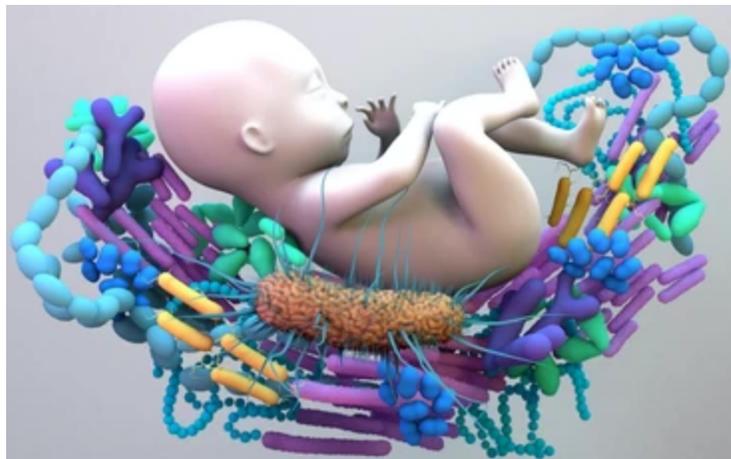




TRABAJO FIN DE GRADO

Doble Grado en Farmacia y Óptica y Optometría

MICROBIOTA DEL LÍQUIDO AMNIÓTICO: ¿UNA CONTAMINACIÓN O UNA REALIDAD?



CURSO 2021-2022

FACULTAD DE FARMACIA

NIEVES LÓPEZ PERSONAT



**UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA**

**TRABAJO FIN DE GRADO
Doble Grado en Farmacia y Óptica y Optometría**

**MICROBIOTA DEL LÍQUIDO AMNIÓTICO:
¿UNA CONTAMINACIÓN O UNA REALIDAD?**

AUTORA: NIEVES LÓPEZ PERSONAT

TUTORA: MARÍA DE LOURDES MORENO AMADOR

TIPOLOGÍA: TRABAJO BIBLIOGRÁFICO

DEPARTAMENTO: MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

ÁREA: MICROBIOLOGÍA

Sevilla, 15 de JUNIO de 2022

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Definición de microbiota y microbioma	2
2.2. Zonas estériles del cuerpo humano	2
2.3. Líquido amniótico	3
2.4. Formación y regulación del líquido amniótico	5
3. OBJETIVOS	6
4. METODOLOGÍA	6
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	6
5.1. Metodología para la extracción del LA y la identificación microbiana	6
5.1.1. Métodos fenotípicos	7
5.1.2. Métodos moleculares	8
5.1.3. Métodos proteómicos	10
5.2. Controversia sobre la esterilidad del líquido amniótico	10
5.2.1. Útero estéril.....	11
5.2.2. Microbioma del líquido amniótico y placenta.....	17
5.2.3. Consecuencias inmunológicas de la microbiota en el líquido amniótico.....	22
6. CONCLUSIONES	24
7. BIBLIOGRAFÍA	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fisiología y dinámica del LA	3
Figura 2. Variación del volumen del LA con la edad gestacional	4
Figura 3. Muestra del LA observada a través de un microscopio electrónico en la que se distingue la ingestión de bacterias por los nucleófilos indicada por flechas rojas	8
Figura 4. Representación gráfica de las etapas de la secuenciación masiva	9
Figura 5. Teorías sobre la adquisición de la microbiota humana.....	10
Figura 6. Representación esquemática de las barreras placentarias anatómicas, fisiológicas e inmunológicas que limitan la invasión microbiana.....	12
Figura 7. Diagrama de Venn con los géneros bacterianos contribuyen al microbioma intestinal del bebé, comunidades de bacterias de la placenta, los géneros bacterianos encontrados en la lista de reactivos y los géneros encontrados en el microbioma del intestino de adultos.....	13
Figura 8. Comparación del número de copias del gen del ARNr 16S entre las muestras del LA, heces e hisopos vaginales.....	14
Figura 9. Mapa de calor de las UTO bacterianas en muestras del LA.....	15
Figura 10. Diagrama de Venn que presenta las especies comunes en los diferentes tipos de muestra	20

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estudios que apoyan la esterilidad del LA	16
Tabla 2. Agrupación de los pares madre-neonato en función de los patrones de intercambio de UTO.....	19
Tabla 3. Estudios que apoyan la existencia del microbioma en el entorno fetal.....	21
Tabla 4. Microbioma de la placenta sana comparada con el microbioma relacionado con la preeclampsia.....	23

1. RESUMEN

El proceso de colonización temprana está emergiendo como un determinante clave en la salud humana. Existe una gran controversia sobre la esterilidad uterina durante la gestación y, por el contrario, sobre la presencia de un microbioma en la cavidad endometrial y en el líquido amniótico (LA) de embarazos a término sin complicaciones. La teoría del útero estéril indica que la presencia de microorganismos en el LA está fundamentada en tres pilares, 1) un fenómeno de contaminación de las pruebas, 2) en la colonización microbiana en el momento del parto o 3) en la dificultad para recoger las muestras y procesarlas en el laboratorio preservando la esterilidad. Sin embargo, los estudios recientes apoyan la presencia de microbiota fetal y refutan la esterilidad mediante estudios que utilizan técnicas dependientes de cultivo y técnicas moleculares, tanto en placenta como en LA y cordón umbilical.

Dadas las importantes implicaciones de la exposición prenatal a los microorganismos en la programación fetal y, en consecuencia, para el desarrollo de enfermedades y la salud humana, en esta revisión se abordan los estudios que cuestionan el microbioma prenatal apostando, por un lado, por un fenómeno de contaminación, y, por el contrario, los hallazgos que han puesto en duda el dogma del útero estéril mediante sistemas tradicionales de cultivo, o mediante enfoques de secuenciación de nueva generación en muestras de placenta, LA, meconio e incluso tejidos fetales. Del mismo modo, se realiza una revisión detallada de las metodologías empleadas para la detección e identificación de microorganismos en muestras humanas.

Palabras clave: líquido amniótico, microbiota, microbioma, útero, meconio.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Definición de microbiota y microbioma

El concepto de microbiota humana comprende los microorganismos que viven o se asocian a tejidos humanos sanos como ocurre en el intestino, el tracto respiratorio superior, la piel, la cavidad nasal y el tracto genital. En relación con esta idea, Derovs et al. (2019) y Fitzgibbon and Mills (2020) exponen que la microbiota es distinta en cada zona del organismo y además cambia a lo largo de la vida.

Aunque las bacterias son los principales componentes de la microbiota, también pueden encontrarse arqueas, virus y microorganismos eucariotas. La comunidad microbiana incluye microorganismos comensalistas y simbióticos que viven tanto en el interior como en la superficie del cuerpo humano, lo que refleja la coevolución del huésped y su microbioma (Fitzgibbon and Mills, 2020).

El microbioma, sin embargo, se define como el conjunto de genes de los microorganismos que se encuentran en un organismo, por lo que hace que cada ser humano sea genéticamente único; por tanto, el microbioma es el componente variable del genoma y su importancia lleva a considerar al ser humano como un holobionte, es decir, un superorganismo formado por células eucariotas humanas y células microbianas (Paglia, 2021).

2.2. Zonas estériles del cuerpo humano

La mayor parte del cuerpo humano están colonizadas por microorganismos y su microbiota está bien descrita y universalmente aceptada (Whittle et al., 2019). Del porcentaje total de células en el ser humano, el 90% están asociadas a la microbiota y tan solo el 10% está libre de microorganismos y es por esto por lo que existe el concepto de que cada órgano tiene su microbiota específica.

Algunos órganos poseen una densidad de población bacteriana bastante baja o incluso estéril como, por ejemplo, el tracto respiratorio inferior o el sistema urinario. No obstante, esta agrupación bacteriana desempeña un papel fundamental. En el caso del tracto respiratorio, el microbioma protege el revestimiento de las vías respiratorias contra las infecciones patógenas transmitidas por el aire. En el sistema urinario, el microbioma es capaz de mantener la homeostasis para evitar que las bacterias de la uretra pasen al riñón, los uréteres o la vejiga que son áreas estériles (Dekaboruah et al., 2020).

La disponibilidad de tecnologías altamente sensibles ha permitido la descripción de la presencia de microorganismos en zonas que antes se consideraban estériles como son el hígado, el páncreas, el cerebro y el tejido adiposo; así como nuevos conocimientos sobre el papel de la microbiota en la fisiología y la patología humana (Derovs et al., 2019; Ghose et al., 2019; Tomaiuolo et al., 2020). Sin embargo, existen zonas del organismo cuya microbiota es controvertida, como es el caso del LA, la sangre o el líquido cefalorraquídeo (Ghose et al., 2019; Whittle et al., 2019; He et al., 2020) que no están ampliamente reconocidos ni aceptados en individuos sanos.

La presencia de microorganismos en la cavidad amniótica, la placenta y el meconio se ha investigado desde hace años como causas de infección o parto prematuro. En la actualidad, existen estudios controvertidos que se centran en la esterilidad de la vida fetal. En la mayoría de ellos se ha descrito que la placenta, el LA, la sangre del cordón umbilical y los tejidos fetales tienen cada uno su propia microbiota específica, -influenciada por la salud y los hábitos maternos- con una influencia decisiva en el resultado del embarazo y la descendencia (Coscia et al., 2021).

2.3. Líquido amniótico

El LA es un fluido transparente ligeramente amarillento que rodea al feto durante el embarazo. El volumen y composición del LA se ve afectado dinámicamente por la secreción pulmonar y la orina del feto, así como por los intercambios de nutrientes y agua entre la madre y el feto a través de las membranas (Liu et al., 2019). La inhalación se produce a través de la nariz y de la boca y, tras esto, el LA es eliminado por la orina, enriqueciéndose así con células que se derivan de la descamación de la superficie externa e interna de los órganos fetales (**Figura 1**) (Kiani et al., 2021).

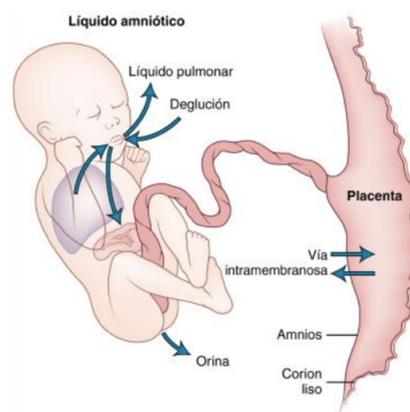


Figura 1. Fisiología y dinámica del LA (Javiera, 2021).

El LA tiene numerosas funciones entre las que destaca 1) la protección del feto en caso de un traumatismo, 2) la defensa frente a los agentes infecciosos por sus propiedades antibacterianas inherentes, 3) el aporte de los factores de crecimiento necesarios para permitir el desarrollo y 4) el crecimiento normal de los órganos del feto (Fitzsimmons y Bajaj, 2019). Por tanto, a nivel clínico, el LA se usa como herramienta para controlar la evolución del embarazo y predecir los resultados fetales (Fitzsimmons and Bajaj, 2019). La membrana amniótica, que es la capa más interna de la membrana fetal, se encarga de envolver el LA junto al embrión/feto, y protegerlo (Šket et al., 2021).

El volumen y la composición del LA cambian con la edad gestacional como se puede observar en la **Figura 2**. Durante el primer trimestre de embarazo, que transcurre entre la semana 1 y la 13, existen niveles muy bajos de proteínas y enzimas. Además, existe un intercambio relativamente libre de agua, nutrientes y moléculas a través de la piel fetal y las membranas corioamnióticas hacia la cavidad amniótica. Es por ello por lo que la composición del LA es similar a la del plasma materno y fetal durante este periodo (Liu et al., 2019; Wu et al., 2021; Bhatti et al., 2022).

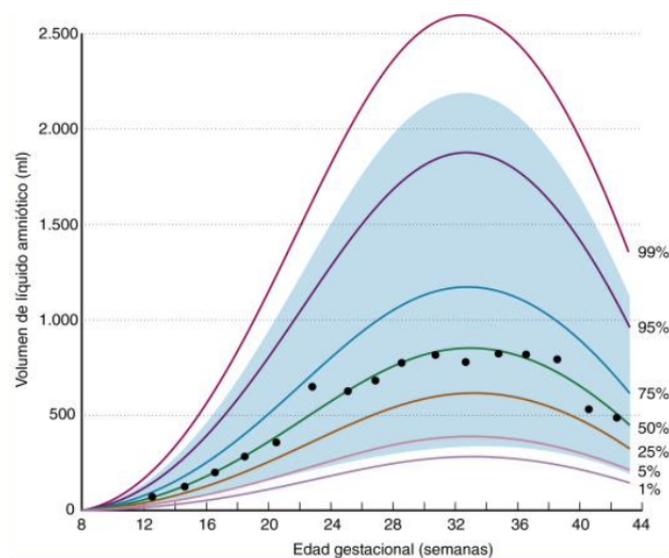


Figura 2. Variación del volumen del LA con la edad gestacional (Javiera, 2021).

El segundo trimestre acontece entre las 14 y las 27 semanas gestacionales. A medida que la piel fetal se queratiniza entre las semanas 22 y 25, las secreciones fetales, especialmente la orina y otros transudados, se convierten en los contribuyentes más significativos del LA (Jindal et al., 2021; Wu et al., 2021; Bhatti et al., 2022).

La etapa final de gestación transcurre desde la semana 28 hasta el final del embarazo. En esta etapa en el LA se encuentran componentes como las proteínas, ácidos nucleicos y metabolitos. Los niveles de proteínas del LA aumentan, acumulando metabolitos fetales debido a la circulación libre de las vías respiratorias y digestivas del feto, proporcionando una ventana única al bienestar fetal (Liu et al., 2019; Wu et al., 2021; Bhatti et al., 2022).

2.4. Formación y regulación del líquido amniótico

El LA se traga, se reabsorbe en la circulación fetal y, finalmente, se transfiere a la circulación materna, como se ha mencionado anteriormente. El flujo de agua a través de la placenta y las membranas fetales aumenta progresivamente a lo largo de la gestación (Luo et al., 2018). Al término, se transfieren hasta 400 mL por día desde la cavidad amniótica a la circulación fetal a través de la placenta (Ding et al., 2022).

Brace et al. (2018) propone que existen hasta ocho vías potenciales a través de las cuales el agua y/o los solutos pueden entrar y/o salir del LA. Tanto la reabsorción por la membrana amniótica, como la transferencia placentaria de agua de la circulación fetal a la materna, están mediadas por canales de agua transmembrana compuestos por proteínas acuaporinas (Luo et al., 2018).

La diferencia de presión osmótica entre el LA y la sangre fetal impulsa el transporte del líquido a la circulación sanguínea fetal. Las necesidades de agua del feto se satisfacen principalmente a partir de la circulación materna, lo que sugiere la necesidad de aumentar el flujo de agua de la placenta a medida que avanza la gestación. Las acuaporinas pueden participar en la homeostasis de intercambio de fluidos entre la madre y el feto. Las alteraciones en el volumen del LA se asocian con los conceptos de polihidramnios o el de oligohidramnios, claramente relacionados con patologías graves que pueden provocar anomalías fetales o mortalidad perinatal (Ding et al., 2022).

3. OBJETIVOS

El objetivo general de este Trabajo Fin de Grado es la revisión de los estudios que cuestionan el microbioma prenatal apostando por un fenómeno de contaminación, y, por el contrario, los hallazgos que han puesto en duda el dogma del útero estéril mediante sistemas tradicionales de cultivo o mediante enfoques de secuenciación de nueva generación en muestras de placenta, LA, meconio e incluso tejidos fetales. Esto se ha llevado a cabo mediante una serie de objetivos específicos:

- Descripción detallada de la formación y composición del LA
- Revisión de las metodologías empleadas para la detección e identificación de microorganismos en el LA
- Revisión de los estudios que apoyan la esterilidad del LA
- Recopilación de los estudios que indican microbiota del LA
- Relación entre los microorganismos del LA y las alteraciones inmunológicas del feto.

4. METODOLOGÍA

Para la elaboración de este Trabajo Fin de Grado se han realizado distintas búsquedas en diversos artículos de revista obtenidos a través de consultas en Pubmed, Dialnet, Scopus, Scielo y Web of Science.

Las palabras para la búsqueda han sido: “*microbiota*”, “*microbiome*”, “*amniotic fluid*”, “*sterile sites human body*”, “*amniotic fluid and culture of microorganisms*”, “*sterile amniotic fluid*”, “*sterile uterus*” y “*microbiota amniotic fluid*”.

Los criterios de selección o filtros utilizados fueron: *free full text* y *5 years*. Las búsquedas se han realizado en inglés y español.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Metodología para la extracción del LA y la identificación microbiana

Para proceder al análisis del LA se requiere en primer lugar la extracción de este, que se realiza en recipientes estériles mediante diferentes procedimientos en función del periodo del embarazo en el que se encuentre. Entre las 15 y 20 semanas de gestación se realizará mediante una amniocentesis, extrayendo el LA de la cavidad uterina con una aguja por vía transabdominal (Jindal et al., 2021; Bhatti et al., 2022). En el caso de las muestras del LA de partos a término, tras la rotura de membranas en el momento del

alumbramiento, se recogen las muestras mediante la ruptura de la bolsa con lancetas. En el caso de las cesáreas, se suele realizar mediante incisiones y extracción con sondas.

5.1.1. Métodos fenotípicos

Los métodos fenotípicos se basan en las características observables de las bacterias como son las propiedades metabólicas y bioquímicas, su morfología y su desarrollo. La elección correcta del medio de crecimiento y las condiciones, son cruciales durante el proceso de cultivo (Bou et al., 2011). Para garantizar el crecimiento y aislamiento de bacterias aerobias y anaerobias en el LA, los medios de cultivo requieren de fuente de energía, carbono, nitrógeno, algunas sales, oligoelementos y agua. En algunas ocasiones, también será necesario adicionar otras sustancias como vitaminas o aminoácidos esenciales (Fernández et al., 2010). Se recomienda el uso del medio *Gifu Anaerobic Broth* (Gotoh et al., 2017) para el cultivo de anaerobios y el agar *Brain Heart Infusion* (BHI) para aerobios. No obstante, se pueden usar el agar chocolate, el agar triptona-soja con un 5% de sangre de oveja o el agar MacConkey. Posteriormente, las placas aeróbicas se incuban a 35-37°C en una cámara con un 8% de CO₂ y las placas anaeróbicas a la misma temperatura, pero con un 5% de CO₂, un 10% de hidrógeno y un 85% de nitrógeno durante al menos 4 días. En el caso de sospecha de micoplasmas se puede utilizar el kit de prueba Mycofast® (Romero et al., 2019).

Aunque la realización y el coste de las técnicas fenotípicas son bastante asequibles, no son métodos aplicables para la identificación de bacterias directamente de las muestras (del Río et al., 2019).

Otra forma de detectar y analizar las bacterias es mediante microscopía. Concretamente para estudiar las bacterias del LA mediante esta técnica, se necesita un procesamiento, por lo que han de pasarse por un filtro estéril de 15 µm y centrifugarse a 2300 g durante 5 minutos a temperatura ambiente, desechando el sobrenadante. El fijador para la microscopía electrónica se debe añadir cuidadosamente al sedimento celular (2,5% de glutaraldehído en tampón fosfato 0,1 mol/L, pH 7,4) y tras la fijación durante 2 horas a 4°C, el pellet celular se debe lavar suavemente con tampón de lavado para microscopía electrónica 1X (tampón fosfato de Sorensen 0,2 mol/L, pH 7,4) (Gómez-López et al., 2017). En la **Figura 3** se observa al microscopio, una muestra *in vivo* del LA con neutrófilos en mujeres con infección intraamniótica. Asimismo, Galaz y colaboradores (2020), realizaron un procedimiento similar al anterior y han conseguido evaluar la composición celular del LA mediante microscopía de fluorescencia, microscopía

electrónica de barrido y de transmisión, y citometría de flujo, consiguiendo conocer los neutrófilos asociados a bacterias viables y no viables, los neutrófilos que realizaban fagocitosis, los monocitos/macrófagos y células TCD4+.

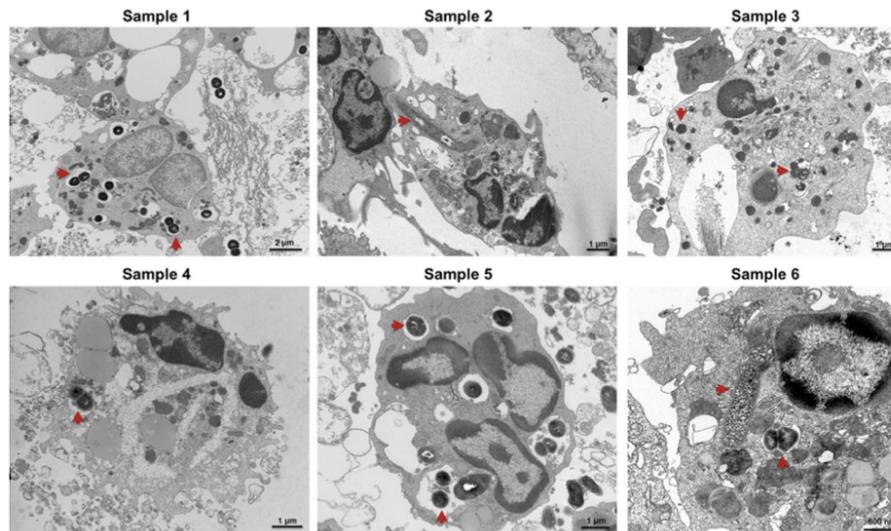


Figura 3. Muestra del LA observada a través de un microscopio electrónico en la que se distingue la ingestión de bacterias por los nucleófilos indicada por flechas rojas (Gómez-López et al., 2017).

5.1.2. Métodos moleculares

Las técnicas moleculares se caracterizan por ser pruebas rápidas, sensibles y por permitir analizar diversas muestras a la vez, aunque es cierto que son costosas y necesitan personal especializado para su realización (Papatheodorou et al., 2021). Los beneficios que son capaces de aportar estas pruebas han generado que se conviertan en los métodos de referencia.

En los métodos moleculares se han usado una gran diversidad de genes como dianas moleculares. El análisis del ácido ribonucleico ribosómico (ARNr) 16S es el marcador inicial y único presente en casi todas las bacterias para realizar una identificación más precisa, aunque es cierto que en determinadas ocasiones en las que existe una alta homología genética o un cambio en la asignación taxonómica, no puede realizarse este análisis. En estos casos, se puede recurrir a otras dianas para realizar la asignación de especies, como pueden ser la subunidad β de la ARN polimerasa, la subunidad β de la ADN girasa, la superóxido dismutasa y el gen del ARNr 23S o incluso el 5S (Bou et al., 2011; del Río et al., 2019). En el caso de análisis del LA, es interesante

la amplificación de la región V4 del gen ARNr 16S con los cebadores 515F/806R para caracterizar y comparar las comunidades bacterianas (Romero et al., 2019).

Para llevar a cabo esta metodología, se realiza el cultivo y la extracción del ADN una vez aislados los microorganismos. Sin embargo, conlleva mucho tiempo y a menudo su resultado es negativo ya que muchas especies microbianas no son cultivables (Marchocki et al., 2018).

La secuenciación masiva es una técnica que permite determinar la microbiota, el microbioma y el metagenoma de una muestra clínica mediante genómica comparada. Esta técnica ha ayudado a la evolución de la microbiología puesto que ha conseguido disminuir los costes y el tiempo de análisis. Existen 4 etapas principales: 1) la extracción del ADN de la muestra o aislado, 2) la preparación de las bibliotecas o librerías, 3) la secuenciación propiamente dicha y 4) el análisis bioinformático e interpretación de los resultados (**Figura 4**). La secuenciación masiva se puede realizar secuenciando pequeños fragmentos del ADN o amplicones previamente amplificados (*targeted sequencing*), o bien secuenciando todo el ADN previamente fragmentado de forma aleatoria (*shotgun sequencing*) (Hernández et al., 2020).

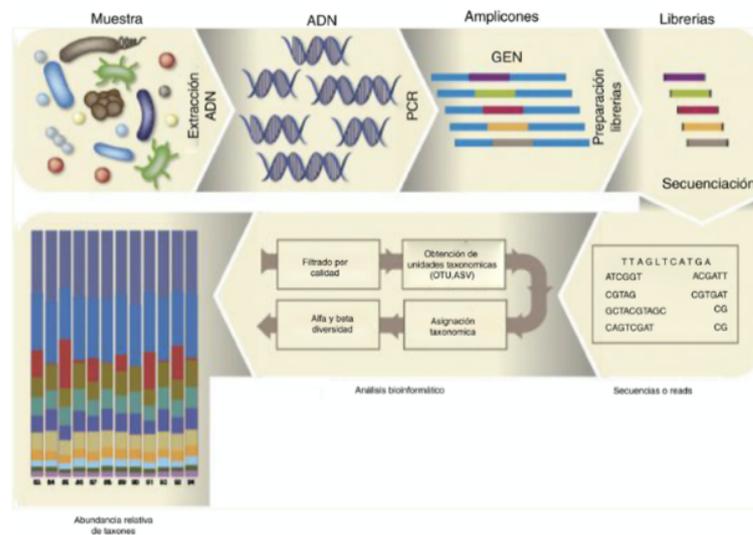


Figura 4. Representación gráfica de las etapas de la secuenciación masiva (Hernández et al., 2020).

5.1.3. Métodos proteómicos

Los métodos proteómicos se basan en el estudio y la caracterización del agregado de proteínas expresadas por un genoma (proteoma) haciendo uso de técnicas como la espectrometría de masas (EM) y la electroforesis (Bou et al., 2011; Hokstad, 2021).

Un estudio llevado a cabo por Fédou y colaboradores (2020) sometieron muestras del LA y de orina fetal para analizar la abundancia de péptidos endógenos con la electroforesis capilar acoplada a EM. Recientemente, autores como Jung y colaboradores (2021) han utilizado estas técnicas de EM por ionización de electrospray para el estudio del LA, consiguiendo detectar los ácidos nucleicos de bacterias, virus y hongos.

5.2. Controversia sobre la esterilidad del líquido amniótico

La existencia de microbiota en el LA de los mamíferos es debatida y requiere una demostración de la exposición del feto a los microorganismos y su colonización en el útero. También requiere de la identificación del papel de los microorganismos intraamnióticos en el desarrollo inmunitario del feto y en el desarrollo del embarazo (Winters et al., 2022).

A lo largo de la historia, se han ido desarrollando distintas teorías por las que se adquiere la microbiota humana durante el desarrollo fetal y en los primeros instantes de vida, tal y como se puede observar en la **Figura 5**.

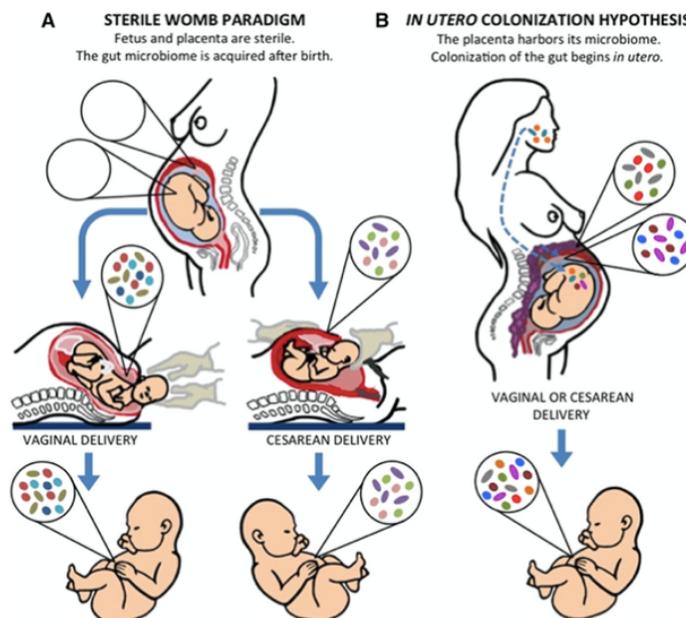


Figura 5. Teorías sobre la adquisición de la microbiota humana (Perez-Muñoz et al., 2017).

En la segunda mitad del siglo pasado, se llegó al consenso de que el feto se mantenía en un estado estéril en un embarazo sano. Por otro lado, la hipótesis de la colonización en el útero plantea que algunos microorganismos que están presentes en el microbioma intestinal de los bebés se adquieren antes del nacimiento, probablemente a través del contacto con el microbioma de la placenta, que como se ha indicado se origina en el microbioma intestinal u oral de la madre. En el estudio llevado a cabo por Pérez-Muñoz y colaboradores (2017) la microbiota de los bebés nacidos por vía vaginal resultó parecida a la microbiota de la vagina de la madre, mientras que la microbiota de los bebés nacidos por cesárea fue análoga a la de la piel de la madre.

5.2.1. Útero estéril

Desde la segunda mitad del siglo XX, la cavidad intraamniótica se ha considerado estéril. Ya en 1885 Theodor Escherich consiguió describir que el meconio estaba libre de bacterias viables, sugiriendo que el feto humano se desarrolla en un entorno estéril.

Se han descrito tres tipos de barreras anatómicas en la placenta que impiden el acceso de los invasores bacterianos a la circulación fetal: el sincitiotrofoblasto, los citotrofoblastos y los trofoblastos extravelosos. Además, la membrana basal también sirve de barrera física que evita la invasión bacteriana (**Figura 6**). Cerca de los trofoblastos extravelosos se encuentran las células inmunitarias maternas y las inmunoglobulinas para ayudar a la defensa contra las agresiones microbianas puesto que proporcionan mecanismos de defensa innatos y poseen propiedades bactericidas. Existen algunas bacterias patógenas como pueden ser *Listeria monocytogenes* o *Brucella abortus* que tienen los factores necesarios para invadir con éxito estas barreras, alterar la respuesta inmunitaria y establecerse en la placenta como organismos viables (Perez-Muñoz et al., 2017).

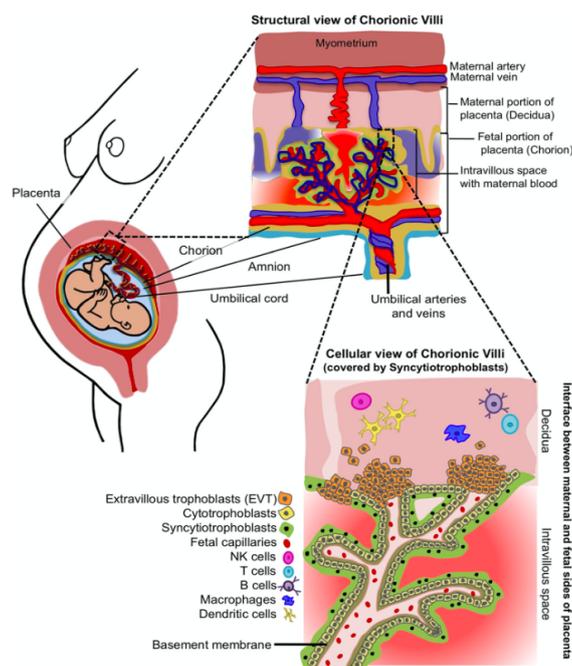


Figura 6. Representación esquemática de las barreras placentarias anatómicas, fisiológicas e inmunológicas que limitan la invasión microbiana (Perez-Muñoz et al., 2017).

Autores como Liu y colaboradores (2020) apoyan la esterilidad del útero y remarcan la importancia de tener en cuenta la inevitable ocurrencia de contaminación ambiental, la contaminación de los reactivos durante todo el proceso experimental o durante el momento del parto. Por otro lado, otras investigaciones refieren que las muestras para el estudio del entorno intrauterino se recogen en un entorno clínico (sala de urgencias, de partos o quirófano) lo que hace difícil evitar la contaminación (Pérez-Muñoz et al., 2017). Estos estudios indican por ello, la necesidad de tener en cuenta el tiempo transcurrido después del parto para investigar la presencia de bacterias en estas muestras, puesto que, por ejemplo, el meconio temprano no contiene bacterias detectables, mientras que las muestras más tardías sí.

Sterpu y colaboradores (2021) compararon las muestras recogidas de mujeres que no estaban de parto con las tomadas de mujeres que tuvieron partos vaginales y por cesárea a término, para investigar la existencia y el origen de los microorganismos en la placenta. Sólo se detectaron bacterias esporádicas que no representaron un microbioma propio y fueron más abundantes en las muestras de tejido placentario procedentes de partos vaginales que en los experimentos de cultivo procedentes de partos por cesárea. El análisis basado en la secuencia de muestras con bajos niveles de ADN no es fiable porque los reactivos y los componentes de los kits pueden contener ADN bacteriano. De hecho, se ha podido obtener una lista de taxones bacterianos presentes en reactivos que se

detectan en los controles negativos (**Figura 7**) en la que se incluyen taxones descritos tanto en bebés nacidos por vía vaginal como por cesárea y muestran un solapamiento con los géneros encontrados en el microbioma del intestino de los adultos, en la placenta o como contaminantes (Perez-Muñoz et al., 2017). Además, Theis y colaboradores (2019) describieron que la contaminación de los reactivos también puede afectar a los resultados de los estudios de las muestras de baja biomasa microbiana que utilizan el amplicón del gen del ARNr 16S o la secuenciación por metagenómica. Estos resultados han sido corroborados por otros estudios más recientes basados en la metagenómica, que a pesar de la contaminación de ácidos nucleicos microbianos -introducida por la manipulación de las muestras, tampones y reactivos- no consiguieron encontrar ácido nucleico de microorganismos detectable de forma fiable en sus muestras, siendo un resultado coherente con la hipótesis del útero estéril (Wang et al., 2022).

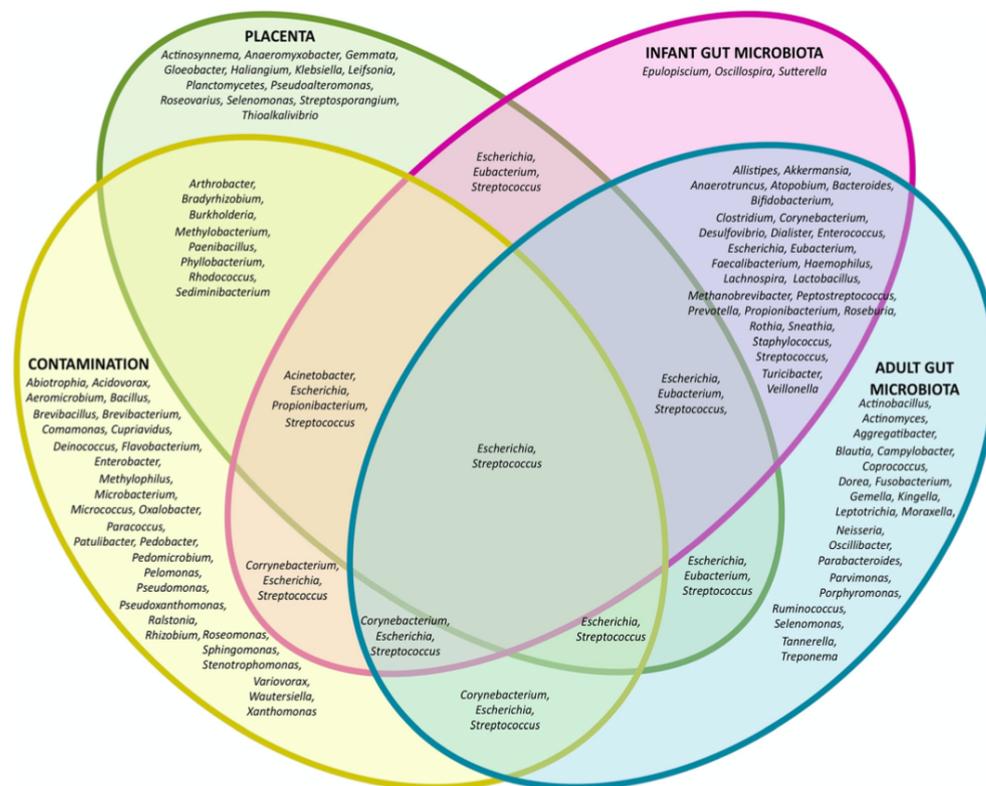


Figura 7. Diagrama de Venn con los géneros bacterianos que contribuyen al microbioma intestinal del bebé, comunidades de bacterias de la placenta, los géneros bacterianos encontrados en la lista de reactivos y los géneros encontrados en el microbioma del intestino de adultos (Perez-Muñoz et al., 2017).

Otro estudio llevado a cabo por Liu y colaboradores (2020), evaluó el número de copias del gen del ARNr 16S en las muestras del LA, comparándolos con las de heces y muestras vaginales. Para ello utilizaron controles tanto en el procedimiento de extracción como mediante el uso de blanco muestra control (**Figura 8**). Aunque las muestras del LA contenían un mayor número de copias del gen 16S que las muestras de control de extracción y de blanco, concluyeron que no se observaron diferencias significativas entre las muestras del LA y de control, por lo que fueron consideradas como posible contaminación. De igual forma, Rehbinder y colaboradores (2018) utilizaron la secuenciación por amplicón del gen ARNr 16S encontrando géneros asociados a la contaminación regular y de laboratorio.

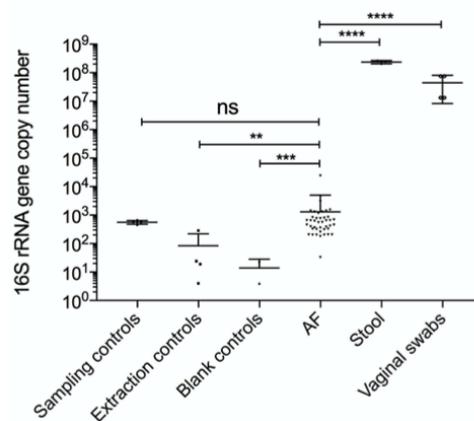


Figura 8. Comparación del número de copias del gen del ARNr 16S entre las muestras del LA, heces e hisopos vaginales (Liu et al., 2020).

Para identificar las posibles unidades taxonómicas operativas (UTO) que son exclusivas de las muestras del LA, es necesario realizar un análisis secundario, eliminando las señales de fondo en las muestras de control negativo. El estudio de Liu y colaboradores (2020) contempló que entre las 22 UTO bacterianas encontradas, 14 de ellas se encontraban en las muestras del LA, y 10 de ellas (*Adhaeribacter*, *Roseburia*, *Delftia*, *Sutterella*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium*, *Pseudonocardia*, *Dialister*, *Bdellovibrio* e *Iamia*) se encontraron tan solo en una de las muestras estudiadas, lo que sugiere que serían contaminantes. Además, los géneros *Pseudonocardia*, *Dialister*, *Bdellovibrio* e *Iamia* suelen encontrarse en el suelo lo cual es significativo de contaminación. En cambio, *Bacteroides*, *Propionibacterium*, *Faecalibacterium* y *Ruminococcus* se encontraron en más de 2 de las muestras del LA, lo que se consideró ecológicamente estimable, ya que el origen podría ser la vagina, el intestino o la piel

humana. Las 4 UTO bacterianas se identificaron en 9 muestras del LA, de las cuales 8 procedían de la concepción por fecundación *in vitro* y una de ellas de la concepción espontánea tal y como se puede observar en la **Figura 9** (Liu et al., 2020).

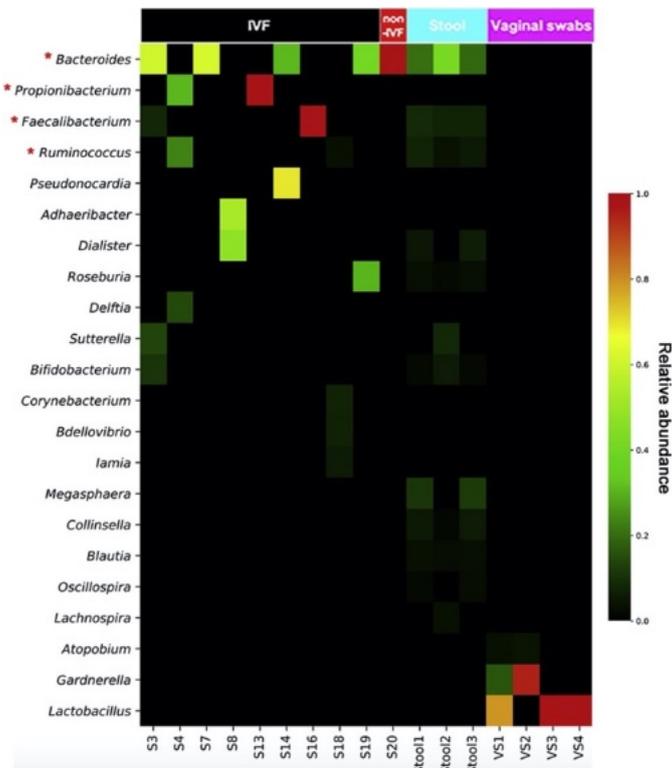


Figura 9. Mapa de calor de las UTO bacterianas en muestras del LA (Liu et al., 2020).

La mayoría de los autores no identificaron una población de microorganismos en el LA de embarazos a término sanos diferentes en concentración o contenido de las secuencias amplificadas de los controles negativos. Por tanto, los hallazgos representan la contaminación de la muestra durante el procedimiento de recolección o el procesamiento de laboratorio en lugar de una colonización o infección temprana.

Por otro lado, estudios realizados por Liu y colaboradores (2020) y Pérez-Muñoz y colaboradores (2017) no consiguieron identificar la presencia de microorganismos en el LA por múltiples metodologías, como por ejemplo mediante cultivos, la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (PCRq) o la secuenciación del gen ARNr 16S. Exponen que el LA es estéril, aunque contenga ADN bacteriano ya que es necesario demostrar la viabilidad microbiana. Es por eso por lo que plantean como posibilidad que en la placenta sólo haya productos bacterianos, incluido el ADN, y no bacterias vivas, ya que en el LA existen péptidos antimicrobianos. Además, cuestionan la hipótesis de la

colonización en el útero puesto que esta se basa en estudios que utilizaron enfoques moleculares con un límite de detección insuficiente para estudiar las poblaciones microbianas de baja biomasa. Además, estas técnicas carecen de controles apropiados para la contaminación y aportan pruebas de la viabilidad bacteriana.

Theis y colaboradores (2019) a través de múltiples técnicas, no encontraron pruebas consistentes y reproducibles de la existencia de una microbiota placentaria a término. Este estudio refuerza los argumentos a favor de la necesidad de incorporar muestras de control técnico en los estudios de muy baja biomasa microbiana, para lo que habrá que optimizar las técnicas de cultivo y los enfoques de estudio molecular. A su vez, Stinson y colaboradores (2019) indicaron que la exposición fetal a bacterias no viables o subproductos puede influir en el desarrollo inmunológico del feto (Stinson y col., 2019b).

La **Tabla 1** recopila los estudios recientes apoyando que el feto sano se desarrolla en un útero libre de microbiota y en los que se han utilizado diferentes metodologías.

Tabla 1. Estudios que apoyan la esterilidad del LA.

Autores	Hallazgos
Perez-Muñoz et al., 2017	Argumentaron que las pruebas que apoyan la hipótesis de la colonización en el útero son muy débiles ya que: <ul style="list-style-type: none"> - Se basan en enfoques moleculares inadecuados para estudiar poblaciones microbianas de baja biomasa. - Carecen de controles para la contaminación - No proporcionan pruebas de viabilidad bacteriana - La posibilidad de obtener animales axénicos por cesáreas apoya la esterilidad del entorno fetal en los mamíferos.
Lim et al., 2018	Describieron que no existen cambios entre la microbiota bacteriana del LA con respecto a los controles tras el análisis del LA de 24 embarazos a término sin complicaciones y usando métodos de secuenciación de nueva generación.
Malmuthuge y Griebel, 2018	Demostraron la ausencia de bacterias en el entorno fetal durante el tercer trimestre del embarazo utilizando la secuenciación del amplicón 16S.
Rehbinder et al., 2018	Observaron que ninguna de las muestras de membranas intactas tenían crecimiento bacteriano y que la colonización comienza tras las contracciones uterinas y la rotura de la membrana amniótica.
Zhu et al., 2018	Analizaron muestras de tejido decidual y del LA y confirman la presencia de microorganismos cultivables en la placenta, pero no en el LA.
De Goffau et al., 2019	Indicaron que no existe evidencia de la presencia de bacterias en la gran mayoría de las muestras de placenta de embarazos (complicados y no complicados) y que la adquisición de bacterias sucede durante el parto o por contaminación.

Theis et al., 2019	Consideraron el tejido placentario y no pudieron encontrar diferencias en la abundancia y/o presencia de una microbiota entre este y los controles técnicos de fondo.
Kuperman et al., 2020	Cultivaron muestras de placenta sin observar crecimiento bacteriano y mediante la inmunohistoquímica mostraron recuentos bacterianos insignificantes, por lo que apoyan que el útero es estéril y en el caso de existir, la microbiota sería de una biomasa extremadamente baja.
Liu et al., 2020	No identificaron microorganismos mediante diferentes metodologías en el LA de embarazos en el tercer trimestre.
Jung et al., 2021	Determinaron que el aislamiento de microorganismos en muestras del LA en ausencia de inflamación intraamniótica, es indicativo de contaminación de la muestra durante el procedimiento de recogida o durante el procesamiento en el laboratorio, más que una colonización o infección temprana.
Sterpu et al., 2021	Analizaron el microbioma placentario en 76 embarazos a término y encuentran especies bacterianas que podrían deberse a la contaminación o a la presencia de bacterias de bajo grado en algunas localizaciones pero, que no representan un microbioma placentario por sí mismo.
Wang et al., 2022	Demonstraron mediante la metagenómica, que el LA humano no tiene ni viroma ni microbioma, apoyando la hipótesis del útero estéril.

5.2.2. Microbioma del líquido amniótico y placenta

Hasta la segunda mitad del siglo XX se creía que la cavidad uterina era estéril y la colonización bacteriana se consideraba un hallazgo patológico, se utilizaban técnicas tradicionales basadas en cultivos y microscopía para evaluar el microbioma. Una de las mayores críticas dirigidas a la consideración del microbioma intrauterino era la posible contaminación durante la recogida de las muestras uterinas por la microbiota cervicovaginal. En un estudio muy reciente, las muestras fueron tomadas con un método particular basado en el uso combinado de dos catéteres específicos y una desinfección tisular precisa; por tanto, se corrobora que el proceso podría considerarse aséptico. La existencia de una microbiota intrauterina, caracterizada por una notable estabilidad entre la fase folicular y la lútea ha sido demostrado recientemente (Coscia et al., 2021; Toson et al., 2022).

Hay distintas hipótesis sobre la colonización uterina, ya que pueden llegar desde el intestino, la cavidad oral, el torrente sanguíneo, la ascensión por vía vaginal, así como por la unión de microorganismos en los espermatozoides humanos, o bien, podría ocurrir potencialmente a través de procedimientos de tecnología de reproducción asistida o por la colocación de dispositivos anticonceptivos. Independientemente de su origen, la

investigación demuestra consistentemente que el microbioma uterino es muy diverso y está escasamente poblado en comparación con el tracto genital, pero su composición aún no se ha descifrado por completo (Toson et al., 2022).

Se ha conseguido establecer que el LA y la placenta alberguen un microbioma propio y único y, por tanto, de lugar a un cambio en la hipótesis de la colonización del útero. Esto repercute en nuestra comprensión del establecimiento de un microbioma humano pionero, su papel en la salud humana, estilo de vida, así como en las prácticas clínicas como las cesáreas, que actualmente se cree que interrumpen la transmisión de los microorganismos (Blaser and Dominguez-Bello, 2016; Beckers and Sones, 2019; He et al., 2020).

Se han realizado estudios teniendo en cuenta las características anatómicas, inmunológicas y fisiológicas de la placenta y del feto, las limitaciones de los métodos de investigación utilizados previamente y el microbioma durante los primeros días de vida. La llegada de las nuevas técnicas de secuenciación han permitido que muchos estudios describieran diferentes comunidades microbianas dentro de la cavidad uterina, aunque no está claro dónde se originan (Toson et al., 2022).

William y colaboradores (2021) estudiaron mediante las secuencias del gen ARNr 16S la placenta de gemelos y entre ambos gemelos, para ver si tenían un microbioma similar al microbioma placentario. Confirmaron que los géneros microbianos y su abundancia dentro de la placenta de un gemelo era distinta, y a su vez, diferente entre las muestras del microbioma de la placenta de ambos gemelos entre sí.

También se ha estudiado la microbiota del meconio y se ha observado que contiene bacterias similares a las que se encuentran en el LA, por lo que se ha propuesto que la colonización del intestino fetal podría producirse a través de la ingestión del LA que contiene bacterias (Collado et al., 2016). Otro estudio investigó específicamente la transferencia microbiana prenatal y neonatal en una serie de muestras maternas usando la secuenciación del gen ARNr 16S, técnicas de cultivo y PCRq. Detectaron poblaciones microbianas en el LA que eran bajas en abundancia, riqueza y diversidad, y que compartían similitudes con las poblaciones microbianas encontradas en la placenta. *Enterobacter*, *Escherichia*, *Shigella* y *Propionibacterium* fueron los géneros más prevalentes presentes tanto en la placenta como en el LA. También se observaron similitudes entre las poblaciones microbianas encontradas en el calostro y el meconio, es decir, los autores plantearon la hipótesis de que los microorganismos intestinales

maternos pueden transportarse selectivamente a la glándula mamaria, a la placenta y al LA, contribuyendo así a una colonización inicial del intestino fetal en el útero.

He y colaboradores (2020), utilizando el software SourceTracker, realizaron un análisis de las comunidades microbianas de la madre y del feto. El análisis reveló que el $8,03 \pm 2,73\%$ de las UTO del meconio coincidían con las muestras maternas (**Tabla 2**). Los 39 pares de muestras madre-neonato pudieron clasificarse en 10 grupos en función de sus patrones de coincidencia de UTO. Las muestras de meconio y del LA compartieron el mayor nivel de UTO comunes ($4,12 \pm 1,57$).

Tabla 2. Agrupación de los pares madre-neonato en función de los patrones de intercambio de UTO (He et al., 2020).

Group	Proportion of matching OTUs (%)				Number of meconium samples in the group	Types of maternal samples that shared OTUs with the meconium sample
	AF	MV	MF	MS		
1	5.50	1.69	2.17	0.00	19	AF, MF, MV
2	0.00	0.00	0.00	0.00	7	None
3	0.64	0.26	0.00	0.00	4	AF, MV
4	20.03	1.45	0.00	1.06	2	AF, MS, MV
5	6.41	21.08	14.50	0.48	2	AF, MF, MS, MV
6	0.15	0.00	0.00	0.00	1	AF
7	0.00	0.00	0.00	0.31	1	MS
8	0.13	0.00	0.20	0.00	1	AF, MF
9	0.20	0.00	0.00	0.31	1	AF, MS
10	0.11	0.00	0.14	0.10	1	AF, MF, MS
Mean±SEM	4.12 ± 1.57 ^a	2.01 ± 1.14 ^{ab}	1.81 ± 1.04 ^b	0.10 ± 0.05 ^c	-	-

Different superscript letters indicate significant differences between groups ($P < 0.01$ in all cases; Kruskal-Wallis test). Amniotic fluid, AF; maternal feces, MF; vaginal fluid, MV; maternal saliva, MS.

En todos los grupos de muestras analizadas se identificaron UTO específicas, detectadas exclusivamente en un tipo de muestra, lo que apoya la existencia de un subconjunto de microbiota específico en el LA. Los pares de muestras de LA-heces maternas, LA-líquido vaginal y LA-meconio compartieron 11, 3 y 2 especies comunes, respectivamente, como se indica en la **Figura 10**. Las muestras de saliva materna tenían el mayor número de tipos de UTO específicas de la muestra (147 tipos; 146 especies identificadas), seguidas de las muestras del LA, meconio, heces maternas y líquido vaginal.

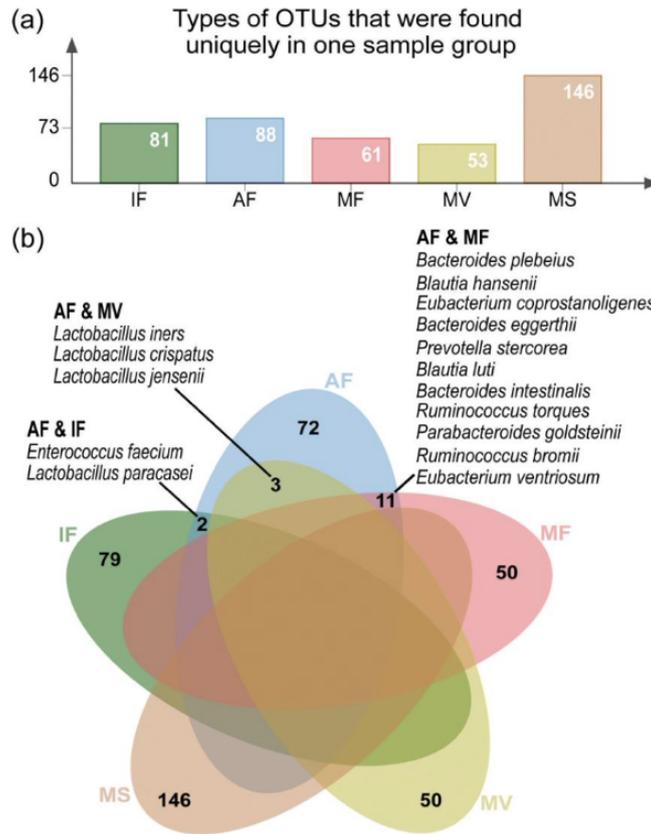


Figura 10. Diagrama de Venn que presenta las especies comunes en los diferentes tipos de muestra. IF: meconio; AF: líquido amniótico; MF: heces maternas; MS: saliva materna; MV: flujo vaginal (He et al., 2020).

Aunque estudios anteriores confirmaron que no existe una contaminación microbiana vaginal secundaria evidente, varios estudios han informado de diferencias significativas en la diversidad y la composición entre los bebés nacidos por vía vaginal y los nacidos por cesárea (Bäckhed et al., 2015).

La colonización bacteriana humana comienza durante la vida fetal, en oposición al paradigma anterior del “útero estéril” (Coscia et al., 2021). Por lo tanto, el proceso de colonización temprana por un microbioma “sano” está emergiendo como un determinante clave de la salud de por vida. Se ha demostrado que las comunidades microbianas residentes en el intestino humano y otros órganos modulan las respuestas inmunitarias tanto innatas como adquiridas (Peroni et al., 2020).

Por último, existe un estudio llevado a cabo por Toson y colaboradores (2022) que revisa la microbiota uterina, cómo se correlaciona con la concepción humana -indicando el valor de una microbiota endometrial saludable- y cómo los cambios en su composición podrían afectar a la fertilidad de la madre. El conocimiento de esta microbiota permitiría establecer un tratamiento personalizado, a través del manejo del microbioma durante las

terapias de reproducción asistida, lo que en última instancia conduciría a la mejora de los resultados clínicos. Otros estudios recientes como los de Bolte et al. (2022), establecen que las exposiciones ambientales durante el embarazo y la lactancia pueden causar modificaciones en nuestro metagenoma y/o microbioma, aumentando el riesgo de enfermedades en la infancia y la edad adulta. En la **Tabla 3**, se resumen los estudios recientes que utilizan diferentes metodologías para apoyar la existencia del microbioma en el útero.

Tabla 3. Estudios que apoyan la existencia del microbioma en el entorno fetal.

Autores	Hallazgos
Gschwind et al., 2018	Declararon que: <ul style="list-style-type: none"> - Existe una microbiota placentaria con baja biomasa - El origen de las patologías del embarazo podrían ser la consecuencia del desequilibrio de dicha microbiota.
Schoenmakers et al., 2019	Destacaron la relación entre el microbioma masculino y femenino con la formación y la composición de un microbioma placentario y fetal.
Stinson et al., 2019a	Relacionaron la microbiota del meconio del recién nacido y del LA de gestantes mediante la secuenciación del gen ARNr 16S y destacan que el ADN bacteriano y los ácidos grasos de cadena corta están presentes en el útero y tienen el potencial de influir en el sistema inmunitario del feto en desarrollo.
Al et al., 2020	Confirmaron la presencia de una firma de ADN del microbioma fetal humano en el primer trimestre de embarazo.
He et al., 2020	Investigaron la microbiota de diferentes lugares del cuerpo humano y detectaron microbiota en el meconio y en el LA, siendo el LA el que más contribuyó al meconio.
Coscia et al., 2021	Establecieron que los factores prenatales y perinatales actualmente identificados influyen en la microbiota neonatal, antes de la concepción, durante el embarazo y antes y después del parto.
Hornová et al., 2021	Concluyeron tras realizar una revisión bibliográfica que la etiología del parto prematuro es multifactorial, que la cavidad uterina ya no está exenta de colonización y que la formación de la microbioma fetal comienza al principio del embarazo.
Williams et al., 2021	Describieron que el microbioma intestinal del feto es diferente del microbioma de la placenta, de la piel, la vagina y las heces de la madre. Han logrado identificar claramente un microbioma placentario distinto.
Toson et al., 2022	Explicaron que una microbiota endometrial fisiológica y saludable se considera un grupo de microorganismos permisivo para la implantación del embrión y el nacimiento vivo.

5.2.3. Consecuencias inmunológicas de la microbiota en el líquido amniótico

En la placenta hay numerosos agentes, células y moléculas inmunitarias que garantizan la protección contra los invasores bacterianos, como pueden ser los receptores tipo Toll, los péptidos antimicrobianos y las inmunoglobulinas. Sin embargo, en la actualidad, no existen conclusiones evidentes de cómo un feto inmunológicamente inmaduro podría controlar con éxito las bacterias viables para prevenir las infecciones (Pérez-Muñoz et al., 2017).

Los microorganismos pueden llegar al feto por ascenso desde la vagina o el cuello uterino, sembrarse por vía hematológica desde fuentes no genitales, o bien, por una disbiosis del tracto genital (Bagga and Arora, 2020; Liu et al., 2020). Estas alteraciones pueden dar lugar a resultados adversos en la gestación poniendo en riesgo la vida de la madre y del feto:

- **Parto prematuro:** estudios recientes que siguen una línea de investigación similar, han utilizado técnicas como la secuenciación del gen ARNr 16S para comparar el microbioma vaginal de las mujeres con parto prematuro, con las que dan a luz a término. Concluyen que existen microbiomas específicos en mujeres con parto prematuro (Bagga and Arora, 2020).
- **Corioamnionitis:** trastorno específico del embarazo que se puede definir como la inflamación e infección de las estructuras intrauterinas, amnios y corion. Generalmente suele estar causada por bacterias, hongos y virus patógenos que podrían infectar al feto a través de una transmisión transplacentaria (Šket et al., 2021).
- **Infección intraamniótica:** es uno de los trastornos más destacables. Se trata de una condición clínica que se caracteriza por un proceso inflamatorio local y, a veces, sistémico, causado por la invasión microbiana de la cavidad amniótica. Afortunadamente, los neutrófilos del LA pueden fagocitar a la mayoría de las bacterias que se encuentran en el útero de las mujeres con infección intraamniótica, por lo que proporcionan un mecanismo de defensa del huésped (Gomez-Lopez et al., 2017)

- **Preeclampsia:** hipertensión de nueva aparición durante la segunda mitad del embarazo. Esta patología podría ser la consecuencia de una infección patógena o de una disbiosis de la microbiota del LA y de la placenta, como la que presentaban las madres del estudio de Beckers y Sones (2019). En estas muestras se detectaron una serie de bacterias distintas a las presentes en un microbioma sano (**Tabla 4**) que podrían ser las causantes de esta patología.

Tabla 4. Microbioma de la placenta sana comparada con el microbioma relacionado con la preeclampsia (Beckers and Sones, 2019).

Healthy Placental Microbiome	PE-Related Microbiome*
Firmicutes	
<i>Clostridium</i>	<i>Anoxybacillus sp.</i>
<i>Enterococcus spp.</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Listeria sp.</i>
<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Dialister sp.</i>
<i>Bacillus</i>	
<i>Lachnospiraceae</i>	
<i>Lactococcus</i>	
<i>Lysinibacillus</i>	
<i>Solibacillus</i>	
<i>Sporosarcina</i>	
<i>Streptococcaceae</i>	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	
Unclassified <i>Bacillales</i>	
<i>Ureaplasma parvum</i>	
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	
<i>Veillonellaceae</i>	
Actinobacteria	
<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>Actinobacillus actinomycetemconitans</i>
<i>Propionibacterium acnes</i>	
<i>Bifidobacterium spp</i>	
<i>Gardnerella spp.</i>	
<i>Rhodococcus</i>	
Proteobacteria	
<i>Acinetobacter spp.</i>	<i>Salmonella sp.</i>
<i>Enterobacter spp.</i>	<i>Escherichia sp.</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Klesiella pneumonia</i>
<i>Hemophilus parainfluenzae</i>	<i>Variovorax sp.</i>
<i>Neisseria spp.</i>	
<i>Nitrobacter</i>	
Bacteroidetes	
<i>Bacteroidales</i>	<i>Tannerella forsynthesis</i>
<i>Prevotella melaninogenica</i>	<i>Prevotella sp.</i>
	<i>Porphyromonas sp.</i>
Fusobacteria	
<i>Fusobacterium spp.</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
Spirochaetes	
	<i>Treponema dentocola</i>

Aunque la respuesta inmunitaria innata del LA y de la membrana amniótica es un proceso complejo, no significa que una infección no pueda resolverse. Es vital que entendamos la patogénesis de los diferentes microorganismos y la participación variable del sistema inmunitario innato del LA y de la membrana amniótica (Šket et al., 2021).

6. CONCLUSIONES

- 1.** La controversia sobre la existencia del microbioma fetal y la influencia en el desarrollo fetal está en auge, por lo que se están llevando a cabo numerosos estudios para dilucidar esta microbiota que requiere de metodologías más precisas que optimicen su detección e identificación.
- 2.** La teoría del útero estéril se apoya en un fenómeno de contaminación de las pruebas, en la colonización microbiana en el momento del parto o en la dificultad para recoger las muestras y procesarlas en el laboratorio preservando la esterilidad.
- 3.** Los estudios que apoyan la existencia de microbiota en el líquido amniótico indican que podría existir desde el primer trimestre de embarazo -e incluso desde momento de la concepción- influyendo en toda la vida del individuo, aunque la biomasa sea muy baja. Esta microbiota del entorno fetal comparte características bastante similares con la microbiota del meconio.
- 4.** La tendencia actual está encaminada a establecer una correlación del beneficio que el microbioma ofrece en el desarrollo intrauterino, así como las consecuencias negativas que podrían dar lugar a infecciones en el feto o parto prematuro.
- 5.** Son necesarios nuevos estudios para conocer de manera precisa la posible presencia y la función de los microorganismos en el líquido amniótico tal y como definen en la actualidad determinados autores que describen un microbioma del líquido amniótico y con ello, favorecer un embarazo lo más seguro posible.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Al Alam D, Danopoulos S, Grubbs B, Ali NABM, MacAogain M, Chotirmall SH, Warburton D, Gaggar A, Ambalavanan N, Lal CV. Human Fetal Lungs Harbor a Microbiome Signature. *Am J Respir Crit Care Med*. 2020 Apr 15;201(8):1002-1006. doi: 10.1164/rccm.201911-2127LE. PMID: 31898918; PMCID: PMC7159424.
- Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, Li Y, Xia Y, Xie H, Zhong H, Khan MT, Zhang J, Li J, Xiao L, Al-Aama J, Zhang D, Lee YS, Kotowska D, Colding C, Tremaroli V, Yin Y, Bergman S, Xu X, Madsen L, Kristiansen K, Dahlgren J, Wang J. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe*. 2015 Jun 10;17(6):852. doi: 10.1016/j.chom.2015.05.012. Epub 2015 Jun 10. Erratum for: *Cell Host Microbe*. 2015 May 13;17(5):690-703. PMID: 26308884.
- Bagga R, Arora P. Genital Micro-Organisms in Pregnancy. *Front Public Health*. 2020 Jun 16;8:225. doi: 10.3389/fpubh.2020.00225. PMID: 32612969; PMCID: PMC7308476.
- Beckers KF, Sones JL. Maternal microbiome and the hypertensive disorder of pregnancy, preeclampsia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2020 Jan 1;318(1):H1-H10. doi: 10.1152/ajpheart.00469.2019. Epub 2019 Oct 18. PMID: 31626558.
- Bhatti G, Romero R, Gomez-Lopez N, Chaiworapongsa T, Jung E, Gotsch F, Pique-Regi R, Pacora P, Hsu CD, Kavdia M, Tarca AL. The amniotic fluid proteome changes with gestational age in normal pregnancy: a cross-sectional study. *Sci Rep*. 2022 Jan 12;12(1):601. doi: 10.1038/s41598-021-04050-9. PMID: 35022423; PMCID: PMC8755742.
- Blaser MJ, Dominguez-Bello MG. The Human Microbiome before Birth. *Cell Host Microbe*. 2016 Nov 9;20(5):558-560. doi: 10.1016/j.chom.2016.10.014. PMID: 27832586.
- Bolte EE, Moorshead D, Aagaard KM. Maternal and early life exposures and their potential to influence development of the microbiome. *Genome Med*. 2022 Jan 11;14(1):4. doi: 10.1186/s13073-021-01005-7. PMID: 35016706; PMCID: PMC8751292.

- Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología [Bacterial identification methods in the microbiology laboratory]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2011 Oct;29(8):601-8. Spanish. doi: 10.1016/j.eimc.2011.03.012. Epub 2011 Jun 17. PMID: 21684044.
- Brace RA, Cheung CY, Anderson DF. Regulation of amniotic fluid volume: insights derived from amniotic fluid volume function curves. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2018 Oct 1;315(4):R777-R789. doi: 10.1152/ajpregu.00175.2018. Epub 2018 Jul 19. PMID: 30024777; PMCID: PMC6230884.
- 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 Mar 22;6:23129. doi: 10.1038/srep23129. PMID: 27001291; PMCID: PMC4802384.
- Coscia A, Bardanzellu F, Caboni E, Fanos V, Peroni DG. When a Neonate Is Born, So Is a Microbiota. *Life (Basel)*. 2021 Feb 16;11(2):148. doi: 10.3390/life11020148. PMID: 33669262; PMCID: PMC7920069.
- de Goffau MC, Lager S, Sovio U, Gaccioli F, Cook E, Peacock SJ, Parkhill J, Charnock-Jones DS, Smith GCS. Human placenta has no microbiome but can contain potential pathogens. *Nature*. 2019 Aug;572(7769):329-334. doi: 10.1038/s41586-019-1451-5. Epub 2019 Jul 31. Erratum in: *Nature*. 2019 Oct;574(7778):E15. PMID: 31367035; PMCID: PMC6697540.
- Dekaboruah E, Suryavanshi MV, Chettri D, Verma AK. Human microbiome: an academic update on human body site specific surveillance and its possible role. *Arch Microbiol*. 2020 Oct;202(8):2147-2167. doi: 10.1007/s00203-020-01931-x. Epub 2020 Jun 10. PMID: 32524177; PMCID: PMC7284171.
- del Río B, Redruello B, Fernández M, Ladero V, Álvarez MA. Biogenic amines in food: Molecular methods for the detection and identification of BA-producing bacteria. *arbor* [Internet]. 2020Mar.30 [cited 2022May30];196(795):a545. Available from: <https://arbor.revistas.csic.es/index.php/arbor/article/view/2359>
- Derovs A, Laivacuma S, Krumina A. Targeting Microbiota: What Do We Know about It at Present? *Medicina (Kaunas)*. 2019 Aug 10;55(8):459. doi: 10.3390/medicina55080459. PMID: 31405111; PMCID: PMC6723830.

- Ding H, Ding Z, Zhao M, Ji B, Lei J, Chen J, Li M, Li M, Chen Y, Gao Q. Correlation of amniotic fluid index and placental aquaporin 1 levels in terms of preeclampsia. *Placenta*. 2022 Jan;117:169-178. doi: 10.1016/j.placenta.2021.12.010. Epub 2021 Dec 13. PMID: 34929457.
- Fédou C, Breuil B, Golovko I, Decramer S, Magalhães P, Muller F, Dreux S, Zürbig P, Klein J, Schanstra JP, Buffin-Meyer B. Comparison of the amniotic fluid and fetal urine peptidome for biomarker discovery in renal developmental disease. *Sci Rep*. 2020 Dec 10;10(1):21706. doi: 10.1038/s41598-020-78730-3. PMID: 33303833; PMCID: PMC7729974.
- Fitzgibbon G, Mills KHG. The microbiota and immune-mediated diseases: Opportunities for therapeutic intervention. *Eur J Immunol*. 2020 Mar;50(3):326-337. doi: 10.1002/eji.201948322. Epub 2020 Feb 6. PMID: 31991477.
- Fitzsimmons ED, Bajaj T. Embryology, Amniotic Fluid. 2021 Jul 25. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. PMID: 31082133.
- Galaz J, Romero R, Xu Y, Miller D, Slutsky R, Levenson D, Hsu CD, Gomez-Lopez N. Cellular immune responses in amniotic fluid of women with preterm clinical chorioamnionitis. *Inflamm Res*. 2020 Feb;69(2):203-216. doi: 10.1007/s00011-019-01308-x. Epub 2020 Jan 7. PMID: 31912179; PMCID: PMC7147946.
- Ghose C, Ly M, Schwanemann LK, Shin JH, Atab K, Barr JJ, Little M, Schooley RT, Chopyk J, Pride DT. The Virome of Cerebrospinal Fluid: Viruses Where We Once Thought There Were None. *Front Microbiol*. 2019 Sep 6;10:2061. doi: 10.3389/fmicb.2019.02061. PMID: 31555247; PMCID: PMC6742758
- Gomez-Lopez N, Romero R, Garcia-Flores V, Xu Y, Leng Y, Alhousseini A, Hassan SS, Panaitescu B. Amniotic fluid neutrophils can phagocytize bacteria: A mechanism for microbial killing in the amniotic cavity. *Am J Reprod Immunol*. 2017 Oct;78(4):10.1111/aji.12723. doi: 10.1111/aji.12723. Epub 2017 Jul 13. PMID: 28703488; PMCID: PMC5623137.
- Gotoh A, Nara M, Sugiyama Y, Sakanaka M, Yachi H, Kitakata A, Nakagawa A, Minami H, Okuda S, Katoh T, Katayama T, Kurihara S. Use of Gifu Anaerobic Medium for culturing 32 dominant species of human gut microbes and its evaluation based on short-chain fatty acids fermentation profiles. *Biosci*

- Biotechnol Biochem. 2017 Oct;81(10):2009-2017. doi: 10.1080/09168451.2017.1359486. Epub 2017 Aug 7. PMID: 28782454.
- Gschwind R, Fournier T, Butel MJ, Wydau-Dematteis S. Établissement du microbiote - Une colonisation in utero déterminante pour la santé future ? [Microbiota establishment: an in utero colonization decisive for future health?]. *Med Sci (Paris)*. 2018 Apr;34(4):331-337. French. doi: 10.1051/medsci/20183404014. Epub 2018 Apr 16. PMID: 29658476.
 - He Q, Kwok LY, Xi X, et al. The meconium microbiota shares more features with the amniotic fluid microbiota than the maternal fecal and vaginal microbiota. *Gut Microbes*. 2020;12(1):1794266. doi:10.1080/19490976.2020.1794266
 - Hernández M, Quijada NM, Rodríguez-Lázaro D, Eiros JM. Aplicación de la secuenciación masiva y la bioinformática al diagnóstico microbiológico clínico [Bioinformatics of next generation sequencing in clinical microbiology diagnosis]. *Rev Argent Microbiol*. 2020 Apr-Jun;52(2):150-161. Spanish. doi: 10.1016/j.ram.2019.06.003. Epub 2019 Nov 26. PMID: 31784184.
 - Hokstad I. Elektroforese [Electrophoresis]. *Tidsskr Nor Laegeforen*. 2021 Feb 22;141(3). Norwegian. doi: 10.4045/tidsskr.20.1041. PMID: 33624972.
 - Hornová Markéta, Pařízek Antonín, Koucký Michal. The role of the microbiome in pregnancy. *Ceska Gynekol*. 2021;86(6):422-427. English. doi: 10.48095/cccg2021422. PMID: 35038883.
 - Javiera Ramírez C. Seminario N° 63 Evaluación ecográfica del Líquido Amniótico. Facultad de Medicina, Universidad de Chile. 2021. [Consultado en marzo de 2022]. Disponible en: <https://cerpo.cl/descargar/23f338659404fd062930eabb04a4b1be/ver>. El doi de este documento no existe.
 - Jindal A, Sharma M, Chaudhary C. Amniocentesis. 2021 Dec 26. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. PMID: 32644673. El doi de este documento no existe.
 - Jung E, Romero R, Yoon BH, Theis KR, Gudicha DW, Tarca AL, Diaz-Primera R, Winters AD, Gomez-Lopez N, Yeo L, Hsu CD. Bacteria in the amniotic fluid without inflammation: early colonization vs. contamination. *J Perinat Med*. 2021 Jul 7;49(9):1103-1121. doi: 10.1515/jpm-2021-0191. PMID: 34229367; PMCID: PMC8570988.

- Kiani AK, Paolacci S, Amato B, Mattassi RE, Tassi V, Falsini B, Di Renzo G, Guda T, Kallazi M, Dautaj A, Dhuli K, Morrone A, Bellinato F, Gisondi P, Bertelli M. In vitro cell culture of amniotic fluid keratinocytes on amniotic membrane: the ideal tissue for repairing skin ulcers. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2021 Dec;25(1 Suppl):49-55. doi: 10.26355/eurrev_202112_27333. PMID: 34890034.
- Kuperman AA, Zimmerman A, Hamadia S, Ziv O, Gurevich V, Fichtman B, Gavert N, Straussman R, Rechnitzer H, Barzilay M, Shvalb S, Bornstein J, Ben-Shachar I, Yagel S, Haviv I, Koren O. Deep microbial analysis of multiple placentas shows no evidence for a placental microbiome. *BJOG*. 2020 Jan;127(2):159-169. doi: 10.1111/1471-0528.15896. Epub 2019 Aug 24. PMID: 31376240.
- Lim ES, Rodriguez C, Holtz LR. Amniotic fluid from healthy term pregnancies does not harbor a detectable microbial community. *Microbiome*. 2018 May 11;6(1):87. doi: 10.1186/s40168-018-0475-7. Erratum in: *Microbiome*. 2019 Feb 12;7(1):22. PMID: 29751830; PMCID: PMC5946436.
- Liu X, Quan S, Fu Y, Wang W, Zhang W, Wang X, Zhang C, Xiang D, Zhang L, Wang C. Study on amniotic fluid metabolism in the second trimester of Trisomy 21. *J Clin Lab Anal*. 2020 Mar;34(3):e23089. doi: 10.1002/jcla.23089. Epub 2019 Nov 10. PMID: 31709651; PMCID: PMC7083445.
- Liu Y, Li X, Zhu B, Zhao H, Ai Q, Tong Y, Qin S, Feng Y, Wang Y, Wang S, Ma J, Yang H. Midtrimester amniotic fluid from healthy pregnancies has no microorganisms using multiple methods of microbiologic inquiry. *Am J Obstet Gynecol*. 2020 Aug;223(2):248.e1-248.e21. doi: 10.1016/j.ajog.2020.01.056. Epub 2020 Feb 1. PMID: 32017922.
- 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 Jul;482:161-165. doi: 10.1016/j.cca.2018.04.001. Epub 2018 Apr 4. PMID: 29626438.
- Malmuthuge N, Griebel PJ. Fetal environment and fetal intestine are sterile during the third trimester of pregnancy. *Vet Immunol Immunopathol*. 2018 Oct;204:59-64. doi: 10.1016/j.vetimm.2018.09.005. Epub 2018 Sep 26. PMID: 30290960.

- Marchocki Z, Vinturache A, Collins K, O' Reilly P, O'Donoghue K. Amniotic fluid C-reactive protein as a predictor of infection in caesarean section: a feasibility study. *Sci Rep.* 2018 Apr 23;8(1):6372. doi: 10.1038/s41598-018-24569-8. PMID: 29686267; PMCID: PMC5913132.
- Paglia L. From native core microbiome to milk-oriented microbiome. *Eur J Paediatr Dent.* 2021 Jun;22(2):89. doi: 10.23804/ejpd.2021.22.02.1. PMID: 34237996.
- Papatheodorou SA, Halvatsiotis P, Houhoula D. A comparison of different DNA extraction methods and molecular techniques for the detection and identification of foodborne pathogens. *AIMS Microbiol.* 2021 Sep 9;7(3):304-319. doi: 10.3934/microbiol.2021019. PMID: 34708174; PMCID: PMC8500797.
- Perez-Muñoz ME, Arrieta MC, 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 Apr 28;5(1):48. doi: 10.1186/s40168-017-0268-4. PMID: 28454555; PMCID: PMC5410102.
- Peroni DG, Nuzzi G, Trambusti I, Di Cicco ME, Comberiati P. Microbiome Composition and Its Impact on the Development of Allergic Diseases. *Front Immunol.* 2020 Apr 23;11:700. doi: 10.3389/fimmu.2020.00700. PMID: 32391012; PMCID: PMC7191078.
- Rehbinder EM, Lødrup Carlsen KC, Staff AC, Angell IL, Landrø L, Hilde K, Gaustad P, Rudi K. Is amniotic fluid of women with uncomplicated term pregnancies free of bacteria? *Am J Obstet Gynecol.* 2018 Sep;219(3):289.e1-289.e12. doi: 10.1016/j.ajog.2018.05.028. Epub 2018 May 29. PMID: 29852156.
- Romero R, Gomez-Lopez N, Winters AD, Jung E, Shaman M, Bieda J, Panaitescu B, Pacora P, Erez O, Greenberg JM, Ahmad MM, Hsu CD, Theis KR. Evidence that intra-amniotic infections are often the result of an ascending invasion - a molecular microbiological study. *J Perinat Med.* 2019 Nov 26;47(9):915-931. doi: 10.1515/jpm-2019-0297. PMID: 31693497; PMCID: PMC7147941.
- Schoenmakers S, Steegers-Theunissen R, Faas M. The matter of the reproductive microbiome. *Obstet Med.* 2019 Sep;12(3):107-115. doi: 10.1177/1753495X18775899. Epub 2018 May 17. PMID: 31523266; PMCID: PMC6734629.

- Šket T, Ramuta TŽ, Starčič Erjavec M, Kreft ME. The Role of Innate Immune System in the Human Amniotic Membrane and Human Amniotic Fluid in Protection Against Intra-Amniotic Infections and Inflammation. *Front Immunol.* 2021 Oct 21;12:735324. doi: 10.3389/fimmu.2021.735324. PMID: 34745106; PMCID: PMC8566738.
- Sterpu I, Fransson E, Hugerth LW, Du J, Pereira M, Cheng L, Radu SA, Calderón-Pérez L, Zha Y, Angelidou P, Pennhag A, Boulund F, Scheynius A, Engstrand L, Wiberg-Itzel E, Schuppe-Koistinen I. No evidence for a placental microbiome in human pregnancies at term. *Am J Obstet Gynecol.* 2021 Mar;224(3):296.e1-296.e23. doi: 10.1016/j.ajog.2020.08.103. Epub 2020 Aug 29. PMID: 32871131.
- Stinson LF, Boyce MC, Payne MS, Keelan JA. The Not-so-Sterile Womb: Evidence That the Human Fetus Is Exposed to Bacteria Prior to Birth. *Front Microbiol.* 2019 Jun 4;10:1124. doi: 10.3389/fmicb.2019.01124. PMID: 31231319; PMCID: PMC6558212.
- Stinson LF, Keelan JA, Payne MS. Identification and removal of contaminating microbial DNA from PCR reagents: impact on low-biomass microbiome analyses. *Lett Appl Microbiol.* 2019 Jan;68(1):2-8. doi: 10.1111/lam.13091. Epub 2018 Nov 23. PMID: 30383890.
- Theis KR, Romero R, Winters AD, Greenberg JM, Gomez-Lopez N, Alhousseini A, Bieda J, Maymon E, Pacora P, Fettweis JM, Buck GA, Jefferson KK, Strauss JF 3rd, Erez O, Hassan SS. Does the human placenta delivered at term have a microbiota? Results of cultivation, quantitative real-time PCR, 16S rRNA gene sequencing, and metagenomics. *Am J Obstet Gynecol.* 2019 Mar;220(3):267.e1-267.e39. doi: 10.1016/j.ajog.2018.10.018. PMID: 30832984; PMCID: PMC6733039.
- Tomaiuolo R, Veneruso I, Cariati F, D'Argenio V. Microbiota and Human Reproduction: The Case of Female Infertility. *High Throughput.* 2020 May 3;9(2):12. doi: 10.3390/ht9020012. PMID: 32375241; PMCID: PMC7349014.
- Toson B, Simon C, Moreno I. The Endometrial Microbiome and Its Impact on Human Conception. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 1;23(1):485. doi: 10.3390/ijms23010485. PMID: 35008911; PMCID: PMC8745284.
- Wang H, Yang GX, Hu Y, Lam P, Sangha K, Siciliano D, Swenerton A, Miller R, Tilley P, Von Dadelszen P, Kalyan S, Tang P, Patel MS. Comprehensive

- human amniotic fluid metagenomics supports the sterile womb hypothesis. *Sci Rep*. 2022 Apr 27;12(1):6875. doi: 10.1038/s41598-022-10869-7. PMID: 35477737; PMCID: PMC9046152.
- Whittle E, Leonard MO, Harrison R, Gant TW, Tonge DP. Multi-Method Characterization of the Human Circulating Microbiome. *Front Microbiol*. 2019 Jan 17;9:3266. doi: 10.3389/fmicb.2018.03266. PMID: 30705670; PMCID: PMC6345098.
 - Williams N, Vella R, Zhou Y, Gao H, Mass K, Townsel C, Campbell W, Luo G. Investigating the origin of the fetal gut and placenta microbiome in twins. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2021 Jun 15:1-11. doi: 10.1080/14767058.2021.1936487. Epub ahead of print. PMID: 34130585.
 - Winters AD, Romero R, Greenberg JM, Galaz J, Shaffer ZD, Garcia-Flores V, Kracht DJ, Gomez-Lopez N, Theis KR. Does the Amniotic Fluid of Mice Contain a Viable Microbiota? *Front Immunol*. 2022 Feb 28;13:820366. doi: 10.3389/fimmu.2022.820366. PMID: 35296083; PMCID: PMC8920496.
 - Wu H, Sun W, Chen H, Wu Y, Ding W, Liang S, Huang X, Chen H, Zeng Q, Li Z, Xiong P, Huang J, Akinwunmi B, Zhang CJP, Ming WK. Health-related quality of life in different trimesters during pregnancy. *Health Qual Life Outcomes*. 2021 Jul 21;19(1):182. doi: 10.1186/s12955-021-01811-y. PMID: 34289867; PMCID: PMC8296584.
 - Zhu L, Luo F, Hu W, Han Y, Wang Y, Zheng H, Guo X, Qin J. Bacterial Communities in the Womb During Healthy Pregnancy. *Front Microbiol*. 2018 Sep 6;9:2163. doi: 10.3389/fmicb.2018.02163. PMID: 30237795; PMCID: PMC6135892.