



TRABAJO FIN DE GRADO

**IMPLICACIONES DEL MICROBIOMA DEL
LÍQUIDO AMNIÓTICO EN EL DESARROLLO
DE ENFERMEDADES**

**CURSO 2019-2020
FACULTAD DE FARMACIA**

MARÍA DEL ÁGUILA GÓMEZ



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA**

**TRABAJO FIN DE GRADO
GRADO EN FARMACIA**

**IMPLICACIONES DEL MICROBIOMA DEL
LÍQUIDO AMNIÓTICO EN EL DESARROLLO DE
ENFERMEDADES**

AUTORA: MARÍA DEL ÁGUILA GÓMEZ

**TUTORAS: MARÍA DE LOURDES MORENO AMADOR Y ENCARNACIÓN
MELLADO DURÁN**

TIPOLOGÍA: TRABAJO BIBLIOGRÁFICO

DEPARTAMENTO: MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

Lugar y fecha de presentación: Sevilla, 15 de JUNIO 2020

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN.....	2
	2.1. Historia y definición de líquido amniótico	2
	2.2. Formación del líquido amniótico.....	2
	2.3. Regulación del líquido amniótico.....	4
	2.4. Composición del líquido amniótico.....	6
	2.5. Concepto de microbiota y microbioma	7
	2.6. Microorganismos en el líquido amniótico	8
3.	OBJETIVOS	12
4.	METODOLOGÍA.....	12
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	12
	5.1. Microorganismos, antígenos y sistema inmune.....	13
	5.2. Microorganismos y protección frente a infecciones.....	15
	5.3. Microorganismos y complicaciones	17
	5.3.1. Invasión microbiana de la cavidad amniótica (MIAC)	17
	5.3.2. Preeclampsia	20
	5.3.3. Infección e inflamación intraamniótica	23
	5.3.4. Corioamnionitis	28
	5.3.5. Ruptura prematura de membranas (PROM).....	30
6.	CONCLUSIONES.....	32
7.	BIBLIOGRAFÍA	33

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1.	Relación del volumen de líquido amniótico y el periodo de gestación.....	3
Figura 2.	Circulación del líquido amniótico.....	4
Figura 3.	Inmunohistoquímica del amnios para acuaporinas tipo 1.....	6
Figura 4.	Hipótesis sobre la adquisición de la microbiota humana.....	10
Figura 5.	Vista esquemática de la interfase uterina-placentaria.....	14
Figura 6.	Distribución de filos bacterianos en muestras de líquido amniótico de parto prematuro con membranas intactas y en casos de PROM.....	18
Figura 7.	Géneros bacterianos prevalentes en el líquido amniótico usando la técnica PCR.....	19
Figura 8.	Implicación de los microorganismos en la patología de la preeclampsia.....	21
Figura 9.	Papel de las comunidades bacterianas en la preeclampsia.....	22
Figura 10.	Comparativa de hallazgos de microorganismos en líquido amniótico utilizando técnicas cultivo-dependientes y PCR.....	24
Figura 11.	Diversidad microbiana del líquido amniótico.....	24
Figura 12.	Fases de la infección intraamniótica ascendente.....	25
Figura 13.	Coincidencia de microbiota en el líquido amniótico y la vagina.....	26
Figura 14.	Hipótesis de flujo de la microbiota del líquido amniótico y parto prematuro.....	28

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1.	Diversidad bacteriana del líquido amniótico con estudios cultivos-dependientes y métodos moleculares.....	9
Tabla 2.	Invasión microbiana de la cavidad amniótica y pruebas de detección.....	17
Tabla 3.	Principales microorganismos aislados de líquido amniótico en pacientes con ruptura prematura de membranas o parto prematuro.....	31

1. RESUMEN

En los últimos años, los avances en el conocimiento del microbioma humano han supuesto una revolucionaria respuesta a algunas preguntas sin contestar, referidas al desarrollo y padecimiento de determinadas enfermedades.

La teoría de que el feto se desarrolla en un ambiente estéril ha sido refutada por estudios recientes, utilizando técnicas dependientes de cultivo y técnicas moleculares, tanto en placenta como en líquido amniótico (LA) y cordón umbilical. Por tanto, el microbioma del LA puede suponer complicaciones en el devenir de la gestación, o por el contrario, participar en la protección del feto. Aunque el mecanismo exacto de transferencia de microorganismos es aún desconocido, se piensa que puede estar relacionado con el aumento de la permeabilidad de la mucosa materna, lo que permite un mayor paso de microorganismos desde el lumen a la sangre para después llegar a la placenta.

De forma natural encontramos en el LA sustancias que protegen al feto como son las inmunoglobulinas, la lisozima o la transferrina. Sin embargo, pueden no ser suficientes si se produce una invasión microbiana de la cavidad amniótica por microorganismos con factores de virulencia y capacidad de evasión de las respuestas del sistema inmune, como ocurre con las especies del género *Ureaplasma*, provocando infecciones o ruptura prematura de membranas, entre otras complicaciones. Por otra parte, la presencia de microbiota en el ambiente uterino favorece la activación del sistema inmune en el feto y gracias a esta exposición al inicio de la vida, podría haber una menor incidencia de enfermedades a lo largo de la misma.

Este trabajo bibliográfico comprende una revisión actualizada de los últimos hallazgos del microbioma del LA en relación con el desarrollo de enfermedades y sus implicaciones en el desarrollo de la gestación.

Palabras clave: microbioma, líquido amniótico, sistema inmune, infecciones e inflamación intraamniótica.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Historia y definición de líquido amniótico

A lo largo de la historia, el líquido amniótico (LA) ha sido objeto de distintas concepciones sobre cuál era su función. Así, Hipócrates pensaba que era meramente orina fetal. Sin embargo, primero ha sido concebido como una masa líquida con función mecánica y más tarde se pensó que podía ser un resquicio de la vida acuática cuya función era proteger la osmolaridad interior del exterior (Botella y Clavero, 1993).

Estos antecedentes han permitido concebir actualmente el LA como una masa líquida que rodea al feto después de las primeras semanas de gestación, siendo no solo responsable de la protección frente a traumatismos del feto y del cordón, sino también responsable de la nutrición del feto, la regulación metabólica, la “amortiguación” de las contracciones uterinas, promueve el desarrollo del sistema músculo esquelético fetal, del sistema gastrointestinal y maduración pulmonar. Además, una función muy importante, es la actividad antibacteriana que posee y que va a regular el desarrollo posterior de enfermedades (Morgan-Ortiz et al., 2015).

El LA constituye un elemento muy importante para analizar (por punción) el desarrollo intrauterino del feto ya que sus principales componentes están aportados por la madre y el feto (Botella y Clavero, 1993). Además del LA, al principio del embarazo también hay otra cavidad que contiene líquido celómico, extraembrionario, que se terminará fusionando con el LA sobre las semanas 12-14 del embarazo y cuya composición es parecida a la del plasma materno (Botella y Clavero, 1993).

2.2. Formación del líquido amniótico

El LA se forma inicialmente por las células amniógenas procedentes de la cavidad amniótica, unos 12 días después de la fecundación y, aunque aporta una pequeña parte de éste, la mayor parte de su producción deriva del líquido intersticial materno por difusión a través de la membrana amniocoriónica de la decidua parietal (González-Merlo y González, 2018). A medida que se incrementan las semanas de gestación, el embrión comienza a orinar en la cavidad y a tragar fluido, siendo a partir de este momento la orina el principal componente del LA junto con el líquido de los pulmones, ya que la cornificación de la piel fetal impide la difusión del LA. Cuando se produce la fecundación

y aún no se ha formado del todo el embrión, se empieza a formar tanto el LA como el celómico, con lo cual podemos concluir que el embrión no puede ser la fuente primaria de líquidos en el embarazo temprano (Morgan-Ortiz et al., 2015). A partir del momento en el que la orina empieza a constituir una parte principal del LA, se genera un gran cambio en el volumen de éste, haciendo que a partir de entonces el volumen del LA no sea proporcional a la edad gestacional, tal y como se muestra en la Figura 1, donde hay gran concordancia al principio del embarazo y gran dispersión al final (Botella y Clavero, 1993).

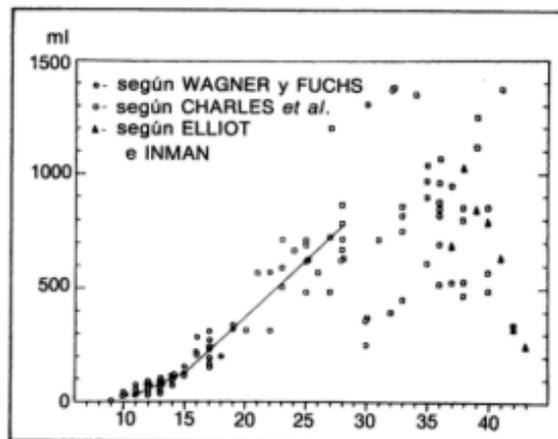


Figura 1. Relación del volumen de líquido amniótico y el periodo de gestación (Fuchs, 1966).

Podemos concluir que las aportaciones de cada fluido al LA son las siguientes (Morgan-Ortiz et al., 2015):

- Orina fetal: 800 a 1200 ml/día
- Secreción de líquido pulmonar fetal: 170 ml/día
- Deglución fetal: 500 a 1000 ml/día
- Flujo transmembrana: 200 a 400 ml/día
- Secreciones orales-nasales: 25 ml/día
- Flujo transmembranoso: 10 ml/día

Cabe resaltar la idea de que el volumen del LA es aproximadamente constante ya que hay un equilibrio entre la formación y la eliminación, resultado por una parte de la reabsorción de líquidos (deglución y flujo a través de membranas amniótica y/o corial) y, por otra parte, por la producción de fluidos fetales (pulmones y orina), haciendo a su vez que la regeneración del LA se produzca en un tiempo pequeño, renovándose completamente cada dos o tres horas (Morgan-Ortiz et al., 2015).

En este sentido, tanto las membranas ovulares como el cordón umbilical, desempeñan el papel más importante en la circulación y el equilibrio del LA, tanto en lo que se refiere al volumen como en su composición, manteniendo un equilibrio constante entre los compartimentos fetales y maternos (González-Merlo y González, 2018). Por ello, es importante conocer todos los procesos que se dan a lo largo de la gestación que están relacionados con la absorción y producción para entender si se dan alteraciones que puedan dar lugar a un aumento de su volumen (polihidramnios) o, por el contrario, una disminución del volumen (oligoamnios). En este sentido, el estado fetal se refleja en el volumen de LA que es un reflector pasivo de la condición fetal (Morgan-Ortiz et al., 2015).

2.3. Regulación del líquido amniótico

Durante el embarazo, la cantidad y la calidad normal del LA es crítico para el crecimiento y desarrollo fetal, por ello ahora se plantea cómo se produce este aspecto fundamental en el embarazo (Luo et al., 2018).

La homeostasis del LA, se mantiene gracias al balance entre la afluencia de la orina fetal y el líquido pulmonar, y la salida por la deglución fetal y la absorción a través de las membranas corioamnióticas, conocida como vía intramembranosa y la circulación placentaria, mostrada en la Figura 2. Dicha vía intramembranosa (a través de la membrana amniótica), se ha reconocido por ser crítica en la reabsorción de LA y participar de forma importante en la homeostasis de su volumen (Wang et al., 2001).

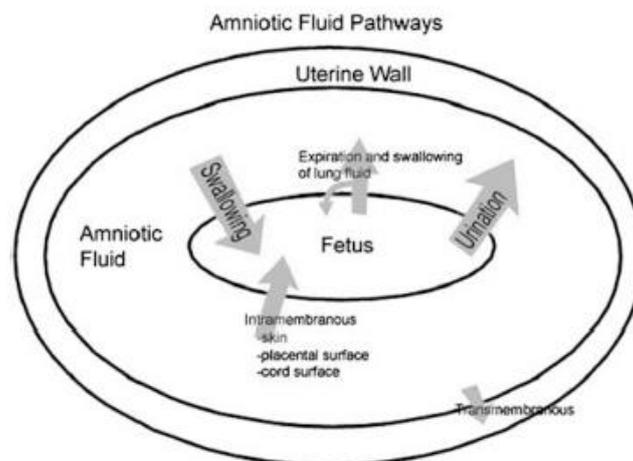


Figura 2. Circulación del líquido amniótico (Underwood et al., 2005).

Aunque el mecanismo de la absorción y la regulación son desconocidos, desde que se descubrieron las acuaporinas se ha pensado que podrían desempeñar un papel importante en el transporte a través de las membranas (Wang et al., 2001). Las acuaporinas, son canales acuosos localizados en la placenta murina y las membranas fetales, que regulan el paso transmembrana y cuya función se ha asociado a la regulación del volumen y composición del LA (Beall et al., 2007). Son proteínas de canal acuoso de la membrana celular, con un tamaño aproximado de 30 kDa; son hidrofóbicas, organizándose en forma de tetrámero en las membranas celulares, siendo cada monómero de forma independiente un poro hidrofóbico. Hay muchos tipos en función de las especies, destacando la 1, 3, 8 y 9 por estar presentes en las membranas fetales (Beall et al., 2007).

De ellas, cabe destacar la función de la acuaporina 1, ya que podría regular el volumen del LA, facilitando la reabsorción de líquido desde la cavidad amniótica, a través de las membranas coriónicas (Zheng et al., 2014). De hecho, se ha visto que anomalías en dicha acuaporina, está relacionado con desorden en el volumen del LA (Beall et al., 2007); como por ejemplo en el estudio de Mann et al. (2005) se determinó que en humanos, la expresión de la acuaporina 1 estaba sustancialmente aumentada en embarazos complicados con polihidramnios idiopático. En este sentido, Luo et al. (2018) utilizando la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Inversa (RT-PCR), concluyó que había niveles altos de acuaporinas en el primer trimestre del embarazo, con una tendencia a disminuir después de la 11 semana de gestación. Estos resultados indicaron que las acuaporinas de tipo 1 están involucradas en la regulación de la homeostasis del LA en la gestación, así como también en su osmolaridad y concentración de iones como el Ca^{2+} . Además, la disminución en la expresión de la acuaporina 1 en las membranas fetales, afecta a la regulación negativa de las acuaporinas 8 y 9.

A parte de dicha acuaporina 1, también es relevante la presencia de la tipo 8. En un estudio donde se utilizó las técnicas RT-PCR y la Hibridación in situ (ISH), se comprobó que la citada acuaporina, está presente en la placenta humana y la membrana corioamniótica, desempeñando un papel fundamental en la reabsorción intramembranosa de LA (Wang et al., 2001).

Utilizando técnicas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) así como otras técnicas inmunológicas, se han llevado a cabo estudios en modelos animales y se

concluyó que el conocimiento de las acuaporinas puede ayudar a aportar una posible modulación terapéutica de las alteraciones del volumen del LA (Beall et al., 2007).

En la Figura 3, se puede observar la presencia de las acuaporinas de tipo 1, mediante tinción por la técnica de inmunohistoquímica, en las células epiteliales de algunos tipos de amnios; según un estudio llevado a cabo por Zheng et al. (2014).



Figura 3. Inmunohistoquímica del amnios para acuaporinas tipo 1 (Zheng et al., 2014).

2.4. Composición del líquido amniótico

El LA es un fluido turbio, debido a la presencia de partículas de la piel, mucosas fetales y del epitelio amniótico, que posee un pH de 7.0 o ligeramente alcalino (Morgan-Ortiz et al., 2015). El volumen promedio del LA en un embarazo de término es de unos 800 ml, pero éste va variando en función de la semana de gestación (Morgan-Ortiz et al., 2015). El LA principalmente está constituido por agua (99%), con una osmolaridad menor a la del plasma materno o fetal, y al igual que el volumen, la composición varía a lo largo de la gestación (Tong et al., 2009). Al principio es muy similar al plasma materno, pero a medida que avanza la gestación, el feto desempeña un papel más importante en su composición (González-Merlo y González, 2018). Además, está también formado por electrolitos, péptidos, carbohidratos, lípidos, hormonas y proteínas; sin embargo, estos nutrientes los podemos encontrar en poca cantidad por lo cual, podemos decir que el LA no tiene una importante función en la nutrición fetal (Tong et al., 2009).

Con todo ello y a pesar de que hay un cierto desconocimiento sobre las funciones de cada uno de los componentes, se sabe que en el LA podemos encontrar componentes bioactivos que desempeñan determinadas funciones. Cabe destacar la presencia de péptidos y proteínas, participantes en el desarrollo fetal y proliferación, ya que son absorbidos por el tracto gastrointestinal y son distribuidos por todo el cuerpo, actuando

como mensajeros del crecimiento y proliferación. Este hecho es la razón por la cual el LA no es solo resultado de la filtración de la sangre (Tong et al., 2009).

Entre las proteínas, destacamos el factor humano de crecimiento epidérmico (h-EGF), por el papel que puede desempeñar en el desarrollo fetal y las atocinas (principalmente las IL-1, IL-6 Y IL-8 y el factor de necrosis tumoral [TNF]), que tienen su cometido en la infección y el desencadenamiento del parto. La adenosina, incrementa la producción de TNF en el LA y contribuye a la modulación de la inmunidad de la cavidad amniótica; y con respecto a la angiopoyetina-1 y la angiopoyetina-2, parecen desempeñar algún papel en la modulación de la respuesta inflamatoria a la infección intraamniótica inducida en el parto pre término (González-Merlo y González, 2018).

La riqueza del LA en solutos y componentes orgánicos permite que su estudio nos pueda aportar datos sobre el estado fetal y sobre determinadas patologías que pueden afectar a éste o al curso de la gestación (González-Merlo y González, 2018).

2.5. Concepto de microbiota y microbioma

El ser humano es considerado como un “superorganismo” ya que está formado por una mayor cantidad de microorganismos que, de células humanas. Estos microorganismos, han sido estudiados con técnicas actuales y avanzadas como son: la amplificación del ARNr 16S y el estudio de la secuenciación del ADN (Botero et al., 2016). Entre ellas, se destaca el ARNr como la macromolécula más ampliamente usada en estudios de filogenia y taxonomía bacteriana (Icaza-Chávez, 2013).

Existen en la actualidad dos conceptos que, aunque a priori parecen equivalentes, es importante diferenciar: microbiota y microbioma.

La microbiota consiste en un conjunto de microorganismos que viven en simbiosis con el cuerpo humano, de forma temporal o permanente, proporcionando salud y protección y que, en ocasiones, su presencia puede causar una enfermedad (Icaza-Chávez, 2013; Finotello y col., 2018). Esta microbiota humana, es específica para cada individuo. Sin embargo, el microbioma hace referencia no sólo a los microorganismos, sino también a sus genes y cómo estos pueden beneficiar y afectar al organismo humano (Fujimura y Lynch, 2015; Kunc y col., 2016). La microbiota se adquiere por primera vez de forma abundante a través de la madre en el momento del parto, ya sea vaginal o por cesárea, y ésta puede ir cambiando a lo largo de la vida según factores externos, como la alimentación, la edad, la ingesta de antibióticos, etc...sin embargo, se ha demostrado que

hay bacterias que pueden estar presentes en el LA. Los microorganismos habitualmente presentes en la vagina están relacionados con el parto natural y los microorganismos de la piel, con el parto que se desarrolla por cesárea (Cox et al., 2013).

2.6. Microorganismos en el líquido amniótico

La teoría de que el feto se desarrolla en un ambiente estéril ha sido refutada por los resultados obtenidos en algunos estudios utilizando técnicas de cultivo y técnicas moleculares tanto en placenta como en LA y cordón umbilical (Cao et al., 2014; Aagaard et al., 2014; Collado et al., 2016).

De los estudios hasta ahora realizados, se ha establecido que la microbiota del LA pueda estar formada principalmente por especies como: *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroides spp.* Además, microorganismos del Grupo B como *Streptococcus*, *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* son también detectados pero menos frecuentemente (Wassenaar and Panigrahi, 2014). La Tabla 1 muestra los resultados de un estudio donde se analizaron los microorganismos del LA de mujeres utilizando cultivos y métodos basados en el ADN.

Tabla 1. Diversidad bacteriana del líquido amniótico con estudios cultivo-dependientes y métodos moleculares (Wassenaar and Panigrahi, 2014).

Species	Detected by DiGiulio	Species*	Detected by Han
Gram-positive Firmicutes			
<i>Streptococcus mitis</i>	DNA only		
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Culture and DNA	<i>Strep. agalactiae</i>	DNA only†
		<i>Streptococcus</i> Group B	Culture only†
<i>Lactobacillus</i> sp.	Culture and DNA		
<i>Bacillus</i> sp. (not anthracis)	Culture only		
Coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> sp.	Culture only		
<i>Peptostreptococcus</i> sp.	Culture only	<i>Peptostreptococcus</i> sp.	DNA only
		<i>Clostridiales</i> bacterium	DNA only
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	Culture only		
Fusobacteria			
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Culture and DNA, culture only	<i>Fus. nucleatum</i>	DNA only, culture‡
Uncultivated <i>Fusobacterium</i>	DNA only		
<i>Sneathia</i> (formerly <i>Leptotrichia</i>) <i>sanguinegens</i>	DNA only	<i>Sneathia</i> (formerly <i>Leptotrichia</i>) <i>sanguinegens</i>	DNA only
<i>Leptotrichia amnionii</i>	DNA only	<i>Leptotrichia amnionii</i>	DNA only
Tenericutes			
<i>Mycoplasma hominis</i>	Culture and DNA	<i>Myc. hominis</i>	Culture only
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Culture only	<i>U. urealyticum</i>	Culture only§
<i>Ureaplasma</i> sp.	DNA only	<i>Ureaplasma parvum</i>	DNA only§
Actinobacteria			
<i>Gardnerella vaginalis</i>	Culture only¶		
Gram-negative Bacteroidetes			
Uncultivated <i>Bacteroidetes</i> bacterium	DNA only	<i>Bacteroides ureolyticus</i>	DNA only, DNA and culture
		<i>Bacteroides fragilis</i>	DNA only
<i>Prevotella</i> sp.	DNA only, DNA and culture**	<i>Prevotella bivia</i>	Culture only, culture and DNA
		<i>Bergeyella</i> sp.	DNA only
Gram-negative Proteobacteria			
<i>Delftia acidovorans</i>	DNA only		
<i>Neisseria cinerea</i>	DNA only		
		<i>Citrobacter koseri</i>	Culture and DNA
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Culture only
		<i>Shigella</i> spp.	DNA only††
		<i>Escherichia coli</i>	Culture only††
		<i>Eikenella corrodens</i>	Culture only

Wassenaar and Panigrahi (2014) observaron que son distintos los microorganismos observados en el LA de los nacimientos prematuros de aquellos que dan lugar a las sepsis neonatales, siendo los microorganismos más frecuentemente encontrados *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum*, ambos colonizadores del endometrio del útero. Esta idea también está apoyada por otros autores, en los que utilizando la prueba de la PCR concluyeron que tanto *Ureaplasma spp.* como *Mycoplasma spp.* son los microorganismos que más frecuentemente invaden la cavidad amniótica; esto es lo que se conoce como *microbial invasión of the amniotic cavity* (MIAC) considerado como el principal agente etiológico de embarazo prematuro, siendo responsable de la principal causa de mortalidad neonatal en el mundo (DiGiulio, 2012).

Se han propuesto rutas de acceso de microorganismos a la placenta, incluyendo el acceso desde el tracto genital, el torrente circulatorio de la madre, transporte activo a través de células del sistema inmune, entre otras y es la transmisión de microorganismos en el útero lo que facilita el establecimiento de la microbiota del intestino como se indica en la Figura 4 (Pérez- Muñoz et al., 2017). Todo esto defiende la idea de que estamos en contacto con microorganismos antes del nacimiento.

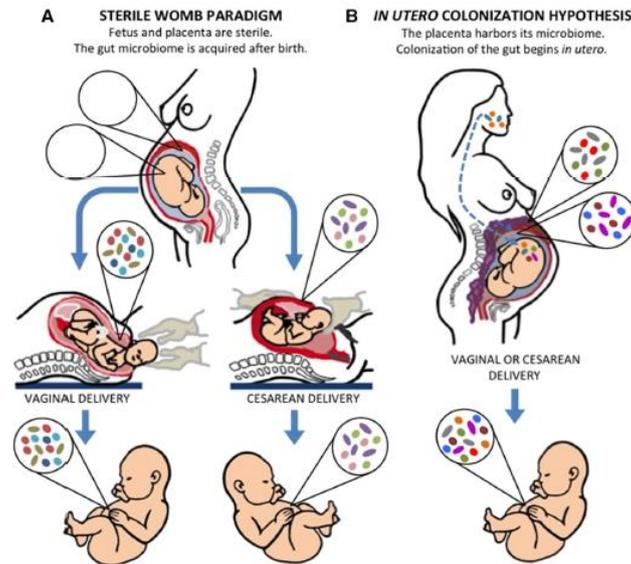


Figura 4. Hipótesis sobre la adquisición de la microbiota humana. (A) En un paradigma estéril, la placenta, el LA y el intestino fetal permanecen estériles durante un embarazo sano y la microbiota se adquiere durante y después del nacimiento. La microbiota intestinal de los recién nacidos mediante parto, se parece a la microbiota de la vagina de la madre; mientras que en los recién nacidos por cesárea, se parece a la microbiota de la piel de la madre. (B) Con respecto a la hipótesis de la colonización en el útero, se propone que algunos microorganismos del intestino del niño se adquieren antes del nacimiento, probablemente a través del contacto con el microbioma de la placenta, el cual es originario del intestino de la madre o de su microbiota oral (Pérez-Muñoz et al., 2017).

Los trabajos de Borghi et al. (2019), también sugieren que los humanos estamos en contacto con bacterias antes del nacimiento y que dependiendo del tiempo de gestación y el tipo de bacteria que entre en contacto con el feto, la colonización prenatal, tendrá unas consecuencias fisiológicas y clínicas determinadas. Estos autores llegaron a esta conclusión en base a los siguientes hallazgos:

- La presencia de microbiota en el meconio.
- Los microorganismos: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Propionibacterium* aislados del cordón umbilical de neonatos sanos nacidos por cesárea.
- Estudio de ARNr 16S que establece una única microbiota placentaria parecida a las bacterias orales maternas.
- El parecido entre las comunidades microbianas del LA y la placenta y del LA y el meconio.

Además de bacterias, otros autores han estudiado la posible presencia de virus en el LA y, aunque hay cierto desconocimiento, han llegado a algunos resultados concluyentes. Para ello, han utilizado la técnica de la PCR tomando la muestra previamente por amniocentesis y han detectado virus como por ejemplo el Citomegalovirus (CMV),

Adenovirus, Virus del Herpes simplex, Enterovirus, Virus del Epstein Barr, Virus respiratorio sincitial, el Parvovirus B19. Sin embargo, son necesarios más estudios que nos permitan determinar con exactitud si los virus están presentes en el LA (Lim et al., 2018).

En otras investigaciones, se ha planteado también el uso de pruebas de detección molecular como la técnica FISH (hibridación fluorescente *in situ* dirigida al ARNr 16S), la cual ha permitido la visualización de bacterias en las membranas fetales, y el estudio de sus posibles implicaciones (Steel et al., 2005). Sin embargo, se ha determinado que la presencia de bacterias podrían no ser suficientes únicamente para iniciar un parto prematuro o una respuesta inflamatoria sistémica, ya que también se tienen que tener en cuenta otros factores como la naturaleza de los organismos y los tejidos implicados (Steel et al., 2005).

Otro aspecto a considerar sobre el ambiente en el que se desarrolla el feto es la microbiota de la placenta, cuya presencia es muy probable, incluso en un embarazo de desarrollo normal. Estos microorganismos, pueden también constituir un mecanismo de defensa frente a aquellos que intenten penetrar en el LA (Lim et al., 2018). En el caso de muestras de la placenta, se pueden recuperar microorganismos mediante técnicas de cultivo, confirmando la presencia de éstos (Zhu et al., 2018). Además, se ha comprobado con técnicas de estudio de ADN que los microorganismos que podemos encontrar en la placenta guardan un estrecho parecido con los de la microbiota de la cavidad oral, más que con los que podemos encontrar en la vagina, piel y/o comunidades del intestino (Borghi et al., 2019) y, aunque pueda resultar un poco desconcertante, la verdad es que hay una explicación para ello.

De entre los microorganismos comensales no patógenos encontrados, destacamos *Fusobacterium nucleatum* y su capacidad de alterar la integridad y permeabilidad del endotelio vascular, consiguiendo de este modo, a través de la vía hematológica, llegar hasta la placenta, para ello dispone de una adhesina llamada FadA y todo ello facilitando también que bacterias como *Escherichia coli* lleguen a la placenta, siendo la más abundante en la mayoría de los individuos (Wassenaar and Panigrahi, 2014). Esta microbiota de la placenta, puede estar relacionada con partos prematuros o con infección prenatal.

3. OBJETIVOS

Este Trabajo Fin de Grado tiene como objetivo analizar la microbiota del líquido amniótico y cómo puede relacionarse ésta con el desarrollo de enfermedades.

Esto se ha llevado a cabo mediante una serie de objetivos específicos:

- Conocer el origen, la formación y el desarrollo de los microorganismos que componen la microbiota del líquido amniótico.
- Revisar los últimos avances y proyectos que se están llevando a cabo sobre el microbioma del líquido amniótico.
- Dilucidar qué beneficios y perjuicios reporta el microbioma en el feto y posterior desarrollo.
- Correlacionar la presencia/ausencia de estos microorganismos con el desarrollo de ciertas enfermedades.

4. METODOLOGÍA

Este Trabajo Fin de Grado es una Revisión Bibliográfica y, para su realización, se han realizado consultas en diferentes artículos de revistas científicas obtenidas a través de: Pubmed, ISI web of Knowledge, Public Library of Science (PLOS), Medline, Science direct, IntraMed. También se han consultado libros de texto de Microbiología, así como páginas web.

Las palabras clave para la búsqueda han sido: *amniotic fluid, amniotic fluid formation, amniotic fluid regulation, amniotic fluid composition, microbiota, microbiome, microorganisms in amniotic fluid, amniotic fluid immunity, antimicrobial factors in amniotic fluid, microbial invasion of the amniotic cavity, preeclampsia, bacteriological analysis of amniotic fluid, chorioamnionitis, PROM, intra-amniotic infection, intra-amniotic inflammation.*

Los criterios de selección o filtros utilizados fueron: review, free full text, 10 years, clinical trial. Sin embargo, dada la escasez de información científica relacionada con el LA, en algunas ocasiones hemos recurrido a artículos menos recientes.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Gracias a las aportaciones de distintos estudios se ha podido caracterizar la microbiota del LA y analizar sus repercusiones desde el punto de vista de la salud y

protección y complicaciones. A continuación se tratarán algunas cuestiones planteadas relativas a las implicaciones que tiene el microbioma en el sistema inmune y la defensa frente a los patógenos o las complicaciones se pueden derivar de la invasión microbiana de la cavidad amniótica, entre otras.

5.1. Microorganismos, antígenos y sistema inmune

Durante el embarazo, se dan un conjunto de cambios fisiológicos, hormonales, inmunológicos y microbiológicos. Centrándonos en los microbiológicos, esto puede suponer unas consecuencias negativas, como el desarrollo de infecciones o, por el contrario, se puede traducir en un efecto protector. Aun así, hay evidencias clínicas y epidemiológicas que sugieren que, frente a estas consecuencias negativas como infecciones, las mujeres durante el embarazo tienen mayor susceptibilidad de sufrirlas, debido a los cambios inmunológicos (Fuhler, 2020).

Es conocido que la unidad materno-fetal está colonizada por microorganismos y esto es un requisito tanto para la preparación del sistema inmune como para la “maduración” metabólica y homeostasis hormonal (Staude et al., 2018), ya que los microorganismos pueden exponer al feto a distintos antígenos que “preparan” al sistema inmune y participan en su completo desarrollo (Borghi et al., 2019).

Cambios en el microbioma dan lugar a infecciones complicadas cuyo diagnóstico es fundamental ya que el feto está expuesto a la microbiota de la cavidad amniótica y experimenta una adaptación inmunológica, conocido como “Inmunotolerancia o Inmunoparálisis”. Este hecho consiste en que la exposición prolongada a la microbiota suprime la respuesta inmune fisiológica necesaria y esto no garantiza el adecuado aumento de los clásicos marcadores de la inflamación, dificultando así su diagnóstico (Staude et al., 2018).

De las partes del cuerpo que podrían funcionar como fuente de estimulación del sistema inmune microbiano, está el intestino, cuyo correcto establecimiento de diversas comunidades microbianas, resulta en una apropiada estimulación y preparación del sistema inmune innato y adaptativo (Ximenez y Torres, 2017; Walker et al., 2017). Es en el intestino donde la inmunidad innata, que es la que primeramente reconoce a los microorganismos, está más desarrollada, ya que una variedad de células epiteliales e inmunes codifican receptores moleculares para ligandos de origen microbiano como polisacáridos o lipopolisacáridos (Francino, 2014). Esta microbiota del intestino se

desarrolla en la etapa prenatal en el útero tal y como se muestra en estudios del meconio (Walker et al., 2017) con una estrecha relación al propio desarrollo del sistema inmune. Y es ahí donde se desarrolla su microbiota, en el útero, en presencia del LA, ya que éste tiene un papel significativo dentro del sistema inmune innato al albergar alguno de sus componentes (Underwood et al., 2005). Alcanzar un equilibrio adecuado en el proceso de la colonización del intestino es el primer requisito para la modulación del sistema inmune y la inducción de la tolerancia inmunológica. Algún fallo en este proceso, como una exposición reducida a los microorganismos, resulta en una colonización del intestino alterada, que da lugar a desajustes en el balance inmune y enfermedades (Francino, 2014).

Además, la placenta expresa antígenos fetales, que junto con las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) en las cuales son presentados, pueden no ser reconocidos por el sistema inmune de la madre; esto significa que la inmunidad materna puede dañar el propio desarrollo del feto (Fuhler, 2020), por ejemplo, el feto podría ser rechazado, algo que no ocurre; esto se conoce como “Paradoja inmunológica del embarazo” (Solano, 2019). Este hecho, fue reconocido hace años por Sir Peter Medawar (1977), el cual atribuyó dicha “Paradoja” a que la placenta supone una barrera que limita el contacto entre los compartimentos maternos y fetales, así se muestra en la Figura 5 (Solano, 2019). Hoy en día se conoce que más que una supresión inmune lo que se da es un equilibrio o “sintonía” de las respuestas inmunes en la gestación para proteger al feto de las respuestas aloinmunes (Solano, 2019).

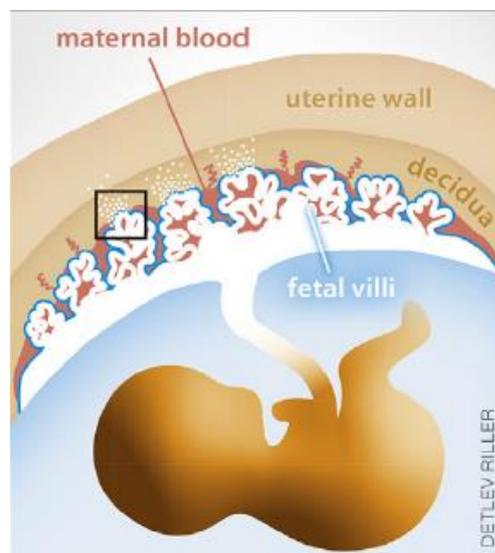


Figura 5. Vista esquemática de la interfase uterina-placentaria (Solano, 2019).

Teniendo en cuenta todos estos aspectos, podemos afirmar que la exposición a los microorganismos en el LA contribuyen al inicio de una maduración inmune en el útero y que posteriormente, en el periodo postparto y durante los primeros años de vida, tiene lugar las etapas esenciales para terminar el desarrollo del mismo sistema inmune (Leshem et al., 2020) además, es importante un adecuado equilibrio entre los antígenos fetales y los agentes infecciosos (Fuhler, 2020).

5.2. Microorganismos y protección frente a infecciones

Ya desde el año 1975, Larsen y Schlievert trabajaron en la idea de que en el LA existían sustancias que inhibían el crecimiento de los microorganismos. Durante años de estudio se ha confirmado la capacidad antibacteriana del LA, que llega a su punto máximo entre la semana 36-40 de la gestación. Esta protección del feto frente a los patógenos, es gracias al efecto combinado de ciertos factores antibacterianos encontrados en el LA como lisozimas, peroxidasas, transferrina, lactoferrina, cistatina C, complejos de proteína-zinc, etc (Ahn et al., 2004; Mao et al., 2019).

Dentro de la matriz compleja que forma el LA, compuesta por una fracción insoluble (elementos celulares, lanugo, vérnix...) y otra soluble (carbohidratos, proteínas, lípidos, electrolitos...), Mao et al. (2019) llegaron a la conclusión de que es en la fracción soluble donde se encuentra esta protección al llevar a cabo una aproximación donde se eliminaba la fracción insoluble y en la soluble, permanecían componentes y vesículas extracelulares que se ha demostrado que activan mecanismos endógenos, facilitando la respuesta inmune, la regeneración y recuperación de tejidos. De entre los compuestos solubles, destacamos tres de las proteínas encontradas: la lactoferrina, cistatina C y lisozima. La cistatina C y la lactoferrina, fueron las proteínas antibacterianas más expresadas, y de ellas, la cistatina C es una de las cinco más abundante de las trescientas que fueron identificadas y cuantificadas. La transferrina, por ser también un inhibidor bacteriano al desplazar el hierro del LA (Ahn et al., 2004).

- La cistatina C es una proteína inhibidora que está presente en la mayoría de los tejidos y fluidos corporales, con una importante función moduladora de la respuesta inflamatoria, al regular la acción de los neutrófilos (Mao et al., 2019).
- Por su parte la lactoferrina, proteína más abundante del suero de la leche humana, inhibe a los patógenos gracias a su capacidad para la unión del hierro, elemento traza necesario para la supervivencia y proliferación de los microorganismos ya que

constituye el cofactor de la mayoría de las enzimas; presente en el LA y con elevada afinidad por el hierro, no quedando disponible para el uso de las bacterias (Ahn et al., 2004; Underwood et al., 2005; Mao et al., 2019).

Frente a estas proteínas, las bacterias han desarrollado sistemas de captación de hierro, considerados como determinantes de virulencia ya que permite su supervivencia en el LA bajo condiciones restrictivas como la baja disponibilidad de hierro. Por lo tanto, si las bacterias pueden crecer o no en el LA, dependerá de la expresión de dichos sistemas de captación, altamente expresados como en el caso de *Staphylococcus aureus* (Ahn et al., 2004).

Otra proteína importante es la β_2 -microglobulina, componente del MHC de clase I. Contribuye a la defensa cuando las células amnióticas están expuestas a los patógenos y su importante actividad antibacteriana ha sido estudiada frente a la inhibición del crecimiento de microorganismos como *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* (Kim et al., 2012). Además, otro aspecto importante de esta actividad bactericida del LA depende de la relación fosfato-zinc (Acosta y Duva, 1981). Hay una relación indirecta entre el ion fosfato del LA y la cantidad de zinc, de manera que la actividad antibiótica es mayor cuando disminuye el fosfato, lo cual ocurre al término de la gestación (Botella y Clavero, 1993). Acosta y Duva (1981) llegaron a la conclusión de que la relación de fosfato-zinc predice la capacidad inhibidora del LA, indicando los siguientes valores:

- relación <100: efecto bactericida
- relación 110-200: efecto bacteriostático
- relación >200: ninguna actividad antibacteriana

Esta relación de fosfato-zinc, por consiguiente, determina el riesgo del feto frente a una infección bacteriana (Acosta y Duva, 1981). En resumen, son los péptidos y las proteínas antimicrobianas las que constituyen la primera línea de defensa frente a las bacterias, virus y hongos; su importancia y el papel de la microbiota intestinal en la secreción y la regulación en las infecciones, ha sido ampliamente demostrada (Kim et al., 2012; Leshem et al., 2020).

5.3. Microorganismos y complicaciones

5.3.1. Invasión microbiana de la cavidad amniótica (MIAC)

En primer lugar, tal y como introducimos anteriormente, la MIAC (*invasión microbiana de la cavidad amniótica*) es considerado el principal agente etiológico de parto prematuro y la principal causa de mortalidad neonatal en el mundo (DiGiulio, 2012). Se trata de un estado subclínico de infección relacionado como hemos mencionado con la etiopatología del parto prematuro, pero principalmente a edades gestacionales tempranas (Cobo et al., 2017).

Para establecer los principales microorganismos que pueden llegar a producir las MIAC, se han utilizado diferentes aproximaciones experimentales, entre los que destacamos primeramente el uso de diferentes medios de cultivo, que aunque dan una aproximación bastante buena, debemos tener en cuenta que la mayoría de los microorganismos no son cultivables y debido al sesgo sistemático, se deduce que la especie recuperada más frecuentemente en los cultivos pueden no ser numéricamente dominante o de importancia clínica relevante entre los todos los miembros presentes en la muestra (DiGiulio, 2012).

Utilizando diferentes medios de cultivo, se ha detectado que las bacterias que causan frecuentemente las MIAC son: *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Fusobacterium spp.* pero también *Streptococcus spp.* y *Bacteroides spp.* (DiGiulio, 2012; Cobo et al., 2017). Por ello, se empezó a utilizar una aproximación molecular mediante el uso de la PCR que permitía la detección de microorganismos sin la necesidad de aislarlos. En esta línea se prestó especial énfasis a las especies de los géneros *Ureaplasma* y *Mycoplasma* como los microorganismos más frecuentes en invadir la cavidad amniótica y producir MIAC (DiGiulio, 2012).

Tanto la utilización de los medios de cultivo como el uso de la PCR son técnicas complementarias en la detección de las MIAC y ninguna de ellas de forma individual, puede ser de confianza para excluir su diagnóstico (Combs et al., 2014). Un ejemplo de ellos se expone en la Tabla 2.

Tabla 2. Invasión microbiana de la cavidad amniótica y pruebas de detección (Combs et al., 2014).

Group classification	Organism identified	16S-ribosomal DNA result	Culture result	Amniotic fluid interleukin-6, ng/mL
Colonization-only	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Negative	Positive	1.8
Colonization-only	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Negative	Positive	1.0
Colonization-only	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	Negative	Positive	0.6

En este caso, las pruebas de la PCR resultaron negativas, los cultivos positivos y con bajos niveles de IL-6 y aun así, se han clasificado como casos de colonización por *Ureaplasma urealyticum*, siendo un microorganismo común de la microbiota del tracto genital, no implicando que *Ureaplasma* sea siempre benigno (Combs et al., 2014).

La Figura 6 muestra la distribución taxonómica de las bacterias asociadas con MIAC en tres estudios basados en 212 individuos de parto prematuro (Figura 6A), y 267 de tres estudios de rotura prematura de membranas (PROM) (Figura 6B) (DiGiulio, 2012).

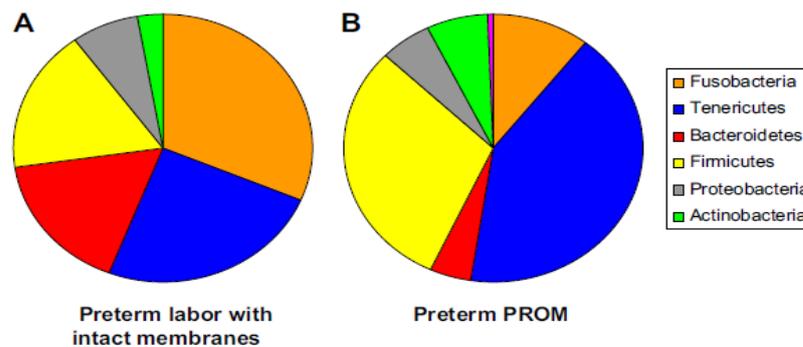


Figura 6. Distribución de filos bacterianos en muestras de LA de parto prematuro con membranas intactas y en casos de PROM (DiGiulio, 2012).

En la Figura 7 relativa al estudio de DiGiulio (2012) podemos comprobar los cuatro phylum predominantes que son *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*. A éstos, también añadimos *Fusobacteria* que marca la diferencia con respecto a otras localizaciones del cuerpo. También se observa una elevada prevalencia de los géneros *Sneathia* y *Leptotrichia* que no se esperaba, debido a la ausencia en los ensayos cultivo-dependientes realizados. De hecho, ahora parece que el género *Sneathia* es tan prevalente como *Mycoplasma*, género que ha sido considerado como el invasor más frecuente de la cavidad amniótica (DiGiulio, 2012). Por otro lado, sorprende también la poca prevalencia del género *Lactobacillus* en el LA presumiendo su elevada cantidad en la vagina (DiGiulio, 2012).

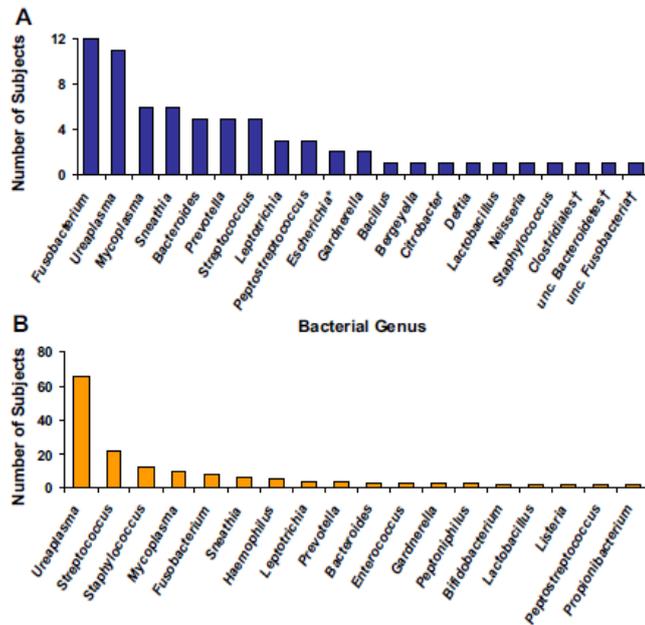


Figura 7. Géneros bacterianos prevalentes en el LA usando la técnica PCR. (A) Muestras obtenidas de mujeres con parto prematuro. (B) Muestras obtenidas de mujeres con prematuro PROM (DiGiulio, 2012).

Con respecto al significado clínico de los distintos microorganismos encontrados utilizando la metodología de PCR en el LA, resaltamos que, aunque la PCR nos permite estudiar microorganismos que no se pueden cultivar, hay razones que nos plantean si la detección de éstos con este método tiene relevancia clínica. Las dos razones son las siguientes:

- La PCR es capaz de detectar microorganismos no viables.
- La elevada sensibilidad de la PCR, la hace susceptible de cometer falsos positivos.

La mayoría de las bacterias que causan MIAC, tienen un origen endógeno, es decir la microbiota humana (Cobo et al., 2017); así, estos microorganismos que invaden la cavidad amniótica pueden llegar por cuatro rutas posibles, siendo las dos primeras las más importantes (DiGiulio, 2012; Kim et al., 2015):

- Migración ascendente desde la vagina y el cérvix
- Diseminación hematogénea seguido de invasión transplacentaria
- Siembra retrógrada de la cavidad peritoneal vía Trompas de Falopio
- Introducción accidental en el momento de la amniocentesis u otro proceso invasivo

En relación con las fuentes anatómicas de estos microorganismos, en primer lugar *Lactobacillus acidophilus* de la vagina constituye la principal fuente de microorganismos que producen MIAC. Su disminución y el aumento de las bacterias anaerobias y facultativas derivan en una vaginosis bacteriana, que podría aumentar el riesgo de

embarazo prematuro. Con respecto a la orofaringe, también se considera una fuente de microorganismos que causan MIAC, entre ellos *Fusobacterium* o *Streptococcus*. Y por último, en el intestino, *Faecalibacterium spp.* y *Coprobacillus spp.* pueden también llegar a producir este tipo de complicación (DiGiulio, 2012). La patogénesis de las MIAC estará influenciada por algunos factores como la respuesta materna y fetal, la capacidad de adhesión, de formación de biofilms o la colonización vaginal (DiGiulio, 2012). Además de bacterias, también se han descrito algunos parásitos, virus y protozoos (*Toxoplasma* y *Trypanosoma*) como posibles responsables de producir MIAC (Ahmadian et al., 2020).

Un conocimiento sobre la diversidad de los microorganismos que causan MIAC, será importante para el desarrollo de la prevención, diagnóstico y tratamiento (DiGiulio, 2012) ya que esta colonización puede dar lugar a otras afecciones como infección, inflamación intraamniótica, corioamnionitis, de forma que alguno de los microorganismos mencionados en este apartado tendrán relevancia o protagonismo en algunas de las patologías derivadas de la colonización.

5.3.2. Preeclampsia

Además de las MIAC, otra de las principales causas de morbilidad y mortalidad en madres y niños es la preeclampsia (PE) (Ahmadian et al., 2020). Es una de las complicaciones más serias en obstetricia debida a su rápido desarrollo, de etiología no clara y exclusiva de embarazos en humanos (Moura et al., 2012). Dicha complicación se manifiesta con hipertensión y proteinuria, después de veinte semanas de gestación, que puede incluso llegar a producir daño en algunos órganos como el hígado y los riñones principalmente (Dunn et al., 2019; Ahmadian et al., 2020).

Es conocido que existen microorganismos en la cavidad uterina, bucal, la vagina y en la placenta de mujeres embarazadas, y que cualquier alteración en ello, podría estar relacionado con la patogénesis de la PE (Ahmadian et al., 2020); de hecho, se ha demostrado que mujeres con bacteriuria asintomática, infección del tracto urinario, enfermedad periodontal y pielonefritis crónica, están sujetas a un mayor riesgo de sufrir PE (Moura et al., 2012; Dunn et al., 2019). Sin embargo, el mecanismo principal que modifica la microbiota no se conoce con certeza. La PE se caracteriza por función vascular deteriorada y activación de la inflamación sistémica materna en varios órganos, que puede verse agravada por muchos factores como la infección (Dunn et al., 2019). En este sentido, se han hecho estudios que confirman la influencia de la infección bacteriana

en el desarrollo de PE (Ahmadian et al., 2020). Para poder explicar el mecanismo por el cual las bacterias se relacionan con la PE, en la Figura 8 se ilustra una posible hipótesis de este fenómeno (Ahmadian et al., 2020).

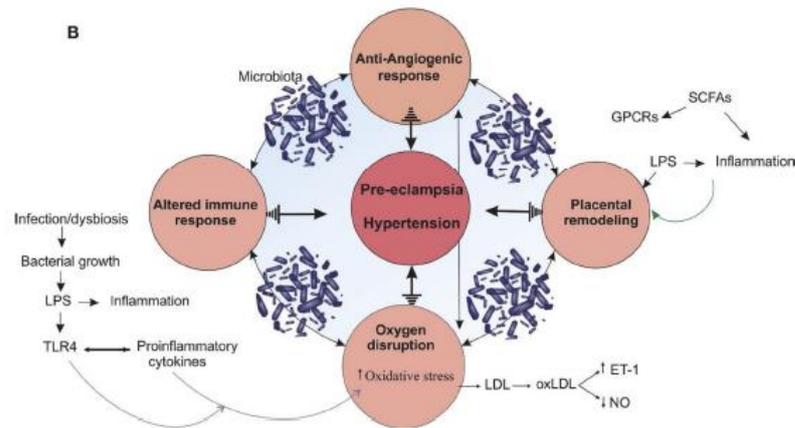


Figura 8. Implicación de los microorganismos en la patología de la PE (Ahmadian et al., 2020).

Todo esto se explica por la activación de factores angiogénicos e inflamatorios que perjudica las funciones endoteliales y trofoblásticas y aumenta la presión sanguínea (Ahmadian et al., 2020). Esta predisposición a la disfunción endotelial en la madre se ve acelerada con la infección (Moura et al., 2012). Recientemente, en muestras de plasma en pacientes con PE, los niveles altos de lipopolisacáridos (LPS) y óxido-N-trimetilamina (TMAO) señalaban el impacto de la microbiota intestinal en la PE (Ahmadian et al., 2020) ya que los LPS, constituyen los antígenos superficiales más importantes de las bacterias que activan la respuesta inmune. Esta activación de la inflamación por LPS, ocurre a través del receptor TLR (toll-receptor) (Ahmadian et al., 2020). Además, puede haber bacterias latentes que no se detectan con las técnicas microbiológicas convencionales y se ha detectado que producen antígenos y otros factores inflamatorios comunes a la del hospedador. Este proceso es conocido como “mimetismo molecular” (Ahmadian et al., 2020).

Se ha establecido una importante relación entre la disbiosis de la microbiota de distintas partes del cuerpo con la incidencia y desarrollo de la PE; por ello, revisaremos a continuación los microorganismos que podrían estar implicados. Las principales comunidades bacterianas relacionadas con la PE, se muestran en la Figura 9 (Ahmadian et al., 2020). En primer lugar, en la microbiota oral podemos encontrar los siguientes microorganismos de interés: *Tannerella forsythensis*, *Eikenella corrodens* y *Porphyromonas gingivalis*; además de *S. haemolyticus* que ha sido detectado en mujeres

con una PE suave o moderada (Ahmadian et al., 2020). Estas especies podrían dar lugar a periodontitis, que ha sido relacionada clínicamente con la preeclampsia (Moura et al., 2012). Dichos microorganismos pueden considerarse como la conexión entre las enfermedades crónicas periodontales y el desarrollo de la PE, a través del siguiente mecanismo: la exposición continuada a los microorganismos, deriva en una bacteriemia, dando lugar a endotoxinas bacterianas que pueden simular como un proceso inflamatorio sistémico e inducir al fin la liberación de citoquinas proinflamatorias (Ahmadian et al., 2020). Estos acontecimientos, seguido de una respuesta crónica sistémica, incluyendo la proteína C-reactiva y la IL-6, terminarían desarrollando la disfunción endotelial. Por ello, las enfermedades periodontales pueden aumentar el riesgo de sufrir PE (Ahmadian et al., 2020). En relación a la microbiota del intestino, destacamos durante el primer trimestre del embarazo la presencia de las bacterias de los phylum *Bacteroidetes* y *Firmicutes*. La disbiosis de la microbiota intestinal que conforman, además de un aumento de las bacterias productoras de lactato y una disminución de las bacterias productoras de acetato y butirato, está relacionado con la hipertensión de la PE (Ahmadian et al., 2020). En la placenta de una mujer con PE, podemos encontrar una variedad de bacterias comensales y patógenas como *Escherichia*, *Salmonella* y *Listeria*. Sin embargo, este estudio ha concluido que la infección de la placenta humana no es una causa común de PE y complicaciones del embarazo (Ahmadian et al., 2020). No obstante, la presencia de *Streptococcus agalactiae* en la placenta puede considerarse como una de las principales causas de sepsis neonatal (Ahmadian et al., 2020).

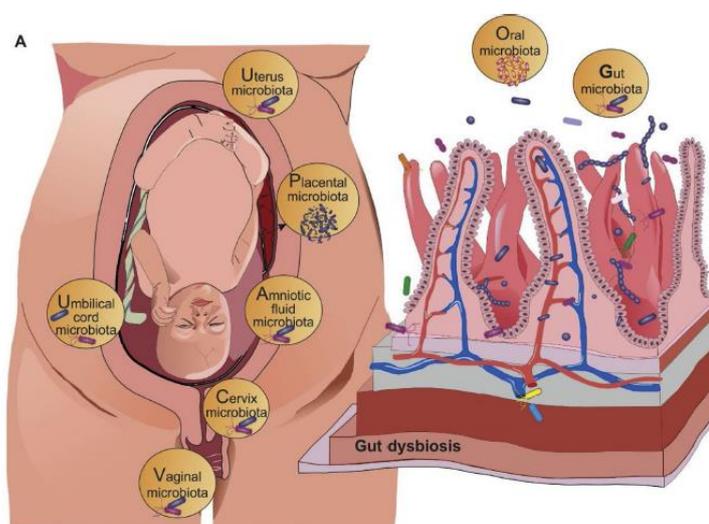


Figura 9. Papel de las comunidades bacterianas en la PE (Ahmadian et al., 2020).

5.3.3. Infección e inflamación intraamniótica

Otra de las situaciones desfavorables que se pueden dar durante el embarazo relacionado con microorganismos en el LA son las infecciones intraamnióticas. Es una situación patológica caracterizada por elevadas concentraciones de IL-6 ($>2'6$ ng/mL) en el LA y/o corioamnionitis histológica y funisitis, que puede derivar en complicaciones (Romero et al., 2019). Entre estas complicaciones, destacamos que tanto la inflamación como la infección, son causas bien documentadas de parto prematuro con membranas intactas (Combs et al., 2014; Staude et al., 2018) ya que un conjunto de evidencias sugiere que en la cavidad amniótica de una mujer con parto prematuro, alberga gran cantidad de microorganismos (DiGiulio et al., 2008). Así, Combs et al. (2014) describe en su estudio posibles casos que se pueden encontrar al analizar el LA:

- infección (invasión microbiana de la cavidad amniótica (MIAC) e inflamación presente)
- inflamación (respuesta inflamatoria, pero sin llegar a producir MIAC)
- colonización (MIAC, pero sin respuesta inflamatoria)
- prueba negativa para cualquiera de los casos anteriores

Con respecto a la inflamación, la colonización placentaria por grupos específicos de microorganismos puede aumentar o disminuir el riesgo de una inflamación sistémica independientemente de otros factores y, además, la colonización por estos microorganismos puede determinar la circulación de proteínas inflamatorias después del nacimiento. Por el lado contrario, destacamos *Lactobacillus*, que podría suprimir la respuesta inflamatoria en recién nacidos prematuros (Fichorova et al., 2011). Sin embargo, la inflamación intraamniótica, también puede ocurrir en ausencia de microorganismos detectables (Theis et al., 2020).

Debido a la necesaria “urgencia” en el diagnóstico de las infecciones intraamnióticas citado anteriormente, preferentemente se lleva a cabo el análisis directo del LA, ya que se comprobó que los estudios microbiológicos e histológicos de la placenta no sirven para estudiar la severidad de la infección e inflamación (Pettker et al., 2007). Para determinar la diversidad y la abundancia de microorganismos en el LA en los partos prematuros, DiGiulio et al. (2008) utilizaron la técnica de PCR, además de los medios de cultivo, para estudiar el LA de 166 sujetos. Los resultados que se obtuvieron están recogidos en la Figura 10.

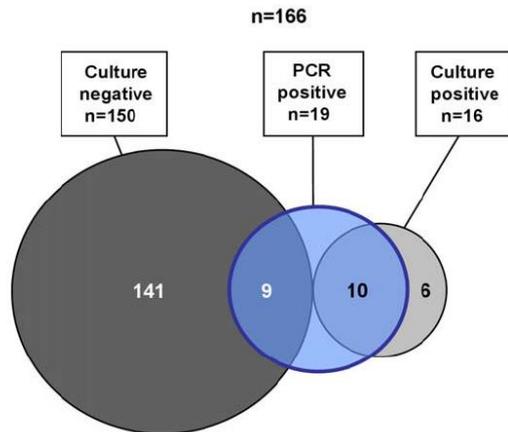


Figura 10. Comparativa de hallazgos de microorganismos en LA utilizando técnicas cultivo-dependientes y PCR. Se utilizó la PCR con cebadores para bacterias, hongos y arqueas. Los cultivos para las bacterias se realizaron en condiciones aeróbicas, anaeróbicas y específicos para micoplasmas genitales (DiGiulio et al., 2008).

En los 25 pacientes que fueron positivos para la PCR o los cultivos, se identificaron, como los más frecuentes, los microorganismos que se muestran en la Figura 11.

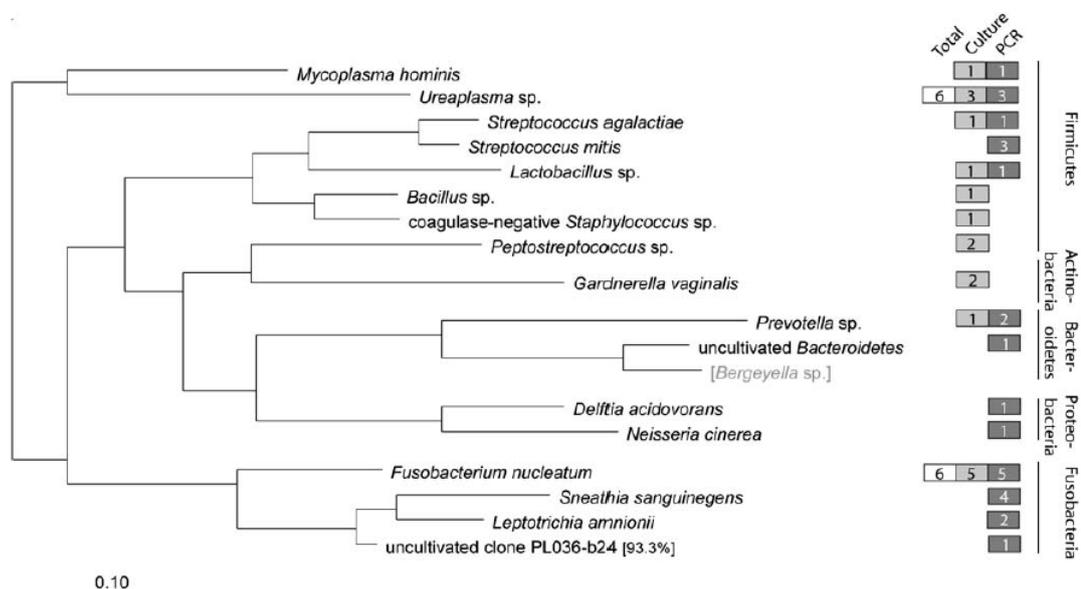


Figura 11. Diversidad microbiana del LA. Microorganismos más frecuentemente encontrados y el número de veces obtenidos en cada una de las pruebas utilizadas, tanto cultivo como PCR (DiGiulio et al. 2008).

Este estudio reveló asociaciones significativas entre la presencia y cantidad de microorganismos o su ADN en el LA y el parto prematuro u otras consecuencias clínicas relevantes (DiGiulio et al., 2008). Entre ellos, *Ureaplasma spp.* y *Fusobacterium spp.* son los más significativamente asociados a los desenlaces negativos en el embarazo (DiGiulio et al, 2008; Payne y Bayatibojakhi, 2014).

Resaltamos que la invasión polimicrobiana de la cavidad amniótica, representa aproximadamente el 30% de los casos (Kim et al., 2015). Hay muchas formas de invasión de la cavidad intraamniótica, siendo la principal la infección ascendente desde el tracto genital bajo, llegando a colonizar las membranas fetales, el LA, la placenta y el feto (Staude et al., 2018; Payne y Bayatibojakhi, 2014; Kim et al., 2015). Estas formas se encuentran representadas en la Figura 12 (Kim et al., 2015). Más recientemente las evidencias sugieren el paso de los microorganismos vía hematógica desde la madre a la cavidad amniótica (Payne y Bayatibojakhi, 2014).

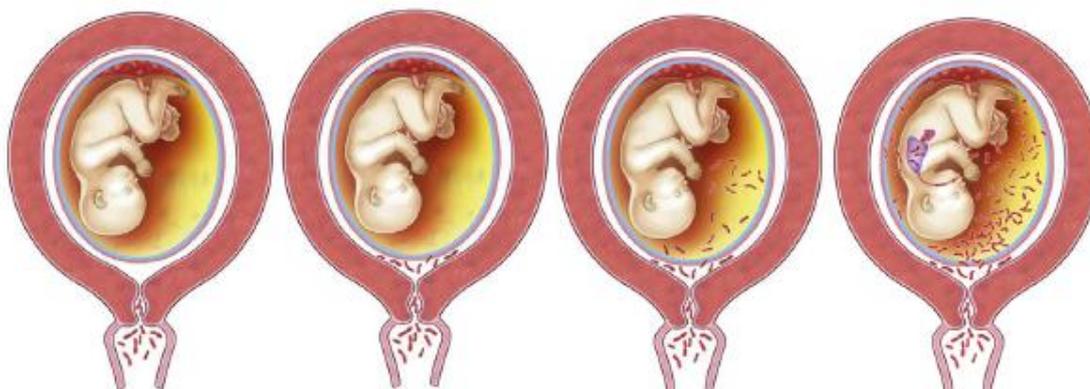


Figura 12. Fases de la infección intraamniótica ascendente. En la primera fase, el proceso de la infección ascendente corresponde a un cambio en la microbiota vaginal/cervical o a la presencia de organismos patológicos en el cérvix. Una vez que los microorganismos alcanzan la cavidad amniótica, residen en la parte inferior del útero entre las membranas y el corion (Fase II). En la siguiente fase, dan lugar a la infección intraamniótica. Y por último, los microorganismos, pueden invadir al feto por distintas vías de entrada (Fase IV) (Kim et al., 2015).

Las técnicas como MALDI-TOF y la secuenciación del ARNr 16S han determinado que los microorganismos encontrados en el LA en esta situación patológica coinciden con los que habitualmente colonizan la vagina (Romero et al., 2019). Además, a continuación se indican evidencias que apoyan la idea de que el paso de los microorganismos desde la vagina es la forma más común de invasión (Romero et al., 2019):

- Los microorganismos detectados en el LA, están frecuentemente asociados con la vagina humana.
- En el embarazo de gemelos, cuando hay una infección intraamniótica, los microorganismos se encuentran en el saco.
- En las mujeres con vaginosis bacteriana, el cambio de los microorganismos de su vagina, están relacionado con la infección intraamniótica.

- En los casos de sepsis neonatal temprana o neumonía neonatal, los microorganismos encontrados son similares a los encontrados en la vagina.
- En un estudio experimental de mujeres no embarazadas, se colocaron nanopartículas de carbono dentro de la vagina, y estas partículas fueron recuperadas en las Trompas de Falopio en 28-34 minutos.
- Además, las contracciones uterinas, particularmente durante el embarazo, podrían contribuir a la infección ascendente.

El estudio de Romero et al. (2019) nos ha permitido saber qué microorganismos podemos. El 75% de las pacientes tenían bacterias en su LA que son típicas comensales de la vagina, entre ellas *Ureaplasma urealyticum*, *Escherichia coli* y *S. agalactiae*. El resto de pacientes, el 25%, tenían bacterias que no estaban asociadas con la vagina como pueden ser *Staphylococcus warneri* y *Streptococcus anginosus*. Esto se representa gráficamente en la Figura 13A. Cuando se estudiaron los hisopos de LA y vagina de la madre, en un 62,5% de los casos coincidieron ambos hisopos estudiados empleando la secuenciación de ARNr 16S que se muestra gráficamente en la Figura 13 A y B.

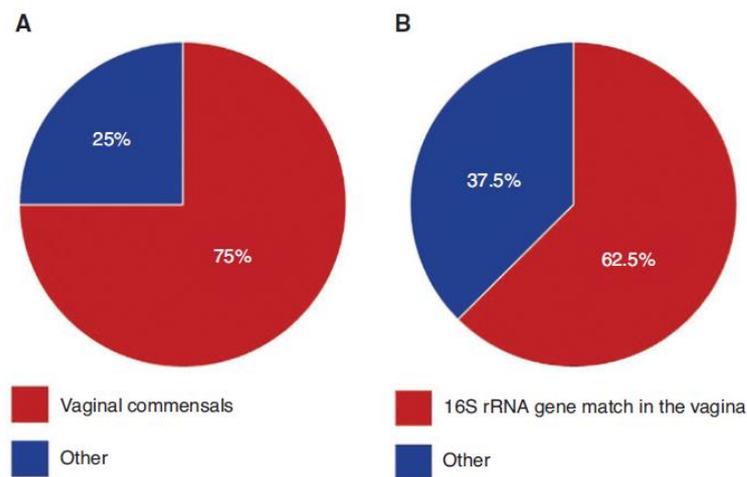


Figura 13. Coincidencia de microbiota en el LA y en la vagina. (A) Porcentaje de mujeres cuyas bacterias han sido aisladas de muestras del LA y que son típicas comensales del ecosistema humano vaginal. (B) Presencia de genes detectados entre la microbiota vaginal y la del LA (Romero et al., 2019).

En relación con las principales OTUs (unidad taxonómica operativa) comunes entre el LA y las muestras vaginales son *Sneathia*, *Lactobacillus*, *Gardnerella* y *Prevotella* (Romero et al., 2019). De ellas, *Lactobacillus* tiene un bajo riesgo de invasión de la cavidad amniótica, mientras que *Sneathia* tiene una mayor probabilidad de invasión

(Staude et al., 2018). No obstante, hay mujeres que desarrollan infecciones intraamnióticas y otras que no. Esto se puede explicar porque hay que tener en cuenta distintos aspectos (Romero et al., 2019):

- Durante el embarazo, el cérvix uterino produce moco con propiedades antimicrobianas; la pérdida de este moco puede dar lugar a una infección intraamniótica.
- Las membranas corioamnióticas representan una barrera física y bioquímica frente a los microorganismos; pacientes con PROM, tienen más posibilidades de sufrir este tipo de infecciones.
- El LA cuenta con factores antimicrobianos que podrían controlar la infección; además de células del sistema inmune.
- Las mujeres con disbiosis en los microorganismos de su tracto genital, pueden tener predisposición a la infección.
- Y por último, también intervienen factores de virulencia, que explica la razón por la que algunos microorganismos alcanzan la cavidad amniótica y otros no. Estos factores de virulencia han sido detectados por ejemplo en *Ureaplasma spp.* y *Mycoplasma spp.*

Además de los microorganismos de la vagina, podemos encontrarnos en el LA otros microorganismos procedentes de otras fuentes como la cavidad oral y el tracto gastrointestinal, que acompañado de alteraciones microbianas y causas metabólicas, contribuyen al parto prematuro, así se muestra en la Figura 14 (Staude et al., 2018).

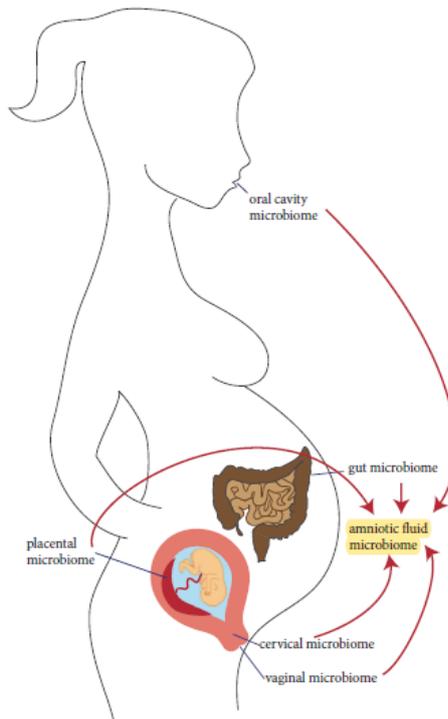


Figura 14. Hipótesis de flujo de la microbiota del LA y parto prematuro. El microbioma de la cavidad amniótica se ha pensado siempre que proviene del microbioma cervical y vaginal. Sin embargo, la microbiota de la cavidad oral, intestino e incluso la placenta supone una importante contribución al microbioma de la cavidad amniótica principalmente vía hematogéna (Staude et al., 2018).

En resumen, en la mayoría de las mujeres, los microorganismos que causan las infecciones intraamnióticas forman parte de la microbiota vaginal, apoyado por la hipótesis de que la infección ascendente es la ruta más común de invasión microbiológica de la cavidad amniótica, con el desenlace de un parto prematuro espontáneo y membranas intactas en la mayoría de los casos (DiGiulio et al., 2008; Romero et al., 2019).

5.3.4. Corioamnionitis

La corioamnionitis es una causa común de parto prematuro cuando la infección bacteriana está presente, ya que se produce la liberación de endotoxinas y exotoxinas, se estimula la liberación de citoquinas desde las membranas deciduales y fetales, induciendo las contracciones uterinas y/o la ruptura de las membranas (Peng et al., 2018). Podemos diferenciar dos tipos de corioamnionitis: la corioamnionitis subclínica/histológica que hace referencia a lesiones inflamatorias agudas de alguna de las tres estructuras que forman la placenta con importancia clínica significativa, pero no necesariamente es evidencia de una infección intraamniótica (Kim et al., 2015). Es más común que la corioamnionitis clínica y es asintomática (Peng et al., 2018). La corioamnionitis clínica

está caracterizada por fiebre en la madre, sensibilidad uterina, leucocitosis, taquicardia maternal y/o fetal, ruptura prematura de membrana, etc. (Sweeney et al., 2016; Peng et al., 2018). Hay que aclarar que la funisitis en cambio, hace referencia al proceso inflamatorio que se da en el cordón umbilical (Kim et al., 2015). El estudio histológico de la placenta es considerado la mejor forma de diagnóstico de la corioamnionitis (Sweeney et al., 2016).

En un principio, se había considerado que estas lesiones inflamatorias eran el reflejo de la presencia de una infección en el LA, sin embargo, recientemente se ha mostrado que una inflamación “estéril”, es más frecuente que una infección intraamniótica en pacientes con parto prematuro con membranas intactas o con rotura de membranas. Por lo tanto, la idea de que la corioamnionitis aguda pueda estar presente sin infección intraamniótica está ganando peso (Kim et al., 2015). Existen algunas explicaciones a este hecho:

- La inflamación de las membranas corioamnióticas es un mecanismo no específico de la defensa del hospedador
- La infección extraamniótica, es muy poco común
- Pueden existir microorganismos no viables que pueden producir inflamación placentaria a través de la producción de factores quimiotácticos

No obstante, de forma general este síndrome está asociado con la infección intraamniótica en al menos el 60% de los casos y es el mayor factor de riesgo de la sepsis neonatal (Romero et al., 2016). De hecho, normalmente la corioamnionitis se desarrolla en paralelo con la infección microbiana del corioamnios y el LA (Sweeney et al., 2016). Esta infección da lugar a la inflamación del corioamnios que es la manifestación de la respuesta inmune maternal y fetal. Frecuentemente es la corioamnionitis histológica que está más asociada con la infección intrauterina bacteriana, y puede coexistir con la funisitis (Peng et al., 2018).

Se han reconocido como posibles agentes causales de la corioamnionitis un conjunto de microorganismos, incluyendo bacterias, virus y menos frecuentemente los hongos. De ellos, los microorganismos a destacar son diferentes especies bacterianas del género *Ureaplasma* (*U. parvum* y *U. urealyticum*), *Fusobacterium spp.*, *Streptococcus spp.* y en menor medida *Gardnerella spp.*, *Mycoplasma spp.* y *Bacteroides spp.* (Sweeney et al., 2016). Dentro de éstos, *Ureaplasma spp.* es el microorganismo más común en el LA y la placenta de mujeres con corioamnionitis y funisitis (Romero et al., 2016; Sweeney et al., 2016). De hecho, se ha propuesto que la presencia de *Ureaplasma spp.* en el tracto genital

bajo podría ser un factor de riesgo de la corioamnionitis; aun así se detectan mujeres infectadas con este microorganismo que sufren corioamnionitis y otras que no, cuya posible explicación podría ser la capacidad de algunas especies de este microorganismo de evadir el sistema inmune. En este aspecto, podría intervenir factores de virulencia de *Ureaplasma spp.* como lo son los antígenos de banda múltiples (MBA), las fosfolipasas A y C, la proteasa IgA y el gen de la ureasa (Sweeney et al., 2016). En la práctica clínica, el término corioamnionitis, ha sido utilizado excesivamente e implica la presencia de condiciones infecciosas e inflamatorias que afectan a la madre, al feto y al recién nacido. Por ello, se acuña el término “Triple I” para indicar inflamación o infección intrauterina o ambos, restringiendo el término corioamnionitis al diagnóstico patológico (Sweeney et al., 2016; Peng et al., 2018).

5.3.5. Ruptura prematura de membranas (PROM)

Rehbinder et al. (2018), trabajaron con 10 muestras de LA procedente de 51 mujeres con membranas amnióticas intactas y con 14 muestras de LA, de mujeres con ruptura de membranas amnióticas (ROM) con la idea de estudiar la presencia de microbiota en muestras de LA en embarazos a término no complicados. Para ello, utilizaron varias técnicas como la PCR que se realizó en las muestras de LA procedente de mujeres sin rotura de membranas. Se encontró una baja cantidad de ADN bacteriano; mientras que en el grupo de mujeres con rotura de membranas (ROM), había elevada cantidad de ADN bacteriano. Mediante el empleo de la técnica de secuenciación y cultivos no fueron detectadas bacterias en el grupo de no rotura de membranas, y en el otro grupo, se detectaron bacterias en un 50% de los casos en condiciones aeróbicas, y en un 14,3% de los casos en condiciones aeróbicas. Además, las colonias fueron identificadas como bacterias habituales de la microbiota-vaginal y/o asociada a infecciones intrauterinas: *Streptococcus agalactiae*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus vaginallis*, *Peptoniphilus harei*, *Prevotella amnii*. La secuenciación del ARNr 16S de cinco de seis muestras de LA, reveló especies bacterianas que forman parte de la microbiota vaginal como son *Bifidobacterium*, *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Sneathia*...de las cuales algunas son conocidas por estar relacionadas con vaginosis bacteriana y/o infecciones.

Los resultados obtenidos por tanto, han cambiado la visión de que en los embarazos no complicados no existen comunidades bacterianas, al identificar bacterias comunes con

la microbiota de la placenta y del meconio al inicio del parto, con la ruptura de las membranas (Rehbinder et al., 2018). Es importante resaltar, que la ruptura de membranas no es necesariamente la forma en la que las bacterias alcanzan la cavidad amniótica; de hecho, hay evidencias de que las bacterias pueden atravesar membranas intactas (Kim et al., 2015). En definitiva, en el grupo ROM se encontraron especies que son conocidas por formar parte de la microbiota vaginal de una mujer en edad reproductiva, dominado por especies de *Lactobacillus* entre otras, que están relacionadas con vaginosis bacteriana; apoyando la idea de la colonización ascendente de la cavidad intrauterina en mujeres con rotura de membranas y comienzo próximo del parto. Por otro lado, en el grupo de no rotura de membranas, la cantidad de ADN encontrado fue demasiado baja para identificar microbiota bacteriana (Rehbinder et al., 2018). Esta rotura de membranas, se puede producir de forma “prematura” o temprana, conociéndose como ruptura prematura de membrana (PROM) y es aquella que ocurre antes del inicio del parto, a una edad gestacional menor a las 37 semanas (Escalante et al., 2010; Peng et al., 2018). La PROM constituye una condición heterogénea, caracterizada por la carga microbiana y/o la presencia de inflamación intraamniótica (Theis et al., 2020). En condiciones normales, existe un tapón mucoso cervical que protege junto con la integridad del corioamnios, de la colonización e infección de organismos presentes en la vagina; cuando ésta se rompe antes del parto, esta “protección” se pierde, aumentando el riesgo de infección, conocida como corioamnionitis la cual puede tener relación con la morbimortalidad perinatal (Escalante et al., 2010).

Pettker et al. (2007), en su estudio, indicaron los siete microorganismos aislados más frecuentes de cultivos de LA, en pacientes con ruptura prematura de membranas o parto prematuro. El microorganismo más frecuente aislado fue *Ureaplasma urealyticum*. Sus resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Principales microorganismos aislados de LA en pacientes con ruptura prematura de membranas o parto prematuro (Pettker et al., 2007).

Species	Isolates (n)	Frequency (%)
Amniotic fluid isolates		
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	12	31.5
<i>Bacteroides</i> species	4	10.5
Mixed gram-positive anaerobes	4	10.5
<i>Escherichia coli</i>	3	7.9
Group B <i>Streptococcus</i>	2	5.4
<i>Peptostreptococcus</i> species	2	5.4
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2	5.4

6. CONCLUSIONES

1. El intenso estudio del líquido amniótico ha evidenciado que el microbioma tiene un papel fundamental en el desarrollo del feto.
2. La exposición a los microorganismos en el líquido amniótico, permitirá al feto iniciar la maduración de su sistema inmune en condiciones normales, gracias principalmente a la colonización del intestino y a la presencia de sustancias con actividad antimicrobiana.
3. Existen circunstancias bajo las cuales algunos microorganismos debido a sus factores de virulencia o debido simplemente a disbiosis en los mismos, pueden llegar a producir la invasión microbiana de la cavidad amniótica, dando lugar a infecciones o inflamación.
4. Con relación a la corioamnionitis, se ha establecido que se desarrolla frecuentemente con infección intraamniótica, con un especial protagonismo de los microorganismos *Ureaplasma spp.* y *Fusobacterium spp.* aunque existen casos de corioamnionitis sin la presencia de infección.
5. Se ha establecido correlación entre la presencia de microorganismos no habituales en el LA con el desarrollo de afecciones como la preeclampsia, teniendo un papel destacado *S. haemolyticus*.
6. Por último, a pesar de la evidencia de los beneficios que nos aporta el microbioma, es evidente que alteraciones en su equilibrio pueden producir consecuencias negativas en el devenir de la gestación, como es el caso de la infección intrauterina o la preeclampsia que podrían dar lugar a un parto prematuro.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med.* 2014; 6 (237): 237-265.
- Ahmadian E, Rahbar Saadat Y, Hosseiniyan Khatibi SM, Nariman-Saleh-Fam Z, Bastami M, Zununi Vahed F et al. Pre-Eclampsia: Microbiota possibly playing a role. *Pharmacol Res.* 2020; 155: 104692.
- Ahn YJ, Park SK, Oh JW, Sun HY, Shin SH. Bacterial growth in amniotic fluid is dependent on the iron-availability and the activity of bacterial iron-uptake system. *J Korean Med Sci.* 2004; 19 (3): 333-340.
- Beall MH, van den Wijngaard JP, van Gemert MJ, Ross MG. Regulation of amniotic fluid volume. *Placenta.* 2007; 28 (8-9): 824-832.
- Beall MH, Wang S, Yang B, Chaudhri N, Amidi F, Ross MG. Placental and membrane aquaporin water channels: correlation with amniotic fluid volume and composition. *Placenta.* 2007; 28 (5-6): 421-428.
- Borghi E, Massa V, Severgnini M, Fazio G, Avagliano L, Menegola E et al. Antenatal microbial colonization of mammalian gut. *Reprod Sci.* 2019; 26 (8): 1045-1053.
- Botella Llusía J, Clavero Núñez JA. Tratado de ginecología. 14º ed. Madrid: Ediciones Díaz de Santos; 1993: 140-141.
- Botero LE, Delgado-Serrano L, Cepeda Hernandez ML, Del Portillo Obando P, Zambrano Eder MM. The human microbiota: The role of microbial communities in health and disease. *Acta biol Colomb.* 2016; 21(1): 5-15.
- Cao B, Stout MJ, Lee I, Mysorekar IU. Placental Microbiome and Its Role in Preterm Birth. *Neoreviews.* 2014; 15 (12): e537-e545.
- Cobo T, Vives I, Rodríguez-Trujillo A, Murillo C, Ángeles MA, Bosch J et al. Impact of microbial invasion of amniotic cavity and the type of microorganisms on short-term neonatal outcome in women with preterm labor and intact membranes. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2017; 96 (5): 570-579.
- Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci Rep.* 2016; 6: 23129.
- Combs CA, Gravett M, Garite TJ, Hickok DE, Lapidus J, Porreco R et al. Amniotic fluid infection, inflammation and colonization in preterm labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol.* 2014; 210 (2): 1-15.

- Cox MJ, Cookson WO, Moffatt MF. Sequencing the human microbiome in health and disease. *Hum Mol Genet.* 2013; 22 (R1): R88-94.
- DiGiulio DB. Diversity of microbes in amniotic fluid. *Semin fetal neonat m.* 2012; 17 (1): 2-11.
- DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, Gotsch F et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PloS One.* 2008; 3(8): e3056-e3056.
- Dunn AB, Hanson L, VandeVusse L, Leslie S. Through the microbial looking glass: premature labor, preeclampsia and gestational diabetes. *J Perinat Neonat Nurs.* 2019; 33 (1): 35-51.
- Escalante López G, Rojas Alvarado S, Ortiz Arosemena E, Moya Sibaja R, Chávez MO, Mora DC. Análisis bacteriológico y bioquímico de líquido amniótico en pacientes con ruptura prematura de membranas. *Acta Médica Costarricense.* 2010; 37(1): 26-32.
- Fichorova RN, Onderdonk AB, Yamamoto H, Delaney ML, DuBois AM, Allred E et al. Maternal microbe-specific modulation of inflammatory response in extremely low-gestational-age newborns. *mBio.* 2011; 2(1): e00280-10.
- Finotello F, Mastrorilli E, Di Camillo B. Measuring the diversity of the human microbiota with targeted next-generation sequencing. *Brief Bioinform.* 2018; 19 (4): 679-692.
- Francino MP. Early development of the gut microbiota and immune health. *Pathogens.* 2014; 3 (3): 769-790.
- Fuchs F. The volume of the amniotic fluid at the various stages of pregnancy. *Clin Obst and Gynecol.* 1966; 9 (2): 455.
- Fuhler GM. The immune system and microbiome in pregnancy. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2020; 44-45: 1-8.
- Fujimura KE, Lynch SV. Microbiota in allergy and asthma and the emerging relationship with the gut microbiome. *Cell Host Microbe.* 2015; 17 (5): 592-602.
- González-Merlo J, González Borquet E. La placenta, las membranas ovulares, el líquido amniótico y sus funciones. En: González-Merlo J, editor. *Obstetricia.* 7ª ed. Madrid: Elsevier; 2018. p. 57-59.
- Icaza-Chávez ME. Microbiota intestinal en la salud y la enfermedad. *Rev Gastroenterol Mex.* 2013; 78 (4): 240-248.

- Kim CJ, Romero R, Chaemsaitong P, Chaiyasit N, Yoon BH, Kim YM. Acute chorioamnionitis and funisitis: definition, pathologic features and clinical significance. *Am J Obstet Gynecol*. 2015; 213 (4): 29-52.
- Kim JY, Park SC, Lee JK, Choi SJ, Hahm KS, Park Y. Novel antibacterial activity of β_2 -Microglobulin in human amniotic fluid. *PloS One*. 2012; 7 (11): 1-6.
- Kunc M, Gabrych A, Witkowski JM. Microbiome impact on metabolism and function of sex, thyroid, growth and parathyroid hormones. *Acta Biochim Pol*. 2016; 63 (2): 189-201.
- Leshem A, Liwinski T, Elinav E. Immune-Microbiota Interplay and Colonization Resistance in Infection. *Mol Cell*. 2020; 78 (4): 1-17.
- Lim ES, Rodriguez C, Holtz LR. Amniotic fluid from healthy term pregnancies does not harbor a detectable microbial community. *Microbiome*. 2018; 6 (1): 6-87.
- Luo H, Xie A, Hua Y, Wang J, Liu Y, Zhu X. *Aquaporin 1* gene deletion affects the amniotic fluid volume and composition as well as the expression of other aquaporin water channels in placenta and fetal membranes. *Clin Chim Acta*. 2018; 482: 161-165.
- Mann SE, Ricke EA, Torres EA, Taylor RN. A novel model of polyhydramnios: amniotic fluid volume is increased in aquaporin 1 knockout mice. *Am J Obstet Gynecol*. 2005; 192 (6): 2041-2044.
- Mao Y, Pierce J, Singh-Varma A, Boyer M, Kohn J, Reems JA. Processed human amniotic fluid retains its antibacterial activity. *Transl Med*. 2019; 17 (68): 1-9.
- Morgan-Ortiz F, Morgan-Ruiz FV, Quevedo-Castro E, Gutierrez-Jiménez G, Báez-Barraza J. Anatomía y fisiología de la placenta y líquido amniótico. *Rev Med UAS*. 2015; 5 (4): 156-164.
- Moura da Silva G, Coutinho SB, Piscoya MD, Ximenes RA, Jamelli SR. Periodontitis as a risk factor for preeclampsia. *J Periodontol*. 2012; 83 (11): 1388-1396.
- Payne MS, Bayatibojakhi S. Exploring preterm birth as a polymicrobial disease: an overview of the uterine microbiome. *Front Immunol*. 2014; 595 (5): 1-12.
- Peng CC, Chang JH, Lin HY, Cheng PJ, Su BH. Intrauterine inflammation, infection, or both (Triple I): A new concept for chorioamnionitis. *Pediatr Neonatol*. 2018; 59 (3): 231-237.
- Pérez-Muñoz ME, Arrieta M, Ramer-Tait AE, Walter J. A critical assessment of the "sterile womb" and "in utero colonization" hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*. 2017; 48 (5): 1-19.

- Pettker CM, Buhimschi IA, Magloire LK, Sfakianaki AK, Hamar BD, Buhimschi CS. Value of placental microbial evaluation in diagnosing intra-amniotic infection. *Obstet Gynecol.* 2007; 109 (3): 739-749.
- Reh binder EM, Lodrup Carlsen KC, Staff AC, Angell IL, Landro L, Hilde K et al. Is amniotic fluid of women with uncomplicated term pregnancies free of bacteria? *Am J Obstet Gynecol.* 2018; 219 (3): 1-12.
- Romero R, Chaemsathong P, Docheva N, Korzeniewski SJ, Kusanovic JP, Yoon BH et al. Clinical chorioamnionitis at term VI: acute chorioamnionitis and funisitis according to the presence or absence of microorganisms and inflammation in the amniotic cavity. *J Perinat Med.* 2016; 44 (1): 33-51.
- Romero R, Gomez-Lopez N, Winters AD, Jung E, Shaman M, Bieda J et al. Evidence that intra-amniotic infections are often the result of an ascending invasion- a molecular microbiological study. *J Perinat Med.* 2019; 47(9): 915-931.
- Solano ME. Decidual immune cells: Guardians of human pregnancies. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2019; 60: 3-16.
- Staude B, Oehmke F, Lauer T, Behnke J, Gopel W, Schloter M et al. The microbiome and preterm birth: A change in paradigm with profound implications for pathophysiologic concepts and novel therapeutic strategies. *BioMed Res Int.* 2018; (1): 1-12.
- Steel JH, Malatos S, Kennea N, Edwards AD, Miles L, Duggan P et al. Bacteria and inflammatory cells in fetal membranes do not always cause preterm labor. *Pediatr Res.* 2005; 57 (3): 404-411.
- Sweeney EL, Dando SJ, Kallapur SG, Knox CL. The human *Ureaplasma* species as causative agents of chorioamnionitis. *Clin Microbiol Rev.* 2016; 30 (1): 349-379.
- Theis KR, Romero R, Motomura K, Galaz J, Winters AD, Pacora P et al. Microbial burden and inflammasome activation in amniotic fluid of patients with preterm prelabor rupture of membranes. *J Perinat Med.* 2020; 48 (2): 115-131.
- Tong Xing-Long, Wang Ling, Gao Tan-Bing, Qin Yu-Guo, Qi Yu-Qiao, Xu Yan-Ping. Potential function of amniotic fluid in fetal development- Novel insights by comparing the composition of human amniotic fluid with umbilical cord and maternal serum at mid and late gestacion. *J Chin Med Assoc.* 2009; 72 (7): 368-373.
- Underwood MA, Gilbert WM, Sherman MP. Amniotic fluid: Not just fetal urine anymore. *J Perinatol.* 2005; 25 (5): 341-348.

- Walker RW, Clemente JC, Peter I, Loos RJF. The prenatal gut microbiome: Are we colonized with bacteria in utero? *Pediatr Obes.* 2017; 12 (1): 3-17.
- Wang S, Kallichanda N, Song W, Ramirez BA, Ross MG. Expression of aquaporin-8 in human placenta and chorioamniotic membranes: Evidence of molecular mechanism for intramembranous amniotic fluid resorption. *Am J Obstet Gynecol.* 2001; 185 (5): 1226-1231.
- Wassenaar TM, Panigrahi P. Is a foetus developing in a sterile environment?. *Lett Appl Microbiol.* 2014; 59 (6): 572-579.
- Ximenez C, Torres J. Development of microbiota in infants and its role in maturation of gut mucosa and immune system. *Arch Med Res.* 2017; 48 (8): 666-680.
- Zheng Z, Liu H, Beall M, Ma T, Hao R, Ross MG. Role of aquaporin 1 in fetal fluid homeostasis. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2014; 27 (5): 505-510.
- Zhu L, Luo F, Hu W, Han Y, Wang Y, Zheng H et al. Bacterial communities in the womb during healthy pregnancy. *Front Microbiol.* 2018; (9): 2163.