopobium* asociado con disbiosis y mayor riesgo de pérdida prematura del embarazo en reproducción asistida (11). Las técnicas de RA cambian la composición del microbioma vaginal haciendo que la proporción relativa de *Lactobacillus* se reduzca y se incremente la de las especies patogénicas como la *Prevotella* y *E. Coli*. También se observa una mayor biodiversidad después de la toma de anticonceptivos pautados al comienzo de los tratamientos. Además, el microbioma vaginal presente en el día de la transferencia embrionaria estará afectando al resultado (3).

De ahí la importancia del estudio del microbioma vaginal y endometrial en pacientes con infertilidad ya que podría condicionar los resultados de las técnicas de reproducción

asistida. Se puede predecir la ventana de implantación en función de la cantidad endometrial de *Lactobacillus* spp. en los pacientes de RA. Así mismo, los desplazamientos de la ventana de implantación pueden ser debidos a cambios en la composición del microbioma endometrial provocados por la estimulación ovárica del tratamiento, sugiriendo la estrategia de embriones congelados o tratar de modular el microbioma (11).

No obstante, aunque la mayoría de los estudios proponen que el ambiente para la implantación embrionaria y el mantenimiento del embarazo implica una alta abundancia de *Lactobacillus* spp., no hay un consenso sobre cómo se relaciona la microbiota endometrial con los resultados reproductivos. Mientras que la mayoría de los estudios se han centrado en describir los efectos de géneros o especies individuales de bacterias, la regulación fina de la microbiota parece que es un complejo juego entre comunidades bacterianas. Los resultados de los tratamientos de RA estarían afectados por la combinación de estas comunidades bacterianas de la cavidad uterina y su interacción con el tejido del huésped, lo que implicaría que comunidades de bacterias parecidas podrían llevar a resultados distintos en diferentes pacientes. Con lo cual, una microbiota endometrial sana estaría compuesta por distintas comunidades bacterianas que permitirían la implantación embrionaria y el mantenimiento del embarazo a pesar de una presencia minoritaria de bacterias patogénicas (1).

El microbioma vaginal durante la transferencia embrionaria puede ser caracterizado sin alterar la práctica clínica, pudiendo diferenciar los estados fisiológicos de los patológicos de la microbiota durante la transferencia embrionaria y así determinar su impacto en el éxito de la técnica de reproducción (15). El valor potencial de las especies microbianas como biomarcadores predictores del éxito reproductivo o del fallo de implantación antes de la transferencia embrionaria podría reducir la pérdida de valiosos blastocistos (11).

Cómo puede modularse el microbioma del TRF

Antibióticos y probióticos

Entre los tratamientos disponibles para tratar la disbiosis bacteriana estarían los antibióticos como el secnidazol y la amoxicilina, de probada eficacia contra la VB y la EC y que redundan en una mayor tasa de embarazo y de recién nacido vivo. No obstante, el uso de antibióticos sigue siendo controvertido por afectar también a las bacterias protectoras como los *Lactobacillus*. Con el uso de probióticos como complemento al tratamiento con

antibióticos parece que mejora la cantidad de *Lactobacillus* en estas pacientes. El inconveniente principal de estos probióticos es la dificultad para colonizar el endometrio (por el bajo pH gastrointestinal o bien por la ascensión por la vagina). La vía vaginal da mejores resultados, aunque aún es controvertido. Además, los antibióticos junto con los probióticos no son siempre eficaces presentando algunas bacterias resistencia a los mismos como, por ejemplo, *Gardnerella*, haciendo su uso controvertido (1,15).

Hacen falta más estudios porque la mayoría de los realizados hasta la fecha estaban basados en métodos de cultivo y a veces eran contradictorios entre sí. Los procedimientos realizados en clínica como la histeroscopia otros procedimientos transcervicales podrían estar propiciando la siembra de bacterias en el endometrio y, aunque los efectos adversos ocasionados por estas técnicas se pueden paliar mediante el uso de antibióticos, lo cierto es que se requieren más estudios sobre el uso de antibióticos y su efecto en el microbioma en los TRA (15).

Otra estrategia prometedora en un futuro próximo, aunque aún en su comienzo, es el trasplante de microbiota fecal para el tratamiento de la VB, entre otras afecciones, en mujeres que no han respondido adecuadamente al tratamiento con antibiótico y probiótico (16). También faltan estudios con trasplante de microbiota endometrial (1). Actualmente se está trabajando en el trasplante de microbioma vaginal e incluso en un algoritmo diseñado para la estratificación de las posibilidades de embarazo antes de someterse a un tratamientos de RA en función del perfil microbiano vaginal, lo que permitiría a las parejas realizar decisiones informadas sobre sus tratamientos (17).

Tests de microbiota endometrial

Ya hay disponibles en el mercado una variedad de pruebas para valorar el equilibrio de la microbiota endometrial como ALICE y EMMA (Igenomix). EndomeTRIO está compuesto por una batería de test como EMMA, ALICE y ERA. ALICE analiza la endometritis crónica infecciosa, común en parejas con aborto de repetición (3).

Nutrición y estilo de vida

La promoción de la prevención primaria (estilo de vida) y secundaria (mediante pruebas diagnósticas) en la salud reproductiva de la mujer es esencial. La interacción gen-nutrientes como papel fundamental en el manejo de la salud y la prevención de la enfermedad

nos lleva a las ciencias de la nutrigenómica y nutrigenética, las cuales estudian las relaciones entre las variaciones genéticas y los requerimientos nutricionales (18).

El estudio de los factores bioconductuales es un campo interdisciplinar centrado en la integración de comportamientos, estilo de vida, funcionamiento psicosocial y medicina para mejorar la prevención y tratamiento de los procesos de enfermedad bioconductuales. Se está buscando una conexión entre estos factores bioconductuales, sociales, gestación y nacimiento y el microbioma vaginal (15).

Las infecciones del TRF se pueden dividir en tres grupos, las de transmisión sexual, las ocasionadas por el sobrecrecimiento bacteriano y las que surgen tras un tratamiento (aborto o inserción de dispositivos intrauterinos). La malnutrición (la desnutrición o la sobrenutrición), aumenta la sensibilidad dichas enfermedades infecciosas. La VB se asocia a una baja concentración de vitamina D (<20 nmol/L o <30 nmol/L) y la suplementación de esta es efectiva en la eliminación de VB. La etnia tiene influencia en los niveles de vitamina D, de VB y del resultado del embarazo, por ejemplo, las mujeres africanas tienen más probabilidades de ser diagnosticadas con VB ya que su microbiota es más sensible a ser colonizada por las bacterias típicas de la VB. Las dietas ricas en grasas y azúcar y baja densidad nutricional también se correlacionan con la VB, y al contrario pasa con el consumo de folato, vitamina E y calcio que se correlaciona de manera negativa con la VB. Las dietas ricas en carbohidratos incrementan el índice glicémico en el tracto vaginal siendo favorable para los *Lactobacillus*. Una dieta deficiente en vitaminas A, C, D y E y folato, calcio y beta carotenos pero rica en grasas y azúcares, causa infecciones como la VB, relacionadas con diversos cánceres, e incrementan el riesgo de infecciones como VIH o papilomavirus y están relacionados con parto prematuro. Así pues, los nutrientes juegan un papel relevante en la alteración de la diversidad del microbioma vaginal (18).

Discusión

El conocimiento que se ha adquirido sobre las distintas zonas del TRF ha venido determinada en parte por su accesibilidad para el muestreo. La vagina siendo la zona más accesible en primer lugar, seguida de cérvix, útero y trompas de Falopio. De las trompas de Falopio de hecho faltan aún muchos estudios (5).

El salto exponencial en los estudios ha venido con el paso de la culturómica a las modernas técnicas de secuenciación de nueva generación y al Proyecto Microbioma Humano, con mucha más capacidad de resolución a nivel de especie y que sienta las bases para establecer la firma de la microbiota del TRF normal (2).

Por otro lado, la detección de DNA no quiere decir que exista un microorganismo vivo, como punto débil de la secuenciación NGS por lo que la caracterización de los metabolitos generados por la comunidad microbiana (meta-metaboloma) arrojará luz sobre las funciones microbianas en el endometrio y la interacción con el huésped (6).

Parece que hay consenso en que falta una estandarización del estudio del microbioma y en especial del endometrial, que impide comparar entre los estudios existentes, requisito imprescindible si se quiere seguir avanzando en la búsqueda de microbioma uterino central, “core” o normal. La falta de estandarización viene dada por la alta complejidad asociada al estudio del microbioma. La toma invasiva de las muestras y la facilidad de contaminación, la baja masa microbiana en el útero y su difícil análisis, así como condiciones médicas preexistentes pueden provocar oscilaciones de lo que se consideraría el microbioma “normal”. Dado que esta configuración puede variar entre individuos, esta es una gran limitación para la comparación entre las comunidades bacterianas y su clasificación en eubióticas o disbióticas (11).

Con la idea de unificar y estandarizar dichos estudios se proponen tres requerimientos mínimos a seguir por los investigadores. La descripción detallada de los métodos empleados en la extracción de los ácidos nucleicos, por un lado. Incluir y describir controles negativos y positivos, así como reportar la contaminación de las muestras en blanco por otro y, por último, seguir el mismo protocolo durante todo el proyecto (6).

El uso de antibióticos como medida profiláctica en los procedimientos de los tratamientos de FIV y su efecto sobre la tasa de implantación está aún por ser dilucidado. Hay

muchas publicaciones científicas en el campo del microbioma del TRF pero con poca aplicación a las TRA y a la clínica, a pesar de la creciente evidencia que hay sobre el importante papel que juegan los factores embrionario/fetal y el microbioma materno en la fertilidad y por tanto en los resultados de las técnicas de reproducción asistida (15).

Entre las perspectivas futuras, es importante entender los aspectos funcionales y mecanicistas de la microbiota del TRF para poder deducir la relación de esta con eventos adversos en ciclos de FIV (1). Así mismo y aunque se escapa al objeto de estudio de este trabajo, el semen también es portador de su propio microbioma, mucho menos estudiado, pero que afecta a su pareja y deberá ser tenido en cuenta (15).

Respondiendo a la pregunta realizada en el apartado de hipótesis, ¿El estudio de la microbiota del tracto reproductor femenino tiene una aplicación clínica real en la reproducción asistida a día de hoy? Aún no hay recomendaciones clínicas para el estudio del microbioma del tracto reproductor femenino y su modulación, pero abre un nuevo horizonte a la medicina personalizada (11). Con un mejor entendimiento del microbioma, se podrían emprender tanto terapias protectoras como curativas con probióticos u otros productos expresamente diseñados (16). Para lo cual es necesario diseñar estudios prospectivos y muestreos mejorados con mayor potencia y frecuencia de muestreo. Las técnicas metagenómicas, metatranscriptómicas, metabolómicas y/o proteómicas y las caracterizaciones inmunológicas detalladas combinadas con sistemas nuevos de modelización y estadística serán cruciales para avanzar en la mejora de la salud reproductiva femenina (12).

Conclusiones

- Ha habido un crecimiento exponencial de los estudios del microbioma del TRF especialmente desde la aparición de las nuevas técnicas de secuenciación y el Proyecto Microbioma Humano.
- La composición del microbioma depende de muchos factores y es fluctuante a lo largo de la vida del individuo.
- La existencia de un núcleo, bien taxonómico microbiano o bien funcional del TRF (el conjunto de funciones metabólicas microbianas) que confiere un estado eubiótico, sigue sin ser dilucidado.
- Distintas composiciones bacterianas están relacionadas con distintos desordenes ginecológicos y reproductivos, aunque no hay consenso sobre cómo se relacionan.
- Hay controversia en si el ambiente para la implantación embrionaria y el mantenimiento del embarazo implica una alta abundancia de *Lactobacillus spp.*, o por el contrario ausencia de bacterias patógenas.
- Falta estandarización en los estudios que impide la comparación de los resultados y la obtención de conclusiones en parte debido a las fluctuaciones del microbioma del TRF.
- Faltan más estudios robustos sobre el uso de antibióticos y probióticos para la modulación del microbioma del TRF en el ámbito de la RA así como de nutrición y estilo de vida.
- La aplicación clínica del conocimiento del microbioma a las técnicas de RA aún no está extendida más que en los casos obvios de infección en el TRF pero se abre la puerta a la medicina personalizada en este ámbito.

Bibliografía

1. Toson B, Simon C, Moreno I. The endometrial microbiome and its impact on human conception. Vol. 23, International Journal of Molecular Sciences. MDPI; 2022.
2. Huttenhower C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, Chinwalla AT, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature. 2012 Jun 14;486(7402):207–14.
3. Sehring J, Jeelani R. Human implantation: The complex interplay between endometrial receptivity, inflammation, and the microbiome. Placenta. 2022 Jan 1;117:179–86.
4. Baker JM, Chase DM, Herbst-Kralovetz MM. Uterine microbiota: Residents, tourists, or invaders? Vol. 9, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2018.
5. Vitale SG, Ferrari F, Ciebiera M, Zgliczyńska M, Rapisarda AMC, Vecchio GM, et al. The role of genital tract microbiome in fertility: A systematic review. Vol. 23, International Journal of Molecular Sciences. MDPI; 2022.
6. Molina NM, Sola-Leyva A, Haahr T, Aghajanova L, Laudanski P, Castilla JA, et al. Analysing endometrial microbiome: Methodological considerations and recommendations for good practice. Vol. 36, Human Reproduction. Oxford University Press; 2021. p. 859–79.
7. Winters AD, Romero R, Gervasi MT, Gomez-Lopez N, Tran MR, Garcia-Flores V, et al. Does the endometrial cavity have a molecular microbial signature? Sci Rep. 2019 Dec 1;9(1).
8. Reschini M, Benaglia L, Ceriotti F, Borroni R, Ferrari S, Castiglioni M, et al. Endometrial microbiome: sampling, assessment, and possible impact on embryo implantation. Sci Rep. 2022 Dec;12(1).
9. Chen C, Song X, Wei W, Zhong H, Dai J, Lan Z, et al. The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. Nat Commun. 2017 Dec 1;8(1).
10. Baker JM, Al-Nakkash L, Herbst-Kralovetz MM. Estrogen–gut microbiome axis: Physiological and clinical implications. Vol. 103, Maturitas. Elsevier Ireland Ltd; 2017. p. 45–53.

11. Punzón-Jiménez P, Labarta E. The impact of the female genital tract microbiome in women health and reproduction: a review. Vol. 38, Journal of Assisted Reproduction and Genetics. Springer; 2021. p. 2519–41.
12. Kroon SJ, Ravel J, Huston WM. Cervicovaginal microbiota, women's health, and reproductive outcomes. Vol. 110, Fertility and Sterility. Elsevier Inc.; 2018. p. 327–36.
13. Moreno I, Garcia-Grau I, Perez-Villaroya D, Gonzalez-Monfort M, Bahçeci M, Barrionuevo MJ, et al. Endometrial microbiota composition is associated with reproductive outcome in infertile patients. Microbiome. 2022 Dec 1;10(1).
14. Moreno I, Garcia-Grau I, Bau D, Perez-Villaroya D, Gonzalez-Monfort M, Vilella F, et al. The first glimpse of the endometrial microbiota in early pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 2020 Apr 1;222(4):296–305.
15. García-Velasco JA, Menabrito M, Catalán IB. What fertility specialists should know about the vaginal microbiome: a review. Vol. 35, Reproductive BioMedicine Online. Elsevier Ltd; 2017. p. 103–12.
16. Molina NM, Sola-Leyva A, Jose Saez-Lara M, Plaza-Diaz J, Tubic-Pavlovic A, Romero B, et al. New opportunities for endometrial health by modifying uterine microbial composition: Present or future? Vol. 10, Biomolecules. MDPI AG; 2020.
17. Koedooder R, Singer M, Schoenmakers S, Savelkoul PHM, Morré SA, de Jonge JD, et al. The vaginal microbiome as a predictor for outcome of in vitro fertilization with or without intracytoplasmic sperm injection: A prospective study. Human Reproduction. 2019 Jun 4;34(6):1042–54.
18. Ciebiera M, Esfandyari S, Siblini H, Prince L, Elkafas H, Wojtyła C, et al. Nutrition in gynecological diseases: Current perspectives. Vol. 13, Nutrients. MDPI AG; 2021.

Anexo

Tabla de definiciones adaptada de García-Velasco *et al.* (15)

| | |
|-------------------|---|
| Microbiota | Los táxones microbianos asociados a un ambiente y que pueden ser revelados mediante técnicas moleculares como la secuenciación del gen 16S rRNA. |
| Microbioma | Se refiere al hábitat como tal y comprendería tanto el factores bióticos como abióticos y abarcando el genoma de los microorganismos y del huésped, así como factores medioambientales. |
| Metagenoma | El total de genomas y genes de los habitantes del microbioma. |
| Metatranscriptoma | El total de transcritos génicos en una comunidad en un tiempo determinado de muestreo. |
| Metaproteómica | El total de las proteínas de una comunidad en un momento determinado. |
| Culturómica | Método de determinación de la composición de una comunidad microbiana mediante métodos de cultivo de alto rendimiento. |
| <i>Biofilm</i> | Tapiz bacteriano unido a una superficie viva o inerte formada por células microbianas adheridas entre sí y rodeadas por la matriz polimérica extracelular autoproducida. |
| Disbiosis | Cambios cualitativos y cuantitativos en la actividad metabólica y la distribución de la microbiota. |
| Probiótico | Microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios en el huésped. |