

Microbiota del tracto genital femenino

Female genital tract microbiota

María Teresa Hato Castro, Vicente López Villaverde
Embryocenter. Sevilla

RESUMEN

Los microorganismos que colonizan de manera fisiológica el organismo humano (microbioma) están en la actualidad siendo objeto de estudios y proyectos de investigación cada vez más atractivos. La microbiota del tracto urogenital femenino y su diversidad se han visto especialmente relacionados con resultados reproductivos de tratamientos de FIV, de posibles complicaciones gestacionales y de condiciones generales de salud femenina. Aunque se pensaba que en la cavidad uterina el ambiente era estéril se ha comprobado que no solo no es así, sino que igualmente la microbiota uterina puede influir en el éxito reproductivo de la mujer. Existe una variedad de estudios que pretenden establecer el panel de microorganismos vaginales y uterinos que puedan favorecer o perjudicar los resultados reproductivos. Aunque se podría considerar viable la utilización de prebióticos, probióticos y antibióticos para el establecimiento de una microbiota favorable en este ambiente, aún se necesita más información para valorar si esto es posible y de qué manera.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2020; 37; © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Palabras Clave: *Microbioma, microbiota, fertilidad, endometritis crónica, metagenómica*

Aceptado: 27/1/2020

Correspondencia: Vicente Lopez Villaverde

vlopezvilla@gmail.com mthato@embryocenter.es

SOLICITUD REIMPRESIÓN: Email: fertilidad@editorialmedica.com

SUMMARY

Microorganisms that physiologically colonize human organism (microbiome) are currently subject of new interesting studies and research projects. Female urogenital microbiota and its diversity are especially related to IVF results, gestational complications and general conditions of female health. Although it was thought that uterine environment was sterile, it has been proven not only that this is false, but also that uterine microbiota can influence reproductive success. There is a variety of studies that try to establish a panel of vaginal and uterine microorganisms that may favour or impair reproductive outcomes. Furthermore, although using prebiotics, probiotics and antibiotics for the establishment of favourable microbiota could be considered viable, more information is needed to assess whether this is possible and in what way.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2020; 37; © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

Key words: *Microbiome, microbiota, fertility, chronic endometritis, metagenomics*

INTRODUCCIÓN

El término Microbioma ha sido usado indistintamente para referirse a los genomas que contienen los microorganismos y para aludir a un ecosistema constituido por la comunidad de microorganismos y sus genomas. En la actualidad, el término microbioma hace referencia a los microorganismos comensales que colonizan y viven de manera fisiológica en el organismo humano.

La presencia de diferentes factores fisiológicos, ambientales o nutricionales en determinados entornos específicos condiciona la existencia de distintas comunidades de microorganismos, denominadas microbiotas. Ejemplos de ellas son las microbiotas respiratoria, epitelial, oral, intestinal, o del tracto urogenital.

Es importante tener presente que el microbioma no es estático, sino que difiere y es característico de cada individuo porque se construye a partir de la interacción constante de su genética con el medio ambiente, dieta, fármacos, o edad.

Como los más de 10 (13) microbios presentes coexisten con las 10 (12) células en el organismo humano (1), su desequilibrio puede ser origen tanto de alteraciones en la respuesta inmune, como de patologías tan diferentes como la diabetes, el autismo, el intestino irritable, la obesidad o la depresión (2).

En el tracto genital femenino, la concentración bacteriana durante la época fértil de la mujer es de unos 10 (8) microorganismos/ml en la vagina (3) (representa aproximadamente el 9 % de la carga bacteriana total en humanos (4)) y está sometida a cambios dependientes de la influencia hormonal. La microbiota vaginal está dominada por *Lactobacillus*, que protegen a la mucosa del establecimiento de patógenos y mantienen un ecosistema saludable minimizando el riesgo de infección (5).

Los lactobacilos vaginales juegan un papel decisivo en el mantenimiento y la homeostasis del medio microbiano local

al disminuir el pH a través de la producción de ácido láctico.

Aunque durante mucho tiempo se ha pensado que la cavidad uterina humana no contenía gérmenes, en la actualidad sabemos que existe una microbiota en su interior que se caracteriza por la composición dominante de *Lactobacillus* (6). Este estatus de dominancia del *Lactobacillus* (≥ 90 %) parece ser de suma importancia para el proceso reproductivo ya que se ha correlacionado positivamente con la implantación de embriones en los ciclos de Fecundación in vitro y transferencia embrionaria (FIV-TE) en mujeres infértiles, mientras que una microbiota no dominante de *Lactobacillus* se ha asociado a un mal resultado reproductivo caracterizado por fallos de implantación y aborto involuntario (7).

Los avances tecnológicos aplicados en este campo han permitido que el estudio del microbioma ya no se fundamente en el cultivo bacteriano sino en la METAGENÓMICA, es decir en la identificación de su huella genética partiendo del ADN obtenido de muestras de diferentes entornos naturales sin necesidad de cultivarlas. El ADN extraído se amplifica y se secuencian los genes que codifican para la subunidad 16S del ARN ribosomal, una región que está presente en todas las bacterias actuales y cuya estructura y función han permanecido constantes a lo largo del tiempo. La subunidad 16S del ARN ribosomal está considerada como la diana universal para la identificación bacteriana por sus características y propiedades que permiten la categorización taxonómica de las bacterias, pudiendo discernir hasta nivel de género y en algunos casos de especie (8). La utilización del gen de referencia, junto con las técnicas moleculares de secuenciación masiva y las herramientas para análisis de datos, han permitido disponer de una información sobre el microbioma humano con un nivel de detalle sin precedente en cuanto a taxonomía y función de los microorganismos.

Precisamente la biodiversidad de esta microbiota es uno de los principales indicadores de su salud y para caracterizarla,

Whittaker (9) clasifica la biodiversidad en alfa y beta. Se define como diversidad α , a la riqueza de especies dentro de una comunidad, a la que consideramos homogénea, y que puede ser medida en función del número de especies presentes, o bien según la distancia filogenética que hay entre ellas (10).

La diversidad β mide las diferencias en la composición bacteriana de una o más muestras tomadas en lugares distintos en un mismo tiempo, o bien en el mismo lugar, pero en distintos momentos. La diversidad β se puede medir de forma cuantitativa (abundancia de los microorganismos observados) o cualitativa (presencia o ausencia).

Aunque las especies bacterianas en cavidad endometrial y en vagina se ha comprobado que son similares dentro del mismo individuo, las mediciones de diversidad indican que el útero tiene una mayor diversidad α que la vagina y que las comunidades bacterianas son bastante diferentes entre estos dos hábitats (10).

MICROBIOTA VAGINAL

Su fácil accesibilidad ha conducido a que la mayoría de los estudios sobre el microbioma del tracto reproductivo femenino se hayan centrado en la vagina. La microbiota vaginal está compuesta por bacterias comensales que viven de manera simbiótica con el huésped y le proporciona una barrera mecánica e inmunológica local de protección frente a posibles patógenos.

Una microbiota vaginal saludable en mujeres sanas y en edad reproductiva presenta una biomasa de, aproximadamente, mil millones de bacterias de baja diversidad por gramo de fluido vaginal. Está compuesta principalmente por una o pocas especies de *Lactobacillus spp.*, que representan el 90 %-95 % del total de bacterias del tracto reproductivo (11-13).

Los filotipos más comunes de *Lactobacillus spp.* son: *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii*; y su presencia ha permitido tipificar la microbiota en diferentes grupos denominados *perfiles de estado comunitario de Ravel* (I, II, III y V). El tipo IV está relacionado con la vaginosis bacteriana (BV) y se define como un perfil microbiano diverso donde ningún *Lactobacillus* tiene una presencia significativamente dominante sobre las otras bacterias presentes (14).

a) Función de la microbiota:

La protección de los lactobacilos se basa en su capacidad de acidificar el ambiente vaginal a través de la producción de ácido láctico, H₂O₂, bacteriocinas, glucógeno y glicerol, que ayudan en la protección contra los patógenos invasores

y aseguran que los lactobacilos sigan siendo la presencia dominante. La acidez alcanzada por *L. crispatus* es más alta que la que producen *L. iners*, *L. jensenii* y *L. gasseri* (14-16).

La producción de ácido láctico facilita la liberación de componentes del sistema inmune innato que inhiben el crecimiento de bacterias que no sean lactobacilos. Al mismo tiempo, los lactobacilos actúan como una barrera mecánica que al unirse a la superficie de las células epiteliales vaginales, evitan la unión de otras bacterias que podrían influir en estas células epiteliales (15).

B) COMPOSICIÓN:

Como se comentó anteriormente, la microbiota vaginal no es estable en su composición sino que varía en función del origen étnico, higiene personal, actividad sexual o la fase del ciclo menstrual, entre otros factores (17). Las mujeres hispanas, africanas y afroamericanas tienen menos abundancia de *Lactobacillus spp.* y un nivel de pH promedio más alto que las mujeres asiáticas y caucásicas. Posiblemente esta circunstancia podría explicar la relación existente entre el origen étnico y el parto prematuro, la prevalencia de inflamación vaginal, infecciones de transmisión sexual (ITS), o problemas de fertilidad como el aborto espontáneo (18, 19). Es importante tener presente que las diferencias étnicas en el microbioma vaginal se mantienen entre las mujeres embarazadas y esta circunstancia supone un motivo de preocupación para las poblaciones con altos perfiles de microbioma vinculados a la vaginosis bacteriana (BV) por su mayor riesgo de complicaciones (20).

Respecto a la composición de la microbiota vaginal en función de la edad, sabemos que el elevado nivel de estrógenos durante la época reproductiva es el determinante para que el *Lactobacillus* domine en esta fase de la vida, pero esto no ocurre durante la infancia, en la que predominan los anaerobios y la *Escherichia coli*, ni tras la menopausia, por el estado hipoestrogénico endógeno.

Otro aspecto de interés es que una microbiota vaginal saludable puede albergar otros lactobacilos (*L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. salivarius* y *L. vaginalis*) y también otras bacterias, ya que las cantidades bajas de anaerobios como *Prevotella*, *Megasphaera*, *Gardnerella vaginalis* y *Atopobium vaginae*, pueden colonizar la vagina sin provocar alteraciones (16).

Sin embargo, cuando la composición del microbioma se perturba y entra en disbiosis, se generan condiciones que facilitan la colonización de bacterias oportunistas que conducen a la BV (11) y, como consecuencia, a un riesgo aumentado de pérdida del embarazo, parto prematuro, aborto

espontáneo y una disminución significativa de la tasa de concepción (18, 21, 22). En estas situaciones de disbiosis, el huésped también tiene entre dos y tres veces más probabilidades de infectarse por *C. trachomatis* (23, 24) ya que la colonización por *Prevotella spp.*, considerablemente más abundante en estas condiciones, produce triptófano que puede ser usado por la *C. trachomatis*, facilitando la infección (25).

C) IMPLICACIONES REPRODUCTIVAS EN LAS TÉCNICAS DE REPRODUCCIÓN ASISTIDA (TRA):

La relación entre microbiota y resultados de las técnicas de FIV supone un motivo actual de preocupación y de estudio. Durante la transferencia embrionaria no es raro que la punta del catéter contamine la cavidad endometrial con moco cervical (26, 27) que porta grandes cantidades de bacterias procedentes de la microbiota vaginal.

En un metanálisis de Singer (28) sobre una cohorte de 1095 participantes (893 con microbiota vaginal normal y 202 con microbiota vaginal anormal), se seleccionaron seis estudios que abordaban la relación entre la composición de la microbiota vaginal y el resultado del tratamiento de FIV. Se observó una correlación negativa (OR 0.66) entre microbiota vaginal anormal y el desarrollo temprano del embarazo.

En un estudio prospectivo sobre 303 mujeres para conocer si el microbioma vaginal es predictor del resultado de la fecundación in vitro, con o sin inyección intracitoplasmática (ICSI) (29), fueron seleccionadas 192 pacientes a las que se les hizo transferencia embrionaria en día +3. Los autores identificaron un algoritmo predictivo de fallo gestacional, que denominaron *perfil desfavorable*, caracterizado por: *Lactobacilos* <20 %, carga relativa de *L. jensenii* >35 % y presencia de *G. vaginalis IST1* o Proteobacteria >28 % del total de bacterias. Este subgrupo de mujeres (17,7 %, n=34)

tenían pocas posibilidades (5,9 %) de quedarse embarazadas después de una nueva transferencia.

Esta baja probabilidad se predijo correctamente en 32 de 34 mujeres lo que supuso una precisión predictiva del 94 % (sensibilidad 26 %, especificidad 97 %).

Además, cuando el perfil del microbioma resultó *favorable*, también fue posible diferenciar dos grupos con distinto pronóstico gestacional en función de la abundancia relativa de *L. crispatus*: las mujeres con una abundancia relativamente alta (≥ 60 %) de *L. crispatus* (63/192 mujeres) tenían menos posibilidades de quedar embarazadas que las que tenían menos del 60 % (50 de 95), 24 % vs. 53 %.

Esto no ocurría en las mujeres con una abundancia relativamente alta (≥ 60 %) de *L. iners* (38/192 mujeres, 20 %), ya que éstas tenían un 50 % de posibilidades de quedar embarazadas después de TE (19/38 mujeres).

El resultado gestacional en función del tipo del tipo de comunidad bacteriana (CST), definida según la población dominante (I (*L. crispatus*), II (*L. gasseri*), III (*L. iners*), V (*L. Jensenii*), IV (*heterogéneo*)), fue favorable para los CST I, II, III y desfavorable para los IV y V. En la figura 2, se resumen las características de los distintos perfiles.

Los autores concluyeron que el análisis del microbioma vaginal antes del tratamiento podría ofrecer una oportunidad para mejorar la tasa de éxito de la FIV o la FIV-ICSI. Una gran abundancia de *Lactobacillus* parece ser ventajosa para el resultado de FIV y FIV- ICSI, pero una alta abundancia (> 60 %) de *L. crispatus* no es favorable.

Resulta tentador pensar que el uso de perfiles de microbioma permitiría aconsejar a las mujeres y posponer su ciclo de FIV hasta poseer un perfil favorable, o bien aplazar la primera transferencia en fresco hasta que el perfil de la microbiota fuera más propicio. Sin embargo, todavía desconocemos cuándo, por qué y con qué frecuencia, la

FIGURA 1

: Perfiles de la microbiota vaginal según su composición

MICROBIOTA	PERFIL SALUDABLE	PERFIL DESFAVORABLE
Características	Lactobacillus spp.: L. crispatus L. gasseri L. iners L. jenseni	Gardnerella vaginalis Mobiluncus spp. Atopobium vaginae prevotella Megasphaera M. genitalium
Mecanismo de acción	↑ ácido láctico, H ₂ O ₂ , glucógeno bacteriocinas, glicerol ↓ pH	↓ H ₂ O ₂ ↑ triptófano, pH

FIGURA 2

Perfiles de la microbiota vaginal en el éxito reproductivo

PERFIL FAVORABLE	PERFIL DESFAVORABLE
<p>L. crispatus: >20% <60%</p> <p>L. iners >60%</p> <p>CST: I, II, III</p>	<p>Lactobacilos <20%</p> <p>Carga relativa de L. jensenii >35%</p> <p>G. vaginalis IST1 o Proteobacteria >28% del total de bacterias</p> <p>CST: IV, V</p>

composición de la microbiota local cambia espontáneamente. Estudios sobre la estabilidad del microbioma vaginal, referidos a la dinámica de las cinco clases principales de comunidades bacterianas (CST) mostraron que algunas comunidades pueden cambiar notablemente en cortos períodos de tiempo, pero que la mayoría son relativamente estables durante varios meses (17).

Otra opción terapéutica sería la modulación de la microbiota vaginal desfavorable hacia un perfil más favorable, mediante antibióticos, prebióticos o probióticos. Por desgracia, en la actualidad se necesita más investigación para dilucidar si las mujeres con un perfil de microbioma desfavorable pueden realmente cambiar a un perfil favorable y si eso, posteriormente, aumentaría sus posibilidades de lograr un embarazo.

Existen, sin embargo, otros estudios que no comparten estos resultados. Un reciente trabajo prospectivo realizado en 150 mujeres caucásicas sometidas a FIV-ICSI con ovocitos donados (30), concluyó que el perfil de microbiota vaginal similar a la BV en el momento de la transferencia embrionaria no guardaba relación con la tasa de nacidos vivos. El perfil de microbiota vaginal para cada muestra estuvo basado en el número de copias de cada microorganismo por muestra de fluido vaginal y en la abundancia relativa de cada especie bacteriana, normalizada a la carga bacteriana total detectada y ajustada para el contenido de ADN genómico (ADNg) humano.

La prevalencia de los perfiles dominados por *Lactobacillus* fueron similares entre las mujeres con o sin nacidos vivos (80,4 % vs. 74,2 %) y entre las que gestaron vs. no gestaron o tuvieron aborto bioquímico.

Sin embargo el *L. crispatus* demostró poseer un comportamiento favorable para el éxito reproductivo ya que fue significativamente predominante en las mujeres gestantes con nacido vivo (P = 0,021).

CORRELACIÓN ENTRE MICROBIOTA VAGINAL Y URINARIA

El estudio de la microbiota urinaria no formó parte inicial del Proyecto del Microbioma Humano, cuya finalidad fue la de catalogar la composición microbiana de adultos sanos y determinar cómo los cambios en las comunidades microbianas (microbiota) pudieran afectar a la salud humana. Este hecho, junto con el cual la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha parecen estar relacionados con su papel en las ITUs o en las incontinencias, explican la pobreza informativa respecto al papel de esta microbiota en el éxito reproductivo.

La microbiota urinaria muestra similitudes con la vaginal aunque la cantidad de bacterias en la orina sea mucho menor (31).

La correlación entre ambas microbiotas fue confirmada tras la punción vesical suprapúbica para evitar contaminación vaginal. Probablemente, la explicación se base en la propagación de bacterias desde la vagina y uretra (32).

Un estudio piloto que relacionó la composición del microbioma urinario antes del inicio del tratamiento de FIV o FIV-ICSI (33) con el resultado del tratamiento (definido como embarazo en curso después de un ciclo de tratamiento) y las tasas de embarazo dentro de un año después del inicio del tratamiento, reveló que en función de la composición del microbioma es posible separar a las mujeres en dos grupos: mujeres que quedarán embarazadas y las que no quedarán.

El panel de prueba tenía una especificidad del 96 % y una sensibilidad del 81 %, y al agregar la especie *Bacillus RG4*, la especificidad mejoró hasta el 100 %.

Este alto valor predictivo podría usarse para seleccionar a aquellas mujeres que no deberían ser sometidas a tratamiento ya que tendrían una alta probabilidad de no quedarse embarazadas.

Por este motivo, en la actualidad está en marcha el estudio ReceptIVFity, un estudio prospectivo del microbioma urogenital de mujeres subfértiles en edad reproductiva que se llevará a cabo en ocho centros de FIV en los Países Bajos y cuyo objetivo principal es evaluar la especificidad y la sensibilidad de la composición de microbiomas urinarios y vaginales para la predicción del fracaso de la implantación de embriones en un procedimiento consecutivo de FIV o FIV-ICSI (34).

LA MICROBIOTA DE LA CAVIDAD UTERINA

Mientras que un endometrio sano es la base para una implantación exitosa, la infección intrauterina se ha considerado como causa de muchas complicaciones reproductivas (35). La creencia mantenida durante casi un siglo de que la cavidad uterina sana era estéril porque el tapón cervical (36) actuaba a modo de una barrera impermeable a la ascensión bacteriana desde la vagina (37) fue rebatida en la década de los años 80 ante los resultados obtenidos por los cultivos endometriales y por la constatación de la existencia de una bomba peristáltica uterina natural. Este peristaltismo capaz de promover el transporte espermático desde el canal cervical al útero, y de desplazar microesferas desde vagina hacia el útero, tendría un papel importante en el ascenso y siembra de bacterias en el útero (38).

La investigación de la microbiota endometrial no ha sido fácil por su complejidad, derivada de: a) la baja abundancia de bacterias en el útero, estimada por Chen como de 10.000 veces menor que en vagina (39), b) la dificultad para el cultivo, solo el 1 % de las bacterias son cultivables (40), y c) la posibilidad de contaminación de las muestras, circunstancia que podría contribuir a resultados falsamente elevados y a la imposibilidad de determinar si las bacterias uterinas son residentes o transitorias.

A partir de 2007, el desarrollo de nuevas herramientas basadas en tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) permitió mejorar los conocimientos ofrecidos por los métodos dependientes del cultivo, identificando la gama completa de bacterias uterinas no necesariamente cultivables y evaluando de manera mucho más completa la composición bacteriana uterina. Sin embargo, aún quedaba la duda de si, dada la escasez de microorganismos en el útero, las bacterias cuantificadas por NGS eran, o no, bacterias viables.

Ahora la NGS debería hacer frente a este interrogante y superar otras dificultades añadidas derivadas de:

a) la distinta rigurosidad metodológica empleada en los grupos control para evitar la contaminación cruzada con la microbiota cervical, b) el tamaño reducido de la cohorte de

sujetos y su repercusión sobre el poder estadístico de los estudios, c) las diferencias étnicas y socioeconómicas que podrían alterar los factores de riesgo, d) la incorrecta inclusión de controles negativos (las mujeres en tratamiento de FIV sin factor masculino adverso no serían ejemplo de controles saludables debido a su propia infertilidad), y e) la falta de una metodología estandarizada para las NGS dependiente de la elección de los cebadores específicos empleados para la región V del gen 16S rRNA (que podrían alterar la representación de ciertos taxones), o de los métodos de extracción de ADN y la clasificación de unidades taxonómicas operativas.

Como consecuencia de todo ello, en la actualidad resulta difícil definir de manera consensuada una microbiota uterina como “saludable”. Las bacterias más abundantes en él pertenecen consistentemente a los siguientes filos: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria* (41), mientras que *Gardnerella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Atopobium* y *Sneathia* están presentes en proporciones menores (42).

Dentro de los *Firmicutes*, el género *Lactobacillus* es un componente muy destacado en la mayoría de los estudios de microbioma uterino y supone un hallazgo consistente entre los informes hasta la fecha. La fuente de *Lactobacillus* en el útero se explica fácilmente por la abundancia de este género bacteriano en la vagina cercana y su presencia en el útero podría ser considerada como una contaminación y no servir necesariamente como un predictor de la salud uterina.

Aún hoy, quedan muchas dudas a resolver para tener una comprensión sólida y global del papel de la microbiota endometrial: ¿es estable?, ¿influye en la fertilidad?, ¿se altera con las manipulaciones derivadas de las TRA?, ¿modula la funcionalidad endometrial?, ¿podría generar patologías endometriales?, ¿son útiles los probióticos?, ¿modifica el pH?...

Intentaremos responder a estas cuestiones:

1) ¿Es estable?

Existen trabajos que han estudiado si la microbiota endometrial es, o no, estable, es decir, si cambia con el tiempo o durante el ciclo menstrual. A favor de la estabilidad están los resultados de un estudio que evaluó puntas de catéter de FIV en dos puntos de tiempo diferentes (durante la fases pre-receptiva y receptiva del mismo ciclo menstrual), concluyendo que el microbioma uterino fue similar en 9 de 13 pacientes (2). Otro trabajo, sobre siete voluntarias sanas, concluyó también en los mismos términos, el porcentaje de *Lactobacillus* endometrial en las mujeres sanas fue altamente estable dentro del mismo ciclo menstrual e incluso en el siguiente ciclo (43).

Sin embargo, el corto período de tiempo estudiado y el es-

caso tamaño muestral en ambos casos sugieren asumir estos resultados con prudencia.

2) ¿Influye en la fertilidad?

El éxito reproductivo en una cohorte de 35 mujeres sometidas a FIV a las que se recogieron muestras de endometrio antes de la transferencia embrionaria, fue significativamente favorable para el grupo con *Lactobacillus spp* dominante (LD:>90 %) respecto del no dominante (NLD: <90 % con >10 % de otras bacterias), con mejores tasas de implantación (P=0,02), embarazos (P=0,03) y nacidos vivos (P=0,002) (2).

Este perfil de endometrio saludable (>90 % de *Lactobacillus ssp*) fue corroborado en otro estudio sobre 102 pacientes infértiles (79 con ciclo de FIV y 23 sin FIV) y siete voluntarias sanas. El porcentaje de microbiota dominante de *Lactobacillus ssp* (LD>90 %) en el endometrio difería entre los tres grupos (voluntarias sanas: 85,7 %, infértiles sin FIV: 73,9 %, infértiles con FIV: 38 %). La proporción de LD>90 % en vagina tuvo un comportamiento similar al endometrial para estos tres grupos. Concluyeron los autores que aumentar el nivel endometrial de *Lactobacillus* > 90 % podría favorecer el resultado de la implantación en pacientes infértiles con lactobacilo no dominante (43).

3) ¿Se altera la microbiota con las manipulaciones derivadas de las TRA?

Es posible que las manipulaciones inherentes a las técnicas de reproducción asistida tengan capacidad para alterar el microambiente local uterino (sembrando nuevas bacterias o modificando la microbiota uterina previa) y afectar al éxito reproductivo.

Sabemos que las tasas de embarazo clínico disminuyen cuando es factible cultivar bacterias de la punta del catéter de FIV empleado durante la transferencia embrionaria (44), pero este resultado podría ser explicado simplemente por la contaminación cruzada con la microbiota vaginal, que cuando se asocia a especies no *Lactobacillus* produce resultados reproductivos adversos (45).

4) ¿Cómo modula la microbiota endometrial la funcionalidad endometrial?

Los mecanismos fisiopatológicos que se han sugerido son (41):

- Alteración de la estabilidad genómica del epitelio uterino a través de la modulación de los factores de transcripción y otras alteraciones genómicas y epigenéticas que pueden conducir posteriormente a la apoptosis y autofagia.
- Fragmentación de la barrera epitelial y degradación de

la matriz extracelular por las metaloproteinasas que permiten el movimiento de bacterias entre las células epiteliales.

- Secreción de metabolitos por los microbios, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y cambios en el pH del microambiente uterino.
- Producción de cambios inflamatorios (que activan los receptores tipo Toll (TLR) y citoquinas proinflamatorias que pueden reclutar células inmunes y conducir a la secreción de péptidos antimicrobianos (AMP)) y síntesis de mucina que agotan la flora bacteriana y dificultan su colonización.

5) ¿Podría generar patologías endometriales?

Si la microbiota del tracto reproductivo superior estuviese relacionada con la fisiología, entonces cualquier disbiosis microbiana afectaría a su funcionalidad y supondría un factor de riesgo para muchas afecciones ginecológicas, v.g. la endometritis crónica (CE). Hasta ahora, los resultados basados en los tres métodos clásicos de detección de CE (histología/CD138, histeroscopia y cultivo microbiano), habían demostrado que las bacterias cultivadas a partir de biopsias endometriales eran diferentes a las encontradas en la vagina (40), sin embargo la escasa concordancia diagnóstica aportada por estos tres métodos, supone una crítica muy importante para consolidar sus conclusiones.

La secuenciación de nueva generación (NGS) podría ofrecer una detección molecular mucho más precisa de los patógenos causantes de CE y resolver esta duda. En esta dirección, un estudio de secuenciación de muestras endometriales realizado en 130 mujeres infértiles, que identificó a 12 pacientes (9 %) con CE, permitió conocer que la abundancia relativa de *Lactobacillus* fue 42,7 veces menor en las microbiotas con CE respecto de las que no eran CE (1,89 % vs. 80,7 %) y que el *Lactobacillus crispatus* fue la mitad de abundante en la microbiota CE (2,10–2,30).

Se concluyó que la CE se asoció con una abundancia estadísticamente significativa de 18 taxones diferentes al *Lactobacillus*, incluidos *Dialister*, *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Gardnerella* y *Anaerococcus*. De éstos, *Anaerococcus* y *Gardnerella* se correlacionaron negativamente con la abundancia relativa de *Lactobacillus* en la cavidad endometrial (46). Los procesos inflamatorios en el útero desencadenados por la presencia de bacterias podrían desequilibrar las citoquinas necesarias para el desarrollo y la implantación exitosa de los blastocistos. El estudio molecular de la microbiota endometrial podría ser una herramienta importante en el abordaje de pacientes infértiles con infertilidad inexplicada, fallo repetido de implantación (RIF) y pérdida recurrente del embarazo (RPL).

La CE no es la única patología derivada de la presencia de bacterias en el útero que se ha asociado con malos resultados reproductivos, de hecho, también ocurre para la endometriosis. La composición de la microbiota uterina es significativamente diferente en mujeres con endometriosis en relación con controles sanos, con niveles bajos de especies de *Lactobacillaceae* y muy altos de *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae* y *Enterobacteriaceae* (39, 47).

Se ha publicado que las pacientes con endometriosis que fueron tratadas con antibióticos antes de la implantación tuvieron resultados reproductivos significativamente mejores que las no tratadas con antibióticos (48). Esto podría sugerir que, en parte, el impacto negativo de la endometriosis en los resultados reproductivos podría ser atribuible a la presencia de bacterias uterinas.

En un reciente metanálisis que incluyó a 796 pacientes, se comprobó que las mujeres con CE, cuando recibieron antibioterapia y no tenían confirmación histológica de curación, no mostraron ninguna ventaja en OPR/LBR (tasa de embarazo en curso/tasa de nacido vivo), tasa de embarazo clínico (CPR) o tasa de implantación (IR), en comparación con los controles no tratados. Sin embargo, aquellas pacientes con confirmación de CE curada mostraron mayor OPR/LBR (OR 6,81), CPR (OR 4,02) e IR (OR 3,24) en comparación con pacientes con CE persistente. El resultado de la fecundación in vitro fue comparable entre las mujeres con CE curada y entre las mujeres sin CE (OPR/LBR, CPR e IR). La tasa de aborto espontáneo no fue significativamente diferente entre ambos grupos (49).

6) ¿Son útiles los probióticos?

Los probióticos son microorganismos vivos que confieren un beneficio para la salud del huésped. La mayoría de los probióticos orales y vaginales actualmente disponibles comercialmente incluyen *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. reuteri* y *L. rhamnosus*. El uso de los probióticos para colonizar el nicho y desplazar las posibles bacterias disbióticas permitiría restaurar la microbiota y superar las desventajas del tratamiento con antibióticos (resistencia, infecciones recurrentes después del tratamiento, o eliminación de la flora endógena).

Aunque la eficacia de una terapia con probióticos únicamente para revertir la BV y otras infecciones del tracto reproductivo no es segura, una terapia de dos pasos (antibióticos y, posteriormente, probióticos vaginales) podría ser útil para combatir primero las bacterias y luego repoblar el aparato reproductor con cepas de *Lactobacillus* (50, 51).

7) ¿Modifica el pH?

Un aspecto poco estudiado del microambiente uterino es su pH fisiológico, que probablemente esté influenciado por la presencia y la composición de la microbiota.

No existe unanimidad respecto de su valor, se estima que estaría alrededor de 7, habiendo sido publicado que no debe exceder de 7,2, aunque se han encontrado rangos entre 6,6-8,5 (2, 52).

Mientras que, en la vagina, el *Lactobacillus* vaginal reduce el pH e inhibe la colonización de especies disbióticas, no está claro cómo podría alterarse el pH del ambiente intrauterino por la presencia de la microbiota ya que es poco probable que se encuentren *Lactobacillus* a niveles suficientemente altos para mantener un ambiente ácido en el útero. También es posible que el pH vaginal pudiera afectar el pH uterino a través de mecanismos directos o indirectos.

Estos interrogantes tienen implicaciones relevantes ya que el tráfico de inmunoglobulinas a través de los tejidos de la mucosa, incluido el útero, ha demostrado ser sensible al pH. El receptor Fc neonatal (FcRn), que desempeña un papel clave en este tráfico, es funcional en un margen de pH de 6-6,5, pero con un pH de 7 deja de serlo e inhibe el transporte de inmunoglobulina G (IgG), lo que tiene implicaciones significativas para las infecciones de transmisión sexual como *Chlamydia trachomatis* (53).

Por último, otro aspecto interesante a tener en cuenta son las repercusiones obstétricas, que podrían afectar al estado de salud de la madre y del niño antes y después del parto. El microbioma vaginal de las mujeres embarazadas que dan a luz a término es abundante en Lactobacilos, con un dominio significativo de comunidades CST-I, -II, -III y -V, mientras que altos niveles de Gardnerella, Ureaplasma u otras bacterias pertenecientes a la CST-IV, a menudo se asocian con parto prematuro y complicaciones obstétricas. Tras el parto el microbioma vaginal se caracteriza por un cambio a CST-IV incluso en aquellos embarazos en los que los niveles de *Lactobacillus* se mantuvieron altos durante toda la gestación (54).

CONCLUSIÓN

La microbiota vaginal no es estable en su composición ya que depende de variables relacionadas con la higiene personal, actividad sexual, etnia, edad, fase del ciclo menstrual, entre otros factores. Cuando la composición del microbioma se perturba y entra en disbiosis, se generan condiciones que facilitan las complicaciones gestacionales y que pueden afectar el resultado reproductivo de las técnicas de FIV. Se ha sugerido, a través del uso de diferentes perfiles de microbioma, que analizar el microbioma vaginal antes del tratamiento podría ofrecer una oportunidad para mejorar la tasa de éxito de la FIV o la FIV-ICSI ya que podríamos posponer la primera transferencia en fresco hasta que el perfil

del microbioma fuera propicio mediante el uso de antibióticos, prebióticos o probióticos.

Es posible que la microbiota del endometrio esté asociada con su fisiología y que cualquier desequilibrio de la composición microbiana pudiera afectar a su funcionalidad, convirtiéndolo en un factor de riesgo para muchas afecciones ginecológicas, como la endometritis crónica o la endometriosis. Un endometrio saludable se asocia a un perfil en el que los *Lactobacillus* suponen > del 90 % de las bacterias (LD>90 %).

La dificultad para evaluar el microbioma uterino podría ser superada si se demostrase que determinaciones más sencillas, como las de la microbiota urinaria o vaginal, son equivalentes a la del endometrio. Seleccionar aquellas mujeres que no deberían ser sometidas a tratamiento por su baja probabilidad de éxito reproductivo es un reto que está en marcha mediante el estudio ReceptIVFity.

Una terapia en dos pasos (probióticos vaginales después del tratamiento con antibióticos) podría ser útil para combatir las bacterias desfavorables y posteriormente repoblar el aparato reproductor con cepas de *Lactobacillus*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Backhed F, Ley RE, Sonenberg JL, Peterson DA, Gordon JL. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005; 307:1915-20.
2. Moreno I, Codoner FM, Vilella F, Valbuena D, Martínez-Blanch JF, Jiménez-Almazán J, et al. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *Am J Obstet Gynecol* 2016;215(6):684-703.
3. Lorenzen E, Kudirkiene E, Gutman N, Grossi AB, Agerholm JS, Erneholt K et al. The vaginal microbiome is stable in prepubertal and sexually mature Ellegaard Göttingen Minipigs throughout an estrous cycle. *Vet Res* 2015; 46:125.
4. Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012;486(7402):207-214
5. Lorenzen E, Kudirkiene E, Gutman N, Grossi AB, Agerholm JS, Erneholt K et al. The vaginal microbiome is stable in prepubertal and sexually mature Ellegaard Göttingen Minipigs throughout an estrous cycle. *Vet Res* 2015; 46:125.
6. C. M. Mitchell, A. Haick, E. Nkwopara et al., "Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women," *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2015, vol. 212, no. 5, pp. 611.e1-611.e9.
7. I. Moreno, F. M. Codoñer, F. Vilella et al., "Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure," *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2016, vol. 215, no. 6, pp. 684-703.
8. Krishnan K, Chen T, Paster BJ. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Dis* 2016; 24.doi:10.1111/odi.12509.
9. Whittaker R. Evolution and measurement of species diversity. *Taxon* 1972; 21: 213- 51.
10. Lozupone CA, Knight R. Species divergence and the measurement of microbial diversity. *FEMS Microbiol Rev.* 2008; 32(4): 557-78.
11. Delaney ML, Onderdonk AB. Nugent score related to vaginal culture in pregnant women. *Obstet Gynecol.* 2001;98:79-84.
12. Srinivasan S, Liu C, Mitchell CM, et al. Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. *PLoS One.* 2010;5:e10197.
13. Donati L, Di Vico A, Nucci M, Quagliozzi L, Spagnuolo T, Labianca A, et al. Vaginal microbial flora and outcome of pregnancy. *Arch Gynecol Obstet.* 2010;281(4):589-600.
14. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108 Suppl 1:4680-7.
15. Witkin SS, Linhares IM. Why do lactobacilli dominate the human vaginal microbiota? *BJOG.* 2017;124(4):606-11.
16. Chaban B, Links MG, Jayaprakash TP, Wagner EC, Bourque DK, Lohn Z, et al. Characterization of the vaginal microbiota of healthy Canadian women through the menstrual cycle. *Microbiome.* 2014;2(1).
17. Gajer, P., Brotman, R.M., Bai, G., Sakamoto, J., Schutte, U.M., Zhong, X., Koenig, S.S., Fu, L., Ma, Z.S., Zhou, X., Abdo, Z., Forney, L.J., Ravel, J. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Science translational medicine* 2012; 4: 132ra152.
18. Hyman RW, Fukushima M, Jiang H, Fung E, Rand L, Johnson B, et al. Diversity of the vaginal microbiome correlates with preterm birth. *Reproductive Sciences.* 2014;21(1):32-40.
19. Nelson DB, Bellamy S, Nachamkin I, Ness RB, Macones GA, Allen-Taylor L. First trimester bacterial vaginosis, individual microorganism levels, and risk of second trimester pregnancy loss among urban women. *Fertil Steril.* 2007;88(5):1396-403.
20. Husain SM, Wilks M, Mupita M, Reddy SP, Hennessy EM, Macfarlane AJ, et al. Diversity and stability of cultured vaginal lactobacilli in pregnant women from a multi-ethnic urban UK population. *J Appl Microbiol.* 2014;117(1):258-65.
21. Llahi-Camp JM, Rai R, Ison C, Regan L, Taylor-Robinson D. Association of bacterial vaginosis with a history of second trimester miscarriage. *Hum Reprod.* 1996;11(7):1575-8.
22. Kindinger L, MacIntyre D, Lee Y, Teoh TG, Bennett P. Identification of vaginal microbial communities associated with specific etiologies of preterm birth. *Reproductive Sciences.* 2016;23(1):59A-60A.
23. Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, Landers DV, Sweet RL. Bacterial vaginosis is a strong predictor of Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis infection. *Clin Infect Dis.* 2003;36(5):663-8.
24. Gallo MF, Macaluso M, Warner L, Fleenor ME, Hook EW, 3rd, Brill I, et al. Bacterial vaginosis, gonorrhoea, and chlamydial infection among women attending a sexually transmitted disease clinic: a longitudinal analysis of possible causal links. *Ann Epidemiol.* 2012;22(3):213-20.
25. Ziklo N, Huston WM, Taing K, Katouli M, Timms P. In vitro rescue of genital strains of Chlamydia trachomatis from interferon-gamma and tryptophan depletion with indole-positive, but not indole-negative Prevotella spp. *BMC Microbiol.* 2016;16(1):286.
26. Awonuga A, Nabi A, Govindbhai J, Birch H, Stewart B. Contamination of embryo transfer catheter and treatment outcome in vitro fertilization. *J Assist Reprod Genet.* 1998;15(4):198-201.
27. Selman H, Mariani M, Barnocchi N, Mencacci A, Bistoni F, Arena S, et al. Examination of bacterial contamination at the time of embryo transfer, and its impact on the IVF/pregnancy outcome. *J Assist Reprod Genet.* 2007;24(9):395-9.
28. Singer M, Borg M, Ouburg S, Morré SA. The relation of the vaginal microbiota to early pregnancy development during In Vitro Fertilization treatment – A meta-analysis. In: Singer M (2019). Bacterial interactions in the female genital tract : A triangle affair between pathogens, microbiota, and host 107-122https://www.semanticscholar.org/paper/Bacterial-interactions-in-the-female-genital-tract-Singer/6d34ae39cdeb52e82a5796ac9c8a1673ad363239)

29. Koedooder R, Singer M, Schoenmakers S, Savelkoul PHM, Morré SA, de Jonge JD, Poort L, Cuypers WJSS, Beckers NGM, Broekmans FJM, Cohlen BJ, den Hartog JE, Fleischer K, Lambalk CB, Smeenk JMJS, Budding AE, Laven JSE. The vaginal microbiome as a predictor for outcome of in vitro fertilization with or without intracytoplasmic sperm injection: a prospective study. *Hum Reprod*. 2019; 34(6):1042-1054.
30. Vergaro P, Tiscornia G, Barragán M, García D, Rodríguez A, Santaló J, Vassena R. Vaginal microbiota profile at the time of embryo transfer does not affect live birth rate in IVF cycles with donated oocytes. *Reprod Biomed Online*. 2019 Jun;38(6):883-891.
31. Gottschick C, Deng ZL, Vital M, Masur C, Abels C, Pieper DH, et al. The urinary microbiota of men and women and its changes in women during bacterial vaginosis and antibiotic treatment. *Microbiome*. 2017;5(1):99.
32. Wolfe AJ, Toh E, Shibata N, Rong R, Kenton K, Fitzgerald M, et al. Evidence of uncultivated bacteria in the adult female bladder. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1376-83.
33. Kok DJ, Laven JSE, Maghaid DM, Beckers NGM. Method and kit for prediction success of in vitro fertilization. Google Patents; 2018.
34. Koedooder R, Singer M, Schoenmakers S, Savelkoul PHM, Morré SA, de Jonge JD, Poort L, Cuypers WSS, Budding AE, Laven JSE; ReceptIVFity study group. The ReceptIVFity cohort study protocol to validate the urogenital microbiome as predictor for IVF or IVF/ICSI outcome. *Reprod Health*. 2018 Dec 7;15(1):202.
35. Halis G, Arici A. Endometriosis and inflammation in infertility. *Ann N Y Acad Sci* (2004) 1034:300-15. doi:10.1196/annals.1335.032.
36. Carre G, Naud C. Tissier: Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (état normal et pathologique). Paris: Dissertation (1900).
37. Quayle AJ. The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *J Reprod Immunol* 2002; 57(1- 2):61-79. doi:10.1016/S0165-0378(02)00019-0.
38. Kunz G, Beil D, Deiniger H, Einspanier A, Mall G, Leyendecker G. The uterine peristaltic pump – normal and impeded sperm transport within the female genital tract. *Adv Exp Med Biol* 1997; 424:267-77. doi:10.1007/978-1-4615-5913-9_49
39. Chen C, Song XL, Wei WX, Zhong HZ, Dai JJ, Lan Z, et al. The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nat Commun* 2017; 8(1):875. doi:10.1038/s41467-017-00901-0.
40. Cicinelli E, De Ziegler D, Nicoletti R, Tinelli R, Salianni N, Resta L, et al. Poor reliability of vaginal and endocervical cultures for evaluating microbiology of endometrial cavity in women with chronic endometritis. *Gynecol Obstet Invest*. 2009;68:108-115.
41. Baker JM, Chase DM, Herbst-Kralovetz MM. Uterine Microbiota: Residents, Tourists, or Invaders? *Front Immunol*. 2018 Mar 2;9:208. *Gynecol Obstet Invest* 2009; 68(2):108-15. doi:10.1159/000223819.
42. Tao X, Fransiak JM, Zhan Y, et al. Endometrial microbiome at the time of embryo transfer: next-generation sequencing of the 16S ribosomal subunit Endometrial microbiome at the time of embryo transfer: next-generation sequencing of the 16S ribosomal sub-unit. *Hum Microb J*. 2017;3:15-21.
43. Kyono K, Hashimoto T, Nagai Y, Sakuraba Y. Analysis of endometrial microbiota by 16S ribosomal RNA gene sequencing among infertile patients: a single-center pilot study. *Reprod Med Biol*. 2018 May 6;17(3):297-306.
44. Egbase PE, AlSharhan M, AlOthman S, AlMutawa M, Udo EE, Grudzinskas JG. Incidence of microbial growth from the tip of the embryo transfer catheter after embryo transfer in relation to clinical pregnancy rate following in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1996; 11(8):1687-9.
45. Haahr T, Jensen JS, Thomsen L, Duus L, Rygaard K, Humaidan P. Abnormal vaginal microbiota may be associated with poor reproductive outcomes: a prospective study in IVF patients. *Hum Reprod* 2016; 31(4):795-803. doi:10.1093/humrep/dew026.
46. Liu Y, Ko EY, Wong KK, Chen X, Cheung WC, Law TS, Chung JP, Tsui SK, Li TC, Chim SS. Endometrial microbiota in infertile women with and without chronic endometritis as diagnosed using a quantitative and reference range-based method. *Fertil Steril*. 2019 Oct;112(4):707-717.
47. Khan KN, Fujishita A, Masumoto H, Muto H, Kitajima M, Masuzaki H, et al. Molecular detection of intrauterine microbial colonization in women with endometriosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* (2016) 199:69-75. doi:10.1016/j.ejogrb.2016.01.040
48. Cicinelli E, Matteo M, Tinelli R, Pinto V, Marinaccio M, Indraccolo U, et al. Chronic endometritis due to common bacteria is prevalent in women with recurrent miscarriage as confirmed by improved pregnancy outcome after antibiotic treatment. *Reprod Sci* 2014; 21(5):640-7. doi:10.1177/1933719113508817
49. Vitagliano A, Saccardi C, Noventa M, Di Spiezo Sardo A, Saccone G, Cicinelli E, Pizzi S, Andrisani A, Litta PS. Effects of chronic endometritis therapy on in vitro fertilization outcome in women with repeated implantation failure: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*. 2018; Jul 1;110(1):103-112.e1.
50. Mastromarino P, Macchia S, Meggiorini L, et al. Effectiveness of Lactobacillus-containing vaginal tablets in the treatment of symptomatic bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Infect*. 2009;15:67-74.
51. Bradshaw CS, Pirota M, De Guingand D, et al. Efficacy of oral metronidazole with vaginal clindamycin or vaginal probiotic for bacterial vaginosis: randomised placebo-controlled double-blind trial. *PLoS One*. 2012;7:e34540.
52. Glasser S, Mulholland J, Psychoyos A. *Endocrinology of Embryo-Endometrium Interactions*. New York: Plenum Press (1994).
53. Armitage CW, O'Meara CP, Harvie MC, Timms P, Blumberg RS, Beagley KW. Divergent outcomes following transcytosis of IgG targeting intracellular and extracellular chlamydial antigens. *Immunol Cell Biol* 2014; 92(5):417-26. doi:10.1038/icb.2013.110
54. DiGiulio DB, Callahan BJ, McMurdie PJ, et al. Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112(25):11060-11065.