



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

**Estudio de la microbiota vaginal en mujeres
premenopáusicas y efectos de la administración de
probióticos vía oral**

Autor:

Melanie Cristine Alonzo Martínez

Directores:

Dr. Eduardo Cazorla Amorós

Dr. Vicente Navarro López

Murcia, 2 de Julio 2021



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

Estudio de la microbiota vaginal en mujeres
premenopáusicas y efectos de la administración de
probióticos vía oral

Autor:

Melanie Cristine Alonzo Martínez

Directores:

Dr. Eduardo Cazorla Amorós

Dr. Vicente Navarro López

Murcia, 2 de Julio de 2021



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. D. Eduardo Cazorla Amorós y el Dr. D. Vicente Navarro López como Directores⁽¹⁾ de la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la microbiota vaginal en mujeres premenopáusicas y efectos de la administración de probióticos vía oral” realizada por D. Melanie Cristine Alonzo Martínez en el Programa de Doctorado Ciencias de la Salud, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al Real Decreto 99/2011 de 28 de enero, en Murcia a 17 de Mayo de 2021.

EDUARDO
O|
CAZORLA
|AMOROS

Firmado digitalmente por EDUARDO| CAZORLA| AMOROS
Fecha: 2021.05.20 07:37:28 +02'00'

Firmado por Vicente Navarro López, DNI 21641942T

⁽¹⁾ Si la Tesis está dirigida por más de un Director tienen que constar y firmar ambos.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar debo agradecer a mi familia que me ha apoyado durante la realización de esta tesis, haciendo estos cuatro años mucho más llevaderos, especialmente a mi madre María Luisa Martínez.

A mi pareja Luis Marín García, por motivarme y apoyarme durante todos estos años.

A mi director, Jefe de servicio del Hospital Universitario de Torrevieja y Vinalopó y miembro del grupo MiBioPath, el Dr. Eduardo Cazorla Amorós, por introducirme en el interesante mundo de la microbiota vaginal, por su paciencia infinita y dedicación a lo largo de estos cuatro años y alguien sin el cual este trabajo no hubiera sido posible.

A mi director, investigador principal del grupo MiBioPath y director de la cátedra de Microbiota Humana de la Universidad Católica San Antonio de Murcia, Vicente Navarro López, por su ayuda en la metodología de este estudio y trabajo como asesor experto en microbiota humana que siempre ha estado dispuesto a resolver todas mis dudas.

A Ana Navarro, enfermera y coordinadora de ensayos clínicos, y Esther Cánovas Morales, compañera Ginecóloga, por el gran trabajo en equipo y ayudarme en el arduo trabajo de la recolección de datos y logística del estudio.

A Laura Navarro, alumna de doctorado de la UCAM y miembro de MiBioPath, por su apoyo en el proceso de aleatorización. A Erik Climent, Amparo Chenoll y Juan F Martínez, de Archer Daniels Midland Co-Biopolis, por su apoyo en el análisis bioinformático de las muestras.

Al Servicio de Ginecología, matronas y auxiliares del Hospital Universitario de Torrevieja por su labor asistencial y de apoyo durante la realización del estudio.

Por último pero no menos importante, a las pacientes que confiaron en nosotros y nos permitieron obtener los datos necesarios para nuestro estudio y sin las cuales este trabajo no habría sido posible.

«Somos lo que hacemos repetidamente.
La excelencia, entonces, no es un acto; es un hábito»

Aristóteles

RESUMEN

Alonzo Martínez, Melanie C (2021). Estudio de la microbiota vaginal en mujeres premenopáusicas y efectos de la administración de probióticos vía oral.

INTRODUCCIÓN

La microbiota vaginal es un ecosistema complejo y su composición puede cambiar drásticamente dependiendo de diferentes factores que pueden causar una depleción lactobacilar y tendencia a la disbiosis. Las herramientas existentes actualmente para combatir las disbiosis vaginales como los antimicrobianos cuentan con un alto porcentaje de resistencias originando estados crónicos inflamatorios que puede fomentar la carcinogénesis.

Para mantener un estado de homeostasis en la microbiota vaginal, en ocasiones se necesita de un aporte exógeno de *Lactobacillus* mediante formulaciones probióticas como ayudante de los antimicrobianos en el tratamiento y prevención de procesos infecciosos. Sin embargo, no todos los probióticos han demostrado ser útiles y sus propiedades pueden diferir ampliamente entre cepas.

MÉTODOS

El presente proyecto consiste en un análisis prospectivo de la microbiota vaginal de mujeres premenopáusicas sanas, así como estudio del impacto que ejerce la ingesta del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800 vía oral sobre este ecosistema. El diseño consiste en un estudio de intervención con el probiótico seleccionado, controlado con placebo, aleatorizado, doble ciego. El tipo de muestreo fue no probabilístico secuencial en el que se seleccionaron las primeras 80 pacientes que acudieron a la Consulta de Ginecología General y del Tracto Genital Inferior del Hospital Universitario de Torrevieja. Los criterios de inclusión fueron mujeres en edad fértil de 30 años o más, sin diagnóstico clínico de

vaginosis y deseo de participar en el estudio. Los criterios de exclusión fueron estado de embarazo, lactancia, uso de anticonceptivos, no deseo de usar métodos de barrera masculinos, uso de espermicidas, contraindicación a los excipientes del producto y uso de otros probióticos en los dos meses anteriores o antibióticos en las últimas dos semanas. En la Visita 1, se descartaron signos de vaginosis mediante especuloscopia. En caso de normalidad, se tomó la primera muestra vaginal. Posteriormente, los pacientes se dividieron en dos grupos de forma aleatorizada doble ciega: Grupo 1, tratamiento con *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800 1×10^{10} UFC/cápsula, y Grupo 2, cápsulas placebo idénticas. Se ofreció la realización de una Visita 2 intermedia de carácter voluntario tomando únicamente un muestreo vaginal. En la Visita 3, después de un período de cuatro semanas, se tomó la última muestra vaginal para evaluar la presencia del probiótico en la microbiota vaginal después de su administración oral y el efecto del tratamiento sobre la composición de la microbiota vaginal. Las muestras se analizaron utilizando técnicas de secuenciación masiva para detectar el gen 16S ARNr. El estudio fue aprobado por el comité ético de investigación clínica con medicamentos y productos de salud del Hospital Universitario de Torrevieja (CEIm).

RESULTADOS

Durante el estudio, se retiraron 7 pacientes por no asistir a la Visita 3, mala adherencia al tratamiento, sensación de distensión abdominal (una paciente perteneciente al Grupo 2, placebo) y errores en el procesamiento de las muestras. No se encontraron otros eventos adversos. El tamaño final de la muestra fue de 73 pacientes (Grupo 1, $n = 37$; Grupo 2, $n = 36$). En relación a los vaginotipos encontrados en nuestro estudio, en la Visita 1 (basal) se observó que el grupo asignado al tratamiento probiótico contenía un mayor número de mujeres con microbiota vaginal disbiótica (tipo IV) que las del grupo placebo. Después de 4 semanas de tratamiento con CECT 8800 versus placebo, no se detectaron diferencias en la evolución del género *Lactobacillus* ni de la especie *L. rhamnosus* entre los grupos que tomaron CECT 8800 y placebo, aunque para nuestra cepa se obtuvo un valor de p más reducido (p -value = 0,13). Tampoco se observaron cambios en cuanto a la prevalencia de las especies patógenas estudiadas:

Gardnerella vaginalis, *Atopobium vaginae* y *Streptococcus agalactiae*. En cuanto a *Cutibacterium acnes* (anteriormente *Propionibacterium acnes*), no se obtuvo cuantificación de esta especie en las muestras analizadas. Al unificar todos los patógenos y compararlos con los valores iniciales en ambos grupos, se encontró una disminución de microorganismos “patógenos” en el grupo que consumió CECT 8800, pero sin significancia estadística.

En cuanto a la composición basal de la microbiota vaginal, los vaginotipos más frecuentes en nuestra población fueron el I (*L. crispatus*) y el III (*L. iners*). El segundo lugar lo ocupa la microbiota tipo IV (diversidad bacteriana). Al comparar estos resultados con la Visita 3, observamos que el 75% de las pacientes mantuvo su vaginotipo inicial. En este sentido, observamos como la microbiota vaginal tiende a mantenerse constante en el tiempo, siguiendo la hipótesis de *Community resilience*.

DISCUSIÓN

Existen una serie de factores que se han de tomar en cuenta a la hora de analizar los resultados obtenidos en este estudio. En primer lugar la cepa empleada, *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800, proviene de muestras vaginales de mujeres sanas, por lo que su capacidad de colonización vaginal está garantizada. En un estudio in vitro previo, se seleccionó esta cepa de entre 44 cepas aisladas por su facultad para disminuir el pH, reducción de citoquinas proinflamatorias, síntesis de ácido láctico e inhibición de patógenos. En otro estudio in vivo se administró CECT 8800 vía vaginal a mujeres sometidas a estimulación ovárica, observándose un aumento de la concentración de *Lactobacillus* de forma significativa, así como un incremento de vaginotipos con predominancia lactobacilar (I,III,V). Sin embargo, a pesar de que la cepa CECT 8800 es de procedencia vaginal, no se encuentra entre las más prevalentes de esta microbiota, lo que puede haber influido en los resultados del estudio. En segundo lugar, nuestra formulación farmacéutica cuenta con cápsulas resistentes a secreciones de ácido gástrico y a los ácidos biliares. La dosis empleada es la más alta existente actualmente en el mercado (10^{10} UFC) y la viabilidad de las cepas fue comprobada por el fabricante previo a su dispensación. Además, las cápsulas contienen

maltodextrina y estearato de magnesio, un prebiótico y excipiente ampliamente usado en otros productos farmacéuticos. Tercero, el almacenaje del producto se realizó según las indicaciones del fabricante. Cuarto, las muestras fueron preservadas en solución estabilizadora de ARN y ADN y congeladas a -30°C con cadena de frío conservada. Quinto, se verificó la adherencia al tratamiento. Sexto, las muestras fueron procesadas de manera adecuada en el laboratorio y no existieron incidencias en las técnicas de secuenciación masiva de las muestras. Hay que considerar la posibilidad de que la cepa seleccionada requiera de su administración tópica vaginal para alcanzar el beneficio terapéutico, ser coadministrada como un probiótico multiespecie o requiera de un periodo de administración más prolongado.

CONCLUSIÓN

En nuestro estudio, se demuestra que la cepa probiótica seleccionada, *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800, no coloniza la microbiota vaginal después de su administración oral ni produce cambios significativos en este ecosistema. Sin embargo, el amplio estudio de microbiota vaginal realizado en este trabajo, servirá de base para la selección de nuevas cepas probióticas candidatas para su aporte exógeno en el tratamiento y prevención de diversas infecciones vaginales como el *virus del papiloma humano*. Una estrategia interesante a considerar en futuras líneas de investigación, es el empleo de probióticos multiespecie incluyendo CECT 8800 vía vaginal, donde ya se ha demostrado su eficacia. Además, debido a que otras cepas de la especie *Lactobacillus rhamnosus* han demostrado su beneficio a nivel intestinal, futuros estudios determinarán el impacto de CECT 8800 sobre este ecosistema.

PALABRAS CLAVE: *Lactobacillus*, *Lactobacillus rhamnosus*, microbiota vaginal, probióticos, disbiosis.

TÉRMINOS TESAURO: Ginecología (ID_GEN 32, ID_MED 01, ID_ESP 08); Microbiología (ID_GEN 24, ID_MED 14, ID_ESP 00).

ABSTRACT

Alonzo Martínez, Melanie C (2021). Study of the vaginal microbiota of premenopausal women and effects of the administration of oral probiotics.

INTRODUCTION

The vaginal microbiota is a complex ecosystem and its composition can drastically change according to different factors that can cause lactobacillary depletion and a tendency towards dysbiosis. The existing current tools to combat vaginal dysbiosis such as antimicrobials have a high percentage of resistances, causing chronic inflammatory states that can promote carcinogenesis.

In order to maintain a state of homeostasis in the vaginal microbiota, an exogenous input of *Lactobacillus* through probiotic formulations is sometimes needed as an aid to antimicrobials in the treatment and prevention of infectious processes. However, not all probiotics have been useful and their properties may be different between strains.

METHODS

The present project consists in a prospective analysis of the vaginal microbiota of healthy premenopausal women, as well as a study of the impact that the oral intake of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800 has on this ecosystem. The methodology design consists in an intervention study with the selected, placebo-controlled, randomized, double-blind probiotic. The type of sampling was sequential non-probabilistic in which the first 80 patients who attended the General Gynecology and Lower Genital Tract office at the University Hospital of Torrevieja were selected. The inclusion criteria were women of childbearing age of 30 years or older, with no clinical diagnosis of vaginosis and a desire to participate in the study. Exclusion criteria were pregnancy, lactation, contraceptive use, no desire to use male barrier methods, use of spermicides, contraindication to the excipients of the product, and use of other probiotics in the previous two months or antibiotics in the past two weeks. At Visit 1, signs of vaginosis were ruled out with a speculum examination. In case of normality, the

first vaginal sample was taken. Subsequently, the patients were divided into two groups in a randomized double-blind way: Group 1, treatment with *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800 1×10^{10} CFU / capsule, and Group 2, identical placebo capsules. A voluntary intermediate Visit 2 was carried out where only a vaginal sampling was taken. At Visit 3, after a period of four weeks, the last vaginal sample was taken to assess the presence of the probiotic in the vaginal microbiota after its oral administration and study the effect of the treatment on the composition of the vaginal microbiota. The samples were analyzed using mass sequencing techniques to detect the 16S rRNA gene. The study was approved by the Clinical Research Ethics Committee with drugs and health products of the University Hospital of Torrevieja (CEIm).

RESULTS

During the study, 7 patients were withdrawn due to non-attendance to Visit 3, poor compliance to treatment, bloating sensation (one patient of Group 2, placebo) and errors in sample processing. No other adverse events were found. The final sample size was 73 patients (Group 1, $n = 37$; Group 2, $n = 36$). In relation to the vaginal bacterial community found in our study, at Visit 1 (baseline) it was observed that the group assigned to probiotic treatment contained a greater number of women with dysbiotic vaginal microbiota (type IV) than those in the placebo group. After 4 weeks of treatment with CECT 8800 versus placebo, no differences were detected in the evolution of the genus *Lactobacillus* or the species *L. rhamnosus* between the groups that took CECT 8800 and placebo, although a lower p-value was obtained for our strain (p-value = 0.13). There were also no changes in the prevalence of the pathogenic species studied: *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* and *Streptococcus agalactiae*. Regarding *Cutibacterium acnes* (previously *Propionibacterium acnes*), no quantification of this species was obtained in the analyzed samples. When unifying all the pathogens and comparing them with the initial values in both groups, a decrease in "pathogenic" microorganisms was found in the group that consumed CECT 8800, but without statistical significance.

Regarding the basal composition of the vaginal microbiota, the most frequent vaginal bacterial community in our population were I (*L. crispatus*) and

III (*L. iners*). The second place is occupied by the type IV microbiota (bacterial diversity). When comparing these results with Visit 3, we observed that 75% of the patients maintained their initial microbiota composition. In this sense, we observe how the vaginal microbiota tends to remain constant over time, following the *Community resilience hypothesis*.

DISCUSSION

There are a number of factors that must be taken into account when analyzing the results obtained in this study. First, the strain used, *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800, comes from vaginal samples of healthy women, so its capacity for vaginal colonization is guaranteed. In a previous in vitro study, this strain was selected among 44 isolated strains for its ability to lower the pH, reduce pro-inflammatory cytokines, lactic acid synthesis and inhibition of pathogens. In other in vivo study, CECT 8800 was administered vaginally to women undergoing ovarian stimulation, observing a significant increase in *Lactobacillus* concentration, as well as an augmentation of vaginal bacterial community with a lactobacillary predominance (I, III, V). However, despite that CECT 8800 strain is of vaginal origin, it is not among the most prevalent of this microbiota, which may have influenced the results of the study. Secondly, our pharmaceutical formulation has capsules resistant to gastric acid secretions and bile acids. The dose used is the highest currently available on the market (10^{10} CFU) and the viability of the strains was verified by the manufacturer prior to its distribution. Additionally, the capsules contain maltodextrin and magnesium stearate, a prebiotic and excipient widely used in other pharmaceutical products. Third, the product was stored according to the instructions of the manufacturer. Fourth, the samples were preserved in a RNA and DNA stabilizing substance and frozen at -30° Celsius with a secured cold chain. Fifth, adherence to treatment was verified. Sixth, the samples were adequately processed in the laboratory and there were no incidents in the mass sample sequencing techniques. We have to consider the possibility that the selected strain requires topical vaginal administration to achieve therapeutic benefit, be co-administered as a multispecies probiotic, or requires a longer period of administration.

CONCLUSION

In our study, it is demonstrated that the selected probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800, does not colonize the vaginal microbiota after its oral administration nor does it produce significant changes in this ecosystem. However, the extensive vaginal microbiota study carried out in this project will serve as the basis for the selection of new candidate probiotic strains for their exogenous input as treatment and prevention of various vaginal infections such as the *human papilloma virus*. An interesting strategy to consider in future research areas, is the use of multispecies probiotics including CECT 8800 vaginally, where its efficacy has already been demonstrated. Furthermore, because other strains of the *Lactobacillus rhamnosus* species have demonstrated their benefit at the intestinal level, future studies will determine the impact of CECT 8800 on this ecosystem.

KEY WORDS: *Lactobacillus*, *Lactobacillus rhamnosus*, vaginal microbiota, probiotics, dysbiosis.

ÍNDICE GENERAL

| | Página |
|------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES | |
| AGRADECIMIENTOS | |
| RESUMEN | |
| ÍNDICE GENERAL | |
| SIGLAS Y ABREVIATURAS..... | 25 |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | 29 |
| ÍNDICE DE TABLAS..... | 35 |
| ÍNDICE DE ANEXOS..... | 37 |
| CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN..... | 39 |
| CAPÍTULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 43 |
| 2.1 Marco histórico..... | 45 |
| 2.2 Microbiota vaginal..... | 46 |
| 2.2.1 Generalidades..... | 46 |
| 2.2.2 Factores modificantes de la microbiota..... | 47 |
| 2.2.3 Nomenclatura taxonómica..... | 47 |
| 2.2.4 Comunidades bacterianas o vaginotipos..... | 48 |
| 2.2.5 Variaciones en el vaginotipo a corto plazo..... | 48 |
| 2.2.6 Variaciones fisiológicas de la microbiota vaginal a lo largo de la vida..... | 55 |
| 2.3 Microbiota del tracto genital femenino..... | 59 |
| 2.4 Mecanismos de defensa de los <i>Lactobacillus</i> | 63 |
| 2.5 Probióticos..... | 65 |
| 2.5.1 Definición y generalidades..... | 65 |
| 2.5.2 Beneficios de los probióticos..... | 67 |
| 2.5.3 Vía de administración y formulaciones farmacéuticas..... | 68 |
| 2.5.3.1 Vía vaginal..... | 68 |
| 2.5.3.2 Vía oral..... | 69 |
| 2.5.4 Tiempo de administración y persistencia de las cepas..... | 71 |
| 2.5.5 Dosificación..... | 73 |
| 2.5.6 Aspectos legales..... | 74 |
| 2.5.7 Seguridad de los probióticos..... | 74 |
| 2.6 Prebióticos y simbióticos..... | 77 |
| 2.7 Infecciones vaginales y microbiota..... | 81 |

| | |
|-------------------------------------------------------------|------------|
| 2.7.1 Vaginosis bacteriana | 81 |
| 2.7.2 Vulvovaginitis candidiásica..... | 88 |
| 2.7.3 Tricomoniasis..... | 93 |
| 2.7.4 Virus de la Inmunodeficiencia Humana..... | 96 |
| 2.8 Microbiota y embarazo..... | 100 |
| 2.8.1 Generalidades..... | 100 |
| 2.8.2 Diabetes gestacional y probióticos..... | 102 |
| 2.8.3 Parto pretérmino y probióticos..... | 104 |
| 2.8.4 Neonatos, lactancia y probióticos..... | 106 |
| 2.9 Microbiota y fertilidad..... | 111 |
| 2.10 Microbiota y cáncer ginecológico..... | 114 |
| 2.10.1 Cáncer de Cérvix..... | 114 |
| 2.10.1.1 Microbiota y persistencia del <i>VPH</i> | 115 |
| 2.10.1.2 Lesiones intraepiteliales cervicales..... | 117 |
| 2.10.1.3 <i>VPH</i> y probióticos..... | 119 |
| 2.10.2 Cáncer de endometrio..... | 120 |
| 2.10.3 Cáncer de ovario..... | 121 |
| 2.10.4 Tratamientos oncológicos..... | 123 |
| CAPÍTULO III: OBJETIVOS CIENTÍFICOS E HIPÓTESIS..... | 125 |
| 3.1 Objetivos principales..... | 127 |
| 3.2 Objetivos secundarios..... | 127 |
| 3.3 Hipótesis..... | 127 |
| CAPÍTULO VI: MATERIAL Y MÉTODOS..... | 129 |
| 4.1 Diseño del estudio..... | 131 |
| 4.2 Producto probiótico a estudio..... | 131 |
| 4.2.1 Descripción..... | 131 |
| 4.2.2 Composición..... | 131 |
| 4.2.3 Dosis y modo de empleo..... | 131 |
| 4.2.4 Efectos adversos..... | 132 |
| 4.3 Muestra..... | 132 |
| 4.3.1 Selección de la muestra de pacientes..... | 132 |
| 4.3.2 Cálculo de la muestra..... | 132 |
| 4.3.3 Criterios de inclusión y exclusión..... | 134 |
| 4.3.3.1 Criterios de inclusión..... | 134 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.3.3.2 Criterios de exclusión..... | 134 |
| 4.4 Variables a estudio..... | 134 |
| 4.4.1 Variables principales..... | 134 |
| 4.4.2 Variables secundarias..... | 135 |
| 4.5 Diseño y desarrollo del estudio..... | 135 |
| 4.5.1 Visita 1. Entrevista de reclutamiento o inicial (Semana 0/1)..... | 136 |
| 4.5.2 Visita 2 o intermedia (Semana 2)..... | 138 |
| 4.5.3 Visita 3 o final (Semana 4)..... | 138 |
| 4.6 Proceso de aleatorización y enmascaramiento..... | 138 |
| 4.7 Recogida de datos..... | 139 |
| 4.8 Análisis de las muestras..... | 140 |
| 4.8.1 Extracción, amplificación y secuenciación del ADN..... | 140 |
| 4.8.2 Análisis bioinformático..... | 141 |
| 4.8.2.1 Análisis primario..... | 141 |
| 4.8.2.2 Análisis secundario..... | 143 |
| 4.8.2.3 Análisis terciario..... | 145 |
| 4.8.2.3.1 Cuantificación del alfa-diversidad..... | 145 |
| 4.8.2.3.2 Cuantificación de la beta-diversidad..... | 147 |
| 4.8.2.3.3 Análisis Principal de Componentes..... | 147 |
| 4.8.2.3.4 Test PERMANOVA..... | 148 |
| 4.8.2.3.5 Canonical Correlation Analysis..... | 149 |
| 4.8.2.4 Análisis bioinformático de la evolución por grupos bacterianos específicos..... | 149 |
| 4.8.2.4.1 Estudio de la evolución de <i>Lactobacillus</i> a lo largo del estudio en ambos grupos | 149 |
| 4.8.2.4.2 Estudio de la evolución de las especies patógenas vaginales a lo largo del estudio en ambos grupos..... | 150 |
| 4.8.2.4.3 Análisis bioinformático de la evolución por vaginotipos..... | 150 |
| 4.9 Aspectos éticos..... | 151 |
| CAPÍTULO V. RESULTADOS..... | 153 |
| 5.1 Resultados del desarrollo del estudio..... | 155 |
| 5.2 Resultados del análisis bioinformático de la evolución por grupos bacterianos específicos..... | 156 |
| 5.3. Resultados obtenidos tras comparar ambos grupos de tratamiento..... | 159 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.3.1 Resultados de la evolución de <i>Lactobacillus</i> a lo largo del estudio..... | 159 |
| 5.3.2 Resultados de la evolución de las especies patógenas vaginales a lo largo del estudio en ambos grupos..... | 161 |
| 5.3.3 Resultados del análisis bioinformático de la evolución por vaginotipos.... | 166 |
| 5.4 Resultados del estudio longitudinal de la composición de la microbiota vaginal por grupos taxonómicos..... | 169 |
| 5.4.1 Resultados a nivel de género..... | 169 |
| 5.4.1.1 Pruebas de dispersión a nivel de género..... | 169 |
| 5.4.1.2 Resultado del Análisis Principal de Componentes a nivel de género..... | 172 |
| 5.4.1.3 Resultados del Canonical Correlation Analysis a nivel de género..... | 173 |
| 5.4.1.4 Resultados del análisis con DESeq2 a nivel de género..... | 173 |
| 5.4.1.5 Heatmap a nivel de género..... | 180 |
| 5.4.2 Resultados a nivel de phylum..... | 182 |
| 5.4.2.1 Pruebas de dispersión a nivel de phylum..... | 182 |
| 5.4.2.2 Resultado del Análisis Principal de Componentes a nivel de phylum.... | 185 |
| 5.4.2.3 Resultados del Canonical Correlation Analysis a nivel de phylum..... | 186 |
| 5.4.2.4 Resultados del análisis con DESeq2 a nivel de phylum..... | 187 |
| 5.4.2.5 Heatmap a nivel de phylum..... | 191 |
| 5.4.3 Resultados a nivel de familia..... | 192 |
| 5.4.3.1 Pruebas de dispersión a nivel de familia..... | 192 |
| 5.4.3.2 Resultado del Análisis Principal de Componentes a nivel de familia..... | 195 |
| 5.4.3.3 Resultados del Canonical Correlation Analysis a nivel de familia..... | 196 |
| 5.4.3.4 Resultados del análisis con DESeq2 a nivel de familia..... | 197 |
| 5.4.3.5 Heatmap a nivel de familia..... | 201 |
| 5.4.4 Resultados a nivel de especie..... | 202 |
| 5.4.4.1 Pruebas de dispersión a nivel de especie..... | 202 |
| 5.4.4.2 Resultado del Análisis Principal de Componentes a nivel de especie..... | 205 |
| 5.4.4.3 Resultados del Canonical Correlation Analysis a nivel de especie..... | 206 |
| 5.4.4.4 Resultados del análisis con DESeq2 a nivel de especie..... | 207 |
| 5.4.4.5 Heatmap a nivel de especie..... | 210 |
| 5.4.5 Evolución de los vaginotipos como estudio longitudinal del conjunto de todas las muestras..... | 211 |
| CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN..... | 215 |
| 6.1 Microbiota vaginal y factores influyentes..... | 217 |

| | | |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 6.2 | Prevención y tratamiento de las disbiosis vaginales mediante el empleo de probióticos..... | 217 |
| 6.3 | Análisis de los resultados del estudio..... | 219 |
| 6.4 | Análisis de los posibles factores intercurrentes en los resultados obtenidos..... | 220 |
| 6.4.1 | Cepa probiótica a estudio..... | 221 |
| 6.4.2 | Evidencia a favor de las cepas de la especie <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | 222 |
| 6.4.3 | Probióticos multiespecie..... | 224 |
| 6.4.4 | Otros factores influyentes en los resultados..... | 227 |
| 6.5 | Análisis de los resultados del estudio longitudinal de la composición de la microbiota vaginal por grupos taxonómicos..... | 229 |
| 6.5.1 | Test de dispersión y Canonical Correlation Analysis..... | 229 |
| 6.5.2 | Análisis de las muestras con <i>DESeq2</i> en cada nivel taxonómico..... | 230 |
| 6.5.2.1 | Nivel taxonómico de phylum..... | 230 |
| 6.5.2.2 | Nivel taxonómico de familia..... | 230 |
| 6.5.2.3 | Nivel taxonómico de género..... | 231 |
| 6.5.2.4 | Nivel taxonómico de especie..... | 232 |
| 6.5.3 | Análisis de los vaginotipos encontrados en nuestra población..... | 233 |
| | CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES..... | 237 |
| | CAPÍTULO VIII: LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN..... | 243 |
| 8.1 | Limitaciones..... | 245 |
| 8.2 | Futuras líneas de investigación..... | 246 |
| | CAPÍTULO IX: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 249 |
| | CAPÍTULO X: ANEXOS..... | 273 |

SIGLAS Y ABREVIATURAS

Las abreviaturas se reseñan a continuación en orden alfabético. No se incluyen en esta relación las abreviaturas que figuran en los convenios de unidades, al igual que las de uso universal en estadística.

| Siglas y abreviaturas | Descripción |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| AEPCC | Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia |
| APP | Amenaza de Parto Prematuro |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool (Herramienta de búsqueda de Alineamiento Local Básico). |
| CCA | Canonical Correlation Analysis (Análisis de correlación canónica) |
| CDC | Center for Disease Control and Prevention |
| CEIm | Comité Ético de Investigación Clínica con medicamentos y productos sanitarios de los Hospitales Universitarios de Torrevieja y Vinalopó. |
| CI | Consentimiento informado |
| CIN | Cervical intraepithelial neoplasia (Lesión Intraepitelial Cervical) |
| CRD | Cuaderno de Recogida de Datos |
| DG | Diabetes Gestacional |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FIV | Fertilización In Vitro |
| TGF | Tumor Growth Factor (Factor de crecimiento tumoral) |
| TNF | Tumor Necrosis Factor (Factor de Necrosis Tumoral) |
| G-CSF | Granulocyte Colony-Stimulating Factor (Factor Estimulante de Colonias Granulocíticas) |

| | |
|----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| GMH | Konjac glucomannan hydrolysate (Glucomanano hidrolizado konjac) |
| GRAS | Generally Recognized as Safe (Generalmente reconocidos como seguros) |
| HOMA-IR | Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (Modelo homeostático para evaluar la resistencia insulínica) |
| HSIL | High grade Squamous Intraepithelial Lesion (Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto grado) |
| IC | Índice de Confianza |
| ICI | Inhibidores del punto de Control Inmunitario |
| IMV | Índice de Maduración Vaginal |
| IL | Interleuquina |
| ISAPP | International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics |
| IUSTI | International Union against Sexually Transmitted Infections |
| KOH | Hidróxido de potasio |
| LCBD | Local Contribution to Beta Diversity (Contribución local a la diversidad beta) |
| LSIL | Low grade Squamous Intraepithelial Lesion (Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo grado) |
| MCP-1 | Monocyte Chemoattractant Protein-1 (Proteína quimioatrayente de monocitos-1) |
| MID | Molecular Identifier (Identificación molecular) |
| NCBI | National Center for Biotechnology Information |
| OR | Odds Ratio |
| OUT | Operational taxonomic unit (Unidad Taxonómica Operativa) |
| SEGO | Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia |
| PC | Principal Components (Componentes Principales) |
| PCoA | Principal coordinates analysis (Análisis principal de componentes) |

| | |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------|
| PCR | Reacción en cadena de la Polimerasa |
| qPCR-RT | Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción inversa cuantitativa |
| PP | Parto Pretérmino |
| PT | Parto a Término |
| RR | Riesgo Relativo |
| TAR | Tratamiento Antirretroviral |
| UFC | Unidad Formadora de Colonias |
| VB | Vaginosis bacteriana |
| VC | Vulvovaginitis candidiásica |
| VPH | Virus del papiloma humano |
| VIH | Virus de la inmunodeficiencia humana |
| VHS | Virus Herpes Simplex |
| VO | Vía oral |
| VV | Vía vaginal |

INDICE DE FIGURAS, DE TABLAS Y DE ANEXOS

| ÍNDICE DE DE FIGURAS | Página |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| Figura 1. Clasificación filogenética de la cepa <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CECT 8800. | 48 |
| Figura 2. Variación en los vaginotipos encontrados en gestantes con un parto normal a término en el estudio de Romero R et al del 2014. | 50 |
| Figura 3. Transición entre vaginotipos y valores observados en la escala de Nugent en el estudio de Gajer P et al. | 53 |
| Figura 4. Evolución de la microbiota vaginal a lo largo de la vida. | 58 |
| Figura 5. Microbiota del tracto genital femenino. | 62 |
| Figura 6. Clue cells en VB. | 81 |
| Figura 7. Progresión de la microbiota según el estadio de la displasia cervical de acuerdo a Audirac-Chalifour A et al. | 119 |
| Figura 8. Equipo de recogida de la muestra. | 137 |
| Figura 9. Caja de tratamiento codificada e idéntica para ambos grupos de tratamiento. | 139 |
| Figura 10. Región secuenciada dentro del gen 16S ARN ribosomal | 140 |
| Figura 11. Secuencias completas de los cebadores directo (<i>forward</i>) y reverso (<i>reverse</i>) utilizados según la nomenclatura de nucleótidos estándar IUPAC empleada en la secuenciación del gen ADNr 16S bacteriano del protocolo Illumina | 141 |
| Figura 12. Esquema del diseño del estudio | 156 |
| Figura 13. <i>Curvas de Rarefacción</i> de las muestras amplificadas para la detección de bacterias. | 157 |
| Figura 14. Gráfica de barras acumulativas comparando los principales géneros detectados en las muestras con los perfiles de bacterias basadas en el 16s rARN. | 158 |
| Figura 15. Valores Delta (% tiempo final vs % tiempo inicial) del género <i>Lactobacillus</i> en los dos grupos de estudio. | 159 |
| Figura 16. Valores Delta (% tiempo final vs % tiempo inicial) de la especie <i>L. rhamnosus</i> en los dos grupos de estudio. | 160 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 17. Valores Delta (% tiempo final vs % tiempo inicial) de la especie <i>A. vaginae</i> en los dos grupos de estudio. | 162 |
| Figura 18. Valores Delta (% tiempo final vs % tiempo inicial) de la especie <i>G. vaginalis</i> en los dos grupos de estudio. | 162 |
| Figura 19. Valores Delta (% tiempo final vs % tiempo inicial) de la especie <i>S. agalactiae</i> en los dos grupos de estudio | 163 |
| Figura 20. Valores Delta (% tiempo final vs % tiempo inicial) del grupo definido como “patógeno” en los dos grupos de estudio. | 164 |
| Figura 21. Valores Delta (% tiempo final vs % tiempo inicial) en cuanto a diversidad, referido al <i>índice de Shannon</i> , en los dos grupos de estudio. | 165 |
| Figura 22. Representación de los vaginotipos encontrados en el grupo placebo, en la Visita 1 (A) y Visita 3 (B). | 167 |
| Figura 23. Representación de los vaginotipos encontrados en el grupo probiótico, en la Visita 1 (A) y Visita 3 (B). | 168 |
| Figura 24. Figuras boxplot que representan la diversidad de las muestras según las variables estudiadas. | 169 |
| Figura 25. Diagrama de cajas (boxplot) del resultado de la aplicación del <i>índice de Shannon</i> en ambos grupos de tratamiento. | 170 |
| Figura 26. Diagrama de cajas (boxplot) del resultado de la aplicación del <i>índice de Simpson</i> en ambos grupos de tratamiento. | 170 |
| Figura 27. Gráfica de barras acumulativas comparando los géneros detectados en las muestras con los perfiles de bacterias basadas en el 16S rARN en ambos grupos de tratamiento en Visita 1 y 3. | 171 |
| Figura 28. Gráfica de coordenadas principales en las que se muestra las diferencias entre las muestras y si se agrupan correctamente a nivel de género. | 172 |
| Figura 29. Gráfica que muestra el Canonical Correspondance Analysis a nivel de género. | 173 |
| Figura 30. Géneros más importantes encontrados en la comparación según el resultado del <i>RandomForest</i> | 176 |
| Figura 31. Gráfico de barras representando el valor obtenido mediante <i>RandomForest</i> que indica la magnitud de la importancia de cada género a la hora de diferenciar entre visitas. | 177 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 32. Representación de los valores de <i>FoldChange</i> obtenidos al comparar las poblaciones a nivel de género. | 178 |
| Figura 32.1. Aumento de la representación de los valores de <i>FoldChange</i> obtenidos al comparar las poblaciones a nivel de género. | 179 |
| Figura 33. Representación de los valores de <i>FoldChange</i> y conteo de secuencias obtenidas al comparar las poblaciones a nivel de género. | 180 |
| Figura 34. Heatmap a nivel de género. | 181 |
| Figura 35. Figuras boxplot que representan la diversidad de las muestras según las variables estudiadas. | 182 |
| Figura 36. Diagrama de cajas (boxplot) del resultado de la aplicación del <i>índice de Shannon</i> en ambos grupos de tratamiento a nivel de phylum. | 183 |
| Figura 37. Diagrama de cajas (boxplot) del resultado de la aplicación del <i>índice de Simpson</i> en ambos grupos de tratamiento a nivel de phylum. | 183 |
| Figura 38. Gráfica de barras acumulativas comparando los phylum detectados en las muestras con los perfiles de bacterias basadas en el 16S rARN. | 184 |
| Figura 39. Gráfica de coordenadas principales en las que se muestra las diferencias entre las muestras y si agrupan correctamente a nivel de phylum. | 185 |
| Figura 40. Gráfica que muestra el Canonical Correspondance Analysis a nivel de phylum. | 186 |
| Figura 41. Representación gráfica del valor obtenido mediante <i>RandomForest</i> que indica la magnitud de la importancia de cada phylum. | 187 |
| Figura 42. Phylums más importantes encontrados en la comparación. | 188 |
| Figura 43. Representación de los valores de <i>FoldChange</i> obtenidos al comparar las poblaciones a nivel de phylum. | 189 |
| Figura 44. Representación de los valores de <i>FoldChange</i> y conteo de secuencias obtenidas al comparar las poblaciones a nivel de phylum. | 190 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figura 45. Heatmap a nivel de phylum. | 191 |
| Figura 46. Figuras boxplot que representan la diversidad de las muestras según las variables estudiadas a nivel de familia. | 192 |
| Figura 47. Diagrama de cajas (boxplot) del resultado de la aplicación del <i>índice de Shannon</i> en ambos grupos de tratamiento a nivel de familia. | 193 |
| Figura 48. Diagrama de cajas (boxplot) del resultado de la aplicación del <i>índice de Simpson</i> en ambos grupos de tratamiento a nivel de familia. | 193 |
| Figura 49. Gráfica de barras acumulativas comparando las familias detectadas en las muestras con los perfiles de bacterias basadas en el 16S rARN en ambos grupos de tratamiento en Visita 1 y 3. | 194 |
| Figura 50. Gráfica de coordenadas principales en las que se muestra las diferencias entre las muestras y si agrupan correctamente a nivel de familia. | 195 |
| Figura 51. Gráfica que muestra el Canonical Correspondance Analysis a nivel de familia. | 196 |
| Figura 52. Representación gráfica del valor obtenido mediante <i>RandomForest</i> que indica la magnitud de la importancia de cada familia. | 197 |
| Figura 53. Familias más importantes encontradas en la comparación. | 198 |
| Figura 54. Representación de los valores de <i>FoldChange</i> obtenidos al comparar las poblaciones a nivel de familia. | 199 |
| Figura 55. Representación de los valores de <i>FoldChange</i> y conteo de secuencias obtenidos al comparar las poblaciones a nivel de familia. | 200 |
| Figura 56. Heatmap a nivel de familia. | 201 |
| Figura 57. Figuras boxplot que representan la diversidad de las muestras según las variables estudiadas a nivel de especie. | 202 |
| Figura 58. Diagrama de cajas (boxplot) del resultado de la aplicación del <i>índice de Shannon</i> en ambos grupos de tratamiento a nivel de especie. | 203 |
| Figura 59. Diagrama de cajas (boxplot) del resultado de la aplicación del <i>índice de Simpson</i> en ambos grupos de tratamiento a nivel de | 203 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| especie. | |
| Figura 60. Gráfica de barras acumulativas comparando las especies detectadas en las muestras con los perfiles de bacterias basadas en el 16S rARN. | 204 |
| Figura 61. Gráfica de coordenadas principales en las que se muestra las diferencias entre las muestras y si agrupan correctamente a nivel de especie. | 205 |
| Figura 62. Gráfica que muestra el Canonical Correspondance Analysis a nivel de especie. | 206 |
| Figura 63. Representación gráfica del valor obtenido mediante <i>RandomForest</i> que indica la magnitud de la importancia de cada especie. | 207 |
| Figura 64. Especies más importantes encontradas en la comparación. | 208 |
| Figura 65. Representación de los valores de <i>FoldChange</i> obtenidos al comparar las poblaciones a nivel de especie. | 209 |
| Figura 66. Representación de los valores de <i>FoldChange</i> y conteo de secuencias obtenidos al comparar las poblaciones a nivel de especie. | 210 |
| Figura 67. Heatmap a nivel de especie. | 211 |
| Figura 68. Vaginitipos encontrados en el conjunto de pacientes representado por colores. | 214 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Página |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Tabla 1. Transición entre vaginotipos del estudio de Gajer P et al. | 51 |
| Tabla 2. Tabla comparativa de vaginotipos por raza en el estudio de Ravel J et al y Gajer P et al. | 54 |
| Tabla 3. Factores de riesgo asociados a la sepsis por probióticos. | 76 |
| Tabla 4. Criterios diagnósticos de Amsel y escala de Nugent para el diagnóstico de la vaginosis bacteriana. | 82 |
| Tabla 5. Regímenes de tratamiento recomendados para la vaginosis bacteriana. | 83 |
| Tabla 6. Estudios con probióticos para el tratamiento de la vaginosis bacteriana. | 87 |
| Tabla 7. Regímenes de tratamiento antifúngico para vulvovaginitis candidiásica no complicada y recidivante. | 90 |
| Tabla 8. Estudios con probióticos para el tratamiento y prevención de la vaginitis candidiásica. | 93 |
| Tabla 9. Tratamientos probióticos que reportaron beneficios en el embarazo y lactancia. | 110 |
| Tabla 10. Microorganismos asociados a la presencia y eliminación del VPH y sus lesiones cervicales. | 116 |
| Tabla 11. Esquema del diseño del estudio | 136 |
| Tabla 12. P-valor de los estudios estadísticos de <i>Lactobacillus</i> y <i>L. rhamnosus</i> , entre los grupos de tratamiento probiótico vs placebo. | 160 |
| Tabla 13. P-valor de los estudios estadísticos de grupos patógenos, probiótico vs placebo. | 163 |
| Tabla 14. P-valor de los estudios estadísticos de la alfa diversidad referida al <i>índice de Shannon</i> , probiótico vs placebo. | 165 |
| Tabla 15. Resultados del test de DESeq2 a nivel de género. | 174 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Tabla 16. Recuento total de vaginotipos encontrados en la Visita 1 y en la Visita 3 de nuestro estudio. | 212 |
| Tabla 17. Transición de los vaginotipos desde la Visita 1 a la Visita 3 de nuestro estudio. | 213 |
| Tabla 18. Total de vaginotipos encontrados en la Visita 1 según la fase del ciclo en la que fue tomada la muestra. | 213 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | Página |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| Anexo 1. Hoja de información para el paciente. | 275 |
| Anexo 2. Consentimiento informado | 281 |
| Anexo 3. Procedimiento de toma de la muestra vaginal. | 283 |
| Anexo 4. Cuaderno de recogida de datos. | 285 |
| Anexo 5. Base de datos de todas las pacientes de la muestra. | 299 |
| Anexo 6. Dictámen del Comité Ético de Investigación Clínica con medicamentos y productos sanitarios de los Hospitales Universitarios de Torrevieja y Vinalopó (CEIm). | 305 |

I - INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO I - INTRODUCCIÓN

Desde hace años existe la creencia de que el cuerpo humano se encuentra habitado por diez veces más bacterias que nuestras propias células. Recientemente se ha demostrado que, a pesar de que nos encontramos superados en número, en realidad la proporción es cercana a 1:1¹. No se trata de una coincidencia que la microbiota represente el pilar de muchas de nuestras funciones orgánicas, residiendo en armonía y de forma simbiótica con nuestras células. Todos contamos con una microbiota única adquirida previamente al nacimiento y que, posteriormente, se puede modificar según nuestra genética, dieta, raza, hábitos de vida y otros factores ambientales^{2,3}.

La microbiota vaginal de las mujeres fértiles, se encuentra habitada principalmente por el género *Lactobacillus*. El descubrimiento de muchas de las especies que la conforman ha sido posible gracias a la aparición de nuevas técnicas para la secuenciación genética del ARN ribosomal 16S (16S ARNr), componente de células procariotas como las bacterias. Esta técnica permite el análisis filogenético de nuestra microbiota en toda su extensión, permitiendo detectar especies no cultivables con los medios habituales, clasificar y cuantificar miles de microorganismos al mismo tiempo.

En general, los *Lactobacillus* se encuentran en una concentración de 10^{10} - 10^{11} UFC (Unidades Formadoras de Colonia)⁴ y es uno de los géneros clave para el mantenimiento de la homeostasis del ecosistema vaginal. En los últimos años, ha surgido nueva evidencia que sugiere que el estado de la microbiota vaginal juega un papel muy importante en la persistencia y eliminación de los patógenos. En ocasiones, surgen estados de disbiosis crónica que precisan de un aporte exógeno de *Lactobacillus* mediante la administración de probióticos para recuperar el balance del ecosistema vaginal. Según la Organización Mundial de la Salud, los

probióticos son "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped".

En este trabajo desarrollaremos de forma detallada un análisis de la literatura existente sobre la microbiota del tracto genital femenino y el impacto que ejerce la ingesta de probióticos vía oral mediante un estudio de intervención, controlado con placebo, aleatorizado, doble-ciego en una población de mujeres fértiles.

II - REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO II – REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Marco histórico

En 1892 Albert Döderlein, ginecólogo alemán, descubrió la presencia de un bacilo vaginal al que le dio su apellido y describió la importancia de las bacterias productoras de ácido láctico para la microbiota vaginal⁵.

Desde principios del siglo XX se ha intentado clasificar la microbiota vaginal según el tipo de bacterias presentes. En 1921, Robert Schröder categorizó la microbiota vaginal en 3 tipos fundamentales según “grados de puridad”, y posteriormente, Otto Jirovec en 1948 la reclasifica en 6 tipos, desde normal hasta diferentes tipos de disbiosis⁵. En 2011, Ravel et al⁶ postula 5 grupos de comunidades bacterianas del I-V según las especies de *Lactobacillus* y otras bacterias presentes en el ecosistema vaginal, de la cual hablaremos más adelante.

Herman Gardner y Charles Dukes en 1955 descubren un microorganismo causante de infecciones vaginales al que denominan “*Haemophilus vaginalis*”⁷. Posteriormente, en 1980 pasa a nombrarse *Gardnerella vaginalis*⁸ y se le considera como el origen de la mayor parte de las vaginosis bacterianas (VB). Por último en 1984, Mardh et al definen esta patología como la sustitución de los *Lactobacillus* por otras bacterias que causan cambios en las secreciones vaginales⁵.

En cuanto a la microbiota intestinal, en 1908 Elie Metchnikoff, científico ruso, propuso la hipótesis de la “autointoxicación intestinal” donde el envejecimiento del ser humano se debía a la presencia de toxinas producidas por bacterias patógenas en el intestino⁹. Metchnikoff aisló una bacteria que denominó “*Bacilo Búlgaro*” debido a que pensaba que la

longevidad observada en ciudades balcánicas en ese tiempo se debía al consumo de lácteos fermentados¹⁰. Este bacilo puede corresponder con el hoy conocido como *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus* presente en muchos yogures actualmente¹⁰. Tras su muerte, su teoría de la longevidad perdió fuerza y se descubrió que dicha bacteria no colonizaba el intestino¹⁰. Alfred Nissle en 1917, descubre la cepa probiótica *Escherichia coli* Nissle 1917 aislada de heces de soldados de la Primera Guerra Mundial que no se habían visto afectados por una epidemia de shigelosis⁹. Posteriormente, se convirtió en una de las pocas cepas probióticas que no es una bacteria ácido láctica y se sigue comercializando actualmente⁹.

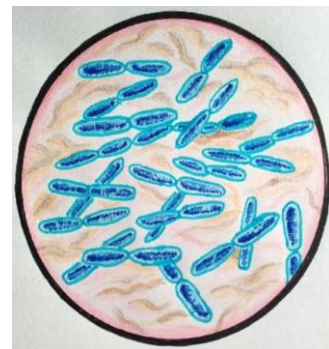
Henry Tissier del Instituto Pasteur, descubrió un *Bifidobacterium* (actualmente denominado *Bifidobacterium bifidum*) presente en las heces de un niño alimentado con leche materna con la idea de administrarlo a otros lactantes que presentaran episodios de diarrea⁹. Con la misma finalidad, Minoru Shirota, microbiólogo japonés, patentó la cepa *L. casei* Shirota, resistente a el ambiente ácido gástrico y presente actualmente en el mercado como *Yakult* desde 1935¹⁰.

En 1919 se funda la popular compañía Danone en Barcelona que actualmente vende productos que contienen *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* principalmente.

2.2 Microbiota vaginal

2.2.1 Generalidades

La microbiota vaginal de las mujeres sanas premenopáusicas normalmente está dominada por el género *Lactobacillus*, que se caracteriza por ser facultativamente anaeróbico, no formador de esporas, Gram positivo, baciliforme o cocobacilo¹¹.



Las especies predominantes de este género son *Lactobacillus crispatus* y *L. iners* principalmente, con una baja diversidad de otros microorganismos^{12,13}.

Otras especies que se encuentran con frecuencia en el entorno vaginal son *L. gasseri*, *L. jensenii* y otros relacionados con la ingesta de alimentos como *L. rhamnosus*, *L. paracasei*, *L. fermentum* y *L. plantarum*¹⁴.

2.2.2 Factores modificantes de la microbiota

La microbiota vaginal es un ecosistema complejo y su composición puede cambiar drásticamente dependiendo de diferentes factores que pueden causar un desequilibrio de su microbiota y una tendencia a la disbiosis. Dentro de los factores intrínsecos se encuentran la menstruación, embarazo, posparto, menopausia, diabetes, polimorfismos genéticos, edad y raza^{5,6}. Entre los factores extrínsecos que afectan el estado del ambiente vaginal se encuentran los anticonceptivos orales, el tabaquismo, las duchas vaginales, las relaciones sexuales recientes, la cantidad de parejas y prácticas sexuales, medicamentos como antibióticos, inmunosupresores, entre otros².

2.2.3 Nomenclatura taxonómica

La clasificación taxonómica de las bacterias en orden descendente, tomando como ejemplo la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800, se realiza como se observa en la Figura 1. La familia *Lactobacillaceae* se divide en 3 géneros: *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* y *Pediococcus*. El género *Lactobacillus*, a su vez, cuenta con 96 especies y 16 subespecies, muchas de ellas descubiertas mediante técnicas de secuenciación masiva del gen 16S ARNr¹⁴.

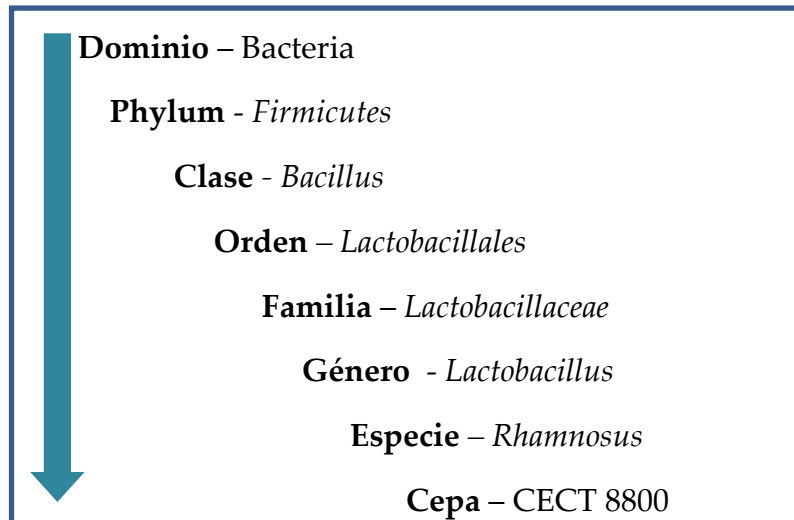


Figura 1. Clasificación filogenética de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800.

2.2.4 Comunidades bacterianas o vaginotipos

La microbiota vaginal según Ravel et al en 2011⁶, se puede clasificar en cinco tipos según su composición. Los tipos I, II, III, V están regidos por *Lactobacillus crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* y *L. jensenii* respectivamente, siendo el tipo III el más predominante en una muestra multirracial de casi 400 mujeres. El tipo IV tiene una mayor variedad de microorganismos, disminución de *Lactobacillus* y un predominio de bacterias anaerobias⁶. Además, esta última comunidad microbiana puede considerarse normal y más frecuente en la raza negra e hispana, a diferencia de lo observado en mujeres caucásicas y asiáticas⁶.

2.2.5 Variaciones en el vaginotipo a corto plazo

En cuanto a la evolución de la microbiota a corto plazo existen muy pocos estudios publicados hasta el momento, ya que la mayor parte de ellos son transversales donde se analiza una única muestra vaginal por paciente.

En general, existen varios factores que pueden generar variaciones en la composición de la microbiota y una tendencia a la disbiosis, ya comentados en el

apartado 2. Microbiota vaginal - Generalidades. Debido a que la vagina está en comunicación directa con el exterior, su microbiota es fácilmente vulnerable por agentes externos. El que estos determinantes sean suficientes para originar cambios en el vaginotipo a corto o largo plazo, es aún desconocido por la ausencia de estudios longitudinales que puedan atribuir estas variaciones del entorno vaginal a cada uno de estos factores.

En el artículo de Ravel J et al⁶, hacen referencia a cuatro teorías que pueden explicar estos cambios en la microbiota, aunque la realidad puede estar explicada por más de una de ellas:

1. Dynamic equilibrium hipótesis: La composición de la microbiota es estable en el tiempo.
2. Community space hipótesis: La composición de la microbiota varía a lo largo del tiempo por cambios hormonales, hábitos individuales, dieta, entre otros.
3. Alternative equilibrium state hipótesis: La microbiota puede variar con el tiempo pero con alternativas limitadas.
4. Community resilience hipótesis: La microbiota normalmente tiene una estructura similar y, ocasionalmente, puede cambiar a un estado transicional en respuesta a un determinado factor de forma momentánea, tendiendo a volver a su estado basal.

En el trabajo de Romero R et al del 2014¹⁵, se realizó un análisis longitudinal de la microbiota vaginal de 22 gestantes que tuvieron un parto a término normal y 32 controles no gestantes. Las muestras se analizaron empleando técnicas de secuenciación masiva del gen 16s rARN¹⁵. Se observó una mayor prevalencia de vaginotipos I y III (dominancia lactobacilar) en gestantes con únicamente un 6% de casos con vaginotipos IV (diversidad bacteriana), mientras que en las pacientes no gestantes se halló casi un 40% de vaginotipos IV¹⁵. Sin embargo, la comunidad bacteriana tipo II se encontró en solo un 4% y no existieron paciente con el tipo V¹⁵. Según estudios previos, el vaginotipo V es poco frecuente en mujeres afroamericanas, lo que podría explicar los hallazgos encontrados debido a que el 90% de las pacientes pertenecían a esta raza¹⁵.

Por otro lado, la microbiota encontrada en las gestantes demostró una mayor resistencia al cambio de comunidad bacteriana que en las no gestantes¹⁵. En los casos en los que sí existieron variaciones en la microbiota de las primeras, fue hacia otros vaginotipos con predominancia lactobacilar, y en ningún caso hacia vaginotipos IV, a diferencias de las segundas¹⁵. Debido a que las comunidades bacterianas pobres en *Lactobacillus* se han visto relacionadas con vaginosis bacterianas y otros procesos infecciosos, se piensa que esta resistencia al cambio es un mecanismo protector del embarazo¹⁵. También puede estar relacionado al estado hiperestrogénico del embarazo que aumenta la disponibilidad de glucógeno en el epitelio vaginal, fomentando la producción de ácido láctico y la caída del pH que evita la proliferación de microorganismos patógenos¹⁵. En la Figura 2 extraída del artículo de Romero R et al, se observan las pocas variaciones que existieron entre vaginotipos en mujeres gestantes a lo largo del embarazo y que finalizaron en un parto normal a término¹⁵.

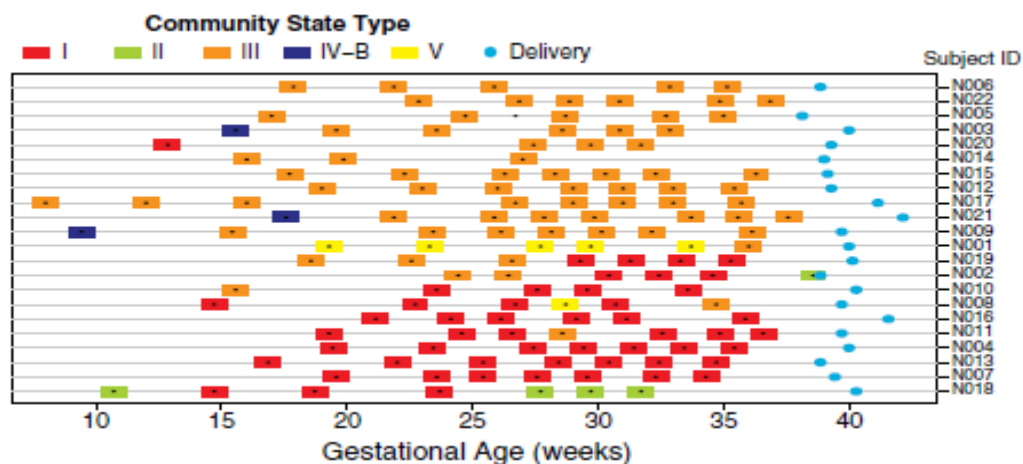


Figura 2. Variación en los vaginotipos encontrados en gestantes con un parto normal a término en el estudio de Romero R et al del 2014¹⁵.

Por último, existieron algunas especies más prevalentes en las gestantes como el *Lactobacillus vaginalis*, *L. crispatus*, *L. jensenii* y *L. gasseri*, así como una depleción de otros microorganismos asociados a las microbiotas tipo IV¹⁵. No existieron variaciones en cuanto a la prevalencia del *L. iners* entre ambos grupos

de pacientes. El vaginotipo III cuenta como especie predominante al *L. iners*, considerado como un paso intermedio hacia otras microbiotas como la tipo IV¹³, probablemente por la falta de propiedades antimicrobianas protectoras de esta especie como la carencia de producción de peróxido de hidrógeno y su coexistencia frecuente con otros patógenos².

Otro interesante estudio es el de Gajer P et al¹⁶, donde se realizó un muestreo vaginal bisemanal por 16 semanas a 32 mujeres fértiles sanas norteamericanas para realizar un estudio del gen 16s rARN. Los autores observaron una tendencia a mantener el mismo vaginotipo a lo largo del tiempo entre un 84-89% de los casos¹⁶. Cuando se observó una transición a otros vaginotipos, esta fue de muy corta duración, siendo inferiores a una semana en el 35% de los casos¹⁶. El tipo III (*L. iners*) fue el que con mayor frecuencia pasó a comunidades más diversas como las tipo IV. A su vez, la comunidad IV-A permaneció estable solo en la mitad de los casos, existiendo una menor resistencia al cambio hacia otras microbiotas como la tipo III, a la que cambió en casi un 20% de las pacientes (ver Tabla 1 y Figura 3¹⁶). Por tanto, algunas pacientes siguieron la teoría de *Alternative equilibrium state*, mientras que otras respaldaron la hipótesis de *Community resilience*^{6,16}.

| from to | I | II | III | IV,A | IV,B |
|---------|------------|-----------|------------|-----------|------------|
| I | 133 (84.2) | 0 | 12 (7.6) | 11 (7.0) | 2 (1.3) |
| II | 0 | 50 (89.3) | 2 (3.6) | 4 (7.1) | 0 |
| III | 10 (2.7) | 2 (0.5) | 314 (85.8) | 16 (4.4) | 24 (6.6) |
| IV,A | 12 (13.6) | 3 (3.4) | 17 (19.3) | 49 (55.7) | 7 (8.0) |
| IV,B | 3 (1.3) | 0 | 22 (9.3) | 4 (1.7) | 208 (87.8) |

Tabla 1. Transición entre vaginotipos del estudio de Gajer P et al¹⁶. Número total de transiciones y, entre paréntesis, la frecuencia de las mismas desde cada vaginotipo. No existieron pacientes con comunidad bacteriana tipo V en la muestra analizada. Tomado de Gajer P et al¹⁶.

En general, el más frecuente de todos los vaginotipos en este estudio fue el IV-B junto con valores altos en la escala de Nugent (ambos asociados a vaginosis), hallados en mujeres totalmente asintomáticas¹⁶. Otras, presentaron variación alta en sus vaginotipos con escalas de Nugent bajas¹⁶. Por tanto, una baja estabilidad en la composición de la microbiota no siempre implica patología y su importancia solo se puede establecer con estudios longitudinales donde se puedan asociar estos cambios a eventos adversos¹⁶.

Es importante destacar que estos cambios en el tipo de comunidad no necesariamente implican cambios en la funcionalidad de la misma ya que únicamente hace referencia a la frecuencia de las especies observadas¹⁶. En este sentido, se estudió el perfil metabólico de las muestras de 4 pacientes observando que, en ocasiones, a pesar del cambio de vaginotipo la producción de algunos productos beneficiosos como el lactato puede mantenerse debido a la existencia de otras especies generadoras de lactato como el *Streptococcus*^{6,16}.

En cuanto a los factores asociados al cambio de microbiota, se encontraron mayores variaciones durante la menstruación (aunque no siempre implicó mayor diversidad bacteriana según el *índice de Shannon*), como es el caso de los vaginotipos I y II que prácticamente solo cambiaron en ese momento¹⁶ (Figura 3). Además, la actividad sexual también mostró repercutir el estado de la microbiota vaginal de las pacientes¹⁶. Sin embargo, se encontró una mayor estabilidad durante los dos picos de estradiol observados en la fase periovulatoria y lútea, además de durante el pico de progesterona de la fase lútea según la tasa de cambio *Jensen-Shannon*¹⁶.

Otra determinante importante a tomar en cuenta es la raza. Al comparar los hallazgos de Gajer P et al¹⁶ y de Ravel J et al⁶, se observa que el vaginotipo más frecuente en mujeres de raza negra norteamericanas es el tipo IV, seguido por el tipo III. Por otro lado, la comunidad bacteriana más encontrada en la raza blanca fue la tipo I en ambos estudios (Tabla 2).

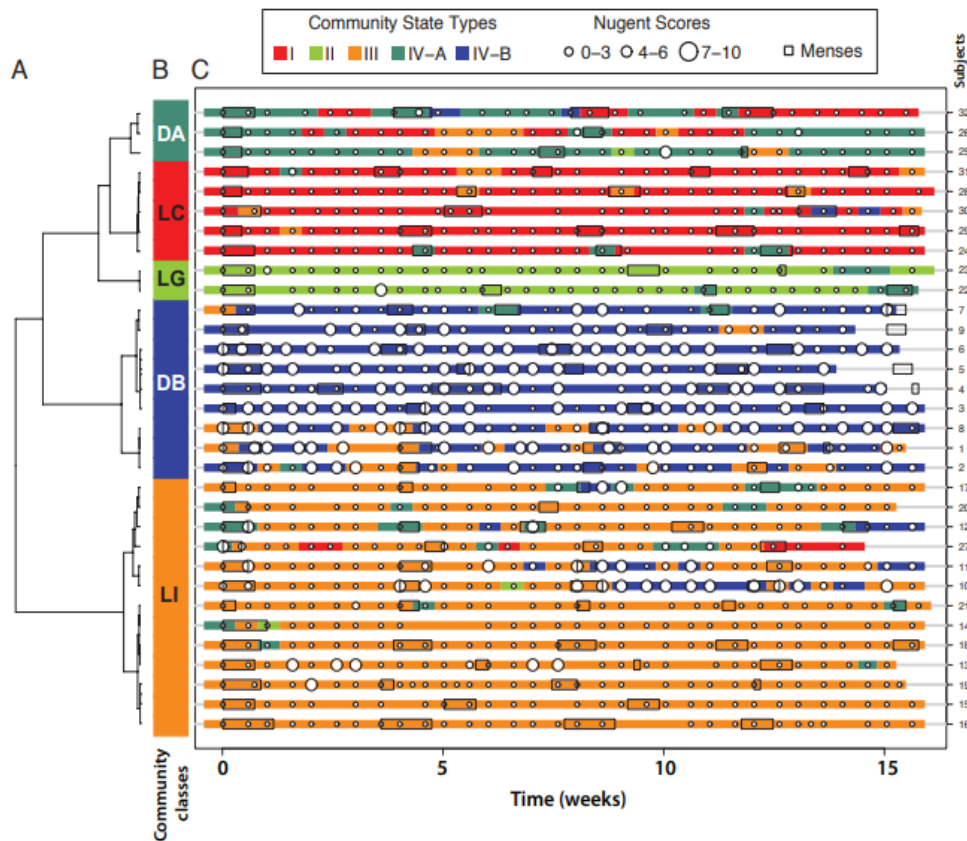


Figura 3. Transición entre vaginotipos y valores observados en la escala de Nugent en el estudio de Gajer P et al¹⁶. En la leyenda se indica por colores el vaginotipo, escala de Nugent y las menstruaciones de cada paciente. LC: *Lactobacillus crispatus* (tipo I). LG: *L. gasseri* (tipo II). LI: *Lactobacillus iners* (tipo III). DA: Grupo de diversidad bacteriana-A (tipo IV-A). DB: Grupo de diversidad bacteriana-B (tipo IV-B). Tomado de Gajer P et al¹⁶.

| Table A. Contingency table of community state types for white women in both studies. | | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|-----|----|-----|-----|---|
| Study | I | II | III | IV | V |
| Ravel et al. (4) | 44 | 8 | 26 | 10 | 9 |
| This study | 144 | 2 | 140 | 101 | 0 |

| Table B. Contingency table of community state types for Black women in both studies. | | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|----|-----|-----|---|
| Study | I | II | III | IV | V |
| Ravel et al. (4) | 23 | 5 | 33 | 42 | 1 |
| This study | 19 | 55 | 173 | 212 | 0 |

Tabla 2. Tabla comparativa de vaginotipos por raza en el estudio de Ravel J et al y Gajer P et al. Tomado del suplemento de Gajer P et al¹⁶.

Por último, los autores comentan que los estudios transversales de microbiota vaginal publicados hasta el momento pueden no reflejar de forma fehaciente la comunidad bacteriana que presenta cada paciente debido a que esta puede variar a lo largo del tiempo¹⁶.

En cuanto al análisis de variabilidad en la microbiota endometrial existen aún menos estudios publicados en la literatura. En el trabajo de Kyono K et al¹⁷, realizan un trabajo donde estudian la estabilidad de la microbiota en 7 voluntarias sanas, en 5 de las cuales la muestra (endometrial y vaginal) se tomó en distintos ciclos menstruales y diferentes fases del ciclo. Los autores concluyen que el porcentaje de *Lactobacillus* endometriales y vaginales fue muy estable dentro del mismo ciclo menstrual e incluso entre ciclos menstruales consecutivos aunque la muestra de pacientes empleada fue muy pequeña¹⁷. Por último, Moreno I et al¹⁸ analizaron la microbiota endometrial de 22 pacientes en distintas fases del mismo ciclo menstrual tomando muestras cada 5 días. Observaron estabilidad en el tipo de microbiota endometrial en 18/22 pacientes¹⁸.

2.2.6 Variaciones fisiológicas de la microbiota vaginal a lo largo de la vida

La microbiota vaginal presenta un ecosistema que se encuentra en cambio constante con una gran variabilidad fisiológica inter e intraindividual, independientemente de la edad. Los cambios observados a lo largo de la vida de la mujer se ilustran en la Figura 4.

En recién nacidos, la microbiota vaginal es similar a la adulta con un pH más ácido debido a los estrógenos maternos¹⁹. En la infancia, debido a la baja cantidad de estrógenos no se produce glucógeno que es el sustrato de las bacterias ácido lácticas. Por tanto, el pH es alcalino (pH de 7 aproximadamente) y la microbiota vaginal está compuesta de microorganismos de la piel, anaerobios entéricos estrictos y facultativos principalmente, con bajo recuento lactobacilar^{19,20}. Hill HB et al²¹, realizan un estudio en niñas de entre 3 meses-5 años en el que observan una prevalencia de microorganismos anaerobios, siendo *Prevotella* y *Peptostreptococcus* los géneros más frecuentes pero en menor concentración que en adultas con VB. Se detectaron *Lactobacillus* en solo 2 de 19 pacientes, además de microorganismos aerobios (excepto ausencia de *Gardnerella*) similares a los encontrados en mujeres adultas²¹. El pH vaginal medio fue de 6.5²¹. En el 70% de las niñas menores de 3 años se aislaron *Enterococcus* y coliformes en comparación con solo en el 22% de las mayores de dicha edad, cuya diferencia se puede atribuir al uso de pañal²¹. Myhre AK et al²², llevaron a cabo un muestreo anogenital en 99 niños y 179 niñas de 5 años de edad media tras descartar historia de abuso sexual. El 40% de los microorganismos encontrados fueron *Staphylococcus*, *Corynebacterium* y otras bacterias coreniformes relacionadas con la piel²². La especie *Streptococcus viridans* y similares fueron los siguientes agentes más prevalentes²². Solo se halló *Gardnerella vaginalis* en muestras rectales de dos niños y una niña²². Hammerschlag MR et al²⁰, estudiaron la microbiota de 25 niñas de entre 2 meses y 15 años observando *Staphylococcus epidermidis* y difteroides en el 80% de las pacientes. Además, se aisló una gran diversidad de anaerobios estrictos entre los que los géneros *Peptococcus*, *Peptoestreptococcus* y *Bacteroides* fueron los más frecuentes²⁰. El género *Lactobacillus* estuvo presente en el 40% de las pacientes²⁰.

Previamente, los estudios basados en análisis de las muestras mediante cultivo, describían la microbiota en la pubertad como pobre en *Lactobacillus*. En el 2015, Hickey RJ et al²³ realizan un estudio con 31 pacientes entre 10-12 años previo al inicio de la menarquia a las que se les tomaron muestras vulvovaginales por 1,6 años de media cada 3 meses, y a sus madres, una muestra vaginal al año. Observaron que previo a la menarquia, la microbiota vaginal es similar a la encontrada en mujeres adultas con predominancia principalmente de *Lactobacillus* y otros géneros productores de ácido láctico como *Streptococcus*²³. *Gardnerella vaginalis* fue aislada en 1/3 de las pacientes siendo una de las especies más abundantes y persistentes sin síntomas de VB. Sin embargo, el pH vaginal es superior (≥ 4.5), hecho que puede estar relacionado con una concentración lactobacilar inferior aunque sin resultados significativos²³. Otros autores atribuyen el pH más alcalino a las irregularidades menstruales presentes tras la menarquia (fases foliculares más prolongadas con ascenso tardío de estrógenos) y a la ectopia cervical¹⁹. No se observaron asociaciones con la microbiota vaginal materna²³. Por otro lado, la microbiota vulvar resultó similar a la vaginal previa a la menarquia aunque con mayor variedad de especies en la primera²³.

Con la llegada de la menopausia y el descenso de los estrógenos locales, la microbiota vaginal vuelve a ser similar a la de la infancia con disminución de la población lactobacilar, aumento en la diversidad de microorganismos y aumento del pH vaginal^{19,24}. Burton JP et al²⁵, encontraron un estado de VB o flora intermedia según escala Nugent en el 70% de una muestra de pacientes menopáusicas asintomáticas de forma persistente. Los microorganismos más frecuentes fueron *Lactobacillus* (aunque en escaso número en un 1/3 de las pacientes), *Bacteroides*, *Mobilincus*, *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli*, entre otros²⁵.

De forma contradictoria a otros ensayos realizados en la menopausia (aunque limitado por su muestra de 16 pacientes), Hummelen R et al²⁶ observaron que en algo más del 50% de las pacientes el género *Lactobacillus* representó más de la mitad de los microorganismos encontrados, principalmente *L. iners* y *L. crispatus*²⁶. Además, se encontraron pocas variaciones en la microbiota de las pacientes a lo largo de las 10 semanas de seguimiento²⁶. Por último, los autores mencionan la asociación existente entre las mujeres menopáusicas con síntomas

de sequedad genital moderada/severa y una depleción lactobacilar con mayor variedad de especies microbianas como *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Peptoniphilus* y *Bacillus*. Sin embargo, las pacientes asintomáticas o con síntomas leves de sequedad presentaron más frecuentemente una microbiota con predominancia de *Lactobacillus* con baja variedad de microorganismos²⁶. Brotman RM et al²⁷, realizaron un ensayo similar en 87 mujeres donde se observó una transición del ecosistema vaginal de estar dominado por *Lactobacillus* en más de un 80% de las mujeres premenopáusicas a un 50% en las menopáusicas, con una tendencia en la perimenopausia a vaginotipos III (*L. iners*) o IV-A (dominado por microorganismos anaerobios como *Streptococcus*, *Anaerococcus*, *Peptoniphilus* y *Prevotella*). Este último patrón microbiano fue 25 veces más frecuentemente que el tipo I (dominado por *Lactobacillus crispatus*) en aquellas que presentaron signos de atrofia genital²⁷.

En esta línea, Jaisamrarn U et al²⁸ publicaron un estudio de 87 mujeres postmenopáusicas diagnosticadas de vaginitis atróficas a las que se les administró una preparación vaginal con 0.03 mg de estriol + 10⁸ UFC de *Lactobacillus acidophilus* KS400 diariamente por 12 días vs placebo. Tras desvelar el ciego, las pacientes del grupo placebo iniciaron la preparación vaginal a estudio por 12 días, y posteriormente, todas las pacientes realizaron el tratamiento bisemanalmente/12 semanas²⁸. El Índice de Maduración Vaginal (IMV), basado en el porcentaje de células epiteliales presentes en las muestras vaginales, fue del 35% en el grupo de tratamiento vs 10% en el grupo placebo en la fase inicial y aumentó a un 55% en la fase de mantenimiento²⁸. Las pacientes con síntomas de sequedad se redujeron de forma significativa en el grupo de tratamiento²⁸. Tras la terapia inicial, la sequedad vaginal paso de un 77% al 2% y la dispareunia referida pasó del 64% al 3% al finalizar el estudio²⁸. Además, el 66,7% de las pacientes presentaron una microbiota normal (Grado Lactobacilar I) vs 2,3% al inicio del tratamiento y el pH pasó de 6,8 a 4,9²⁸.

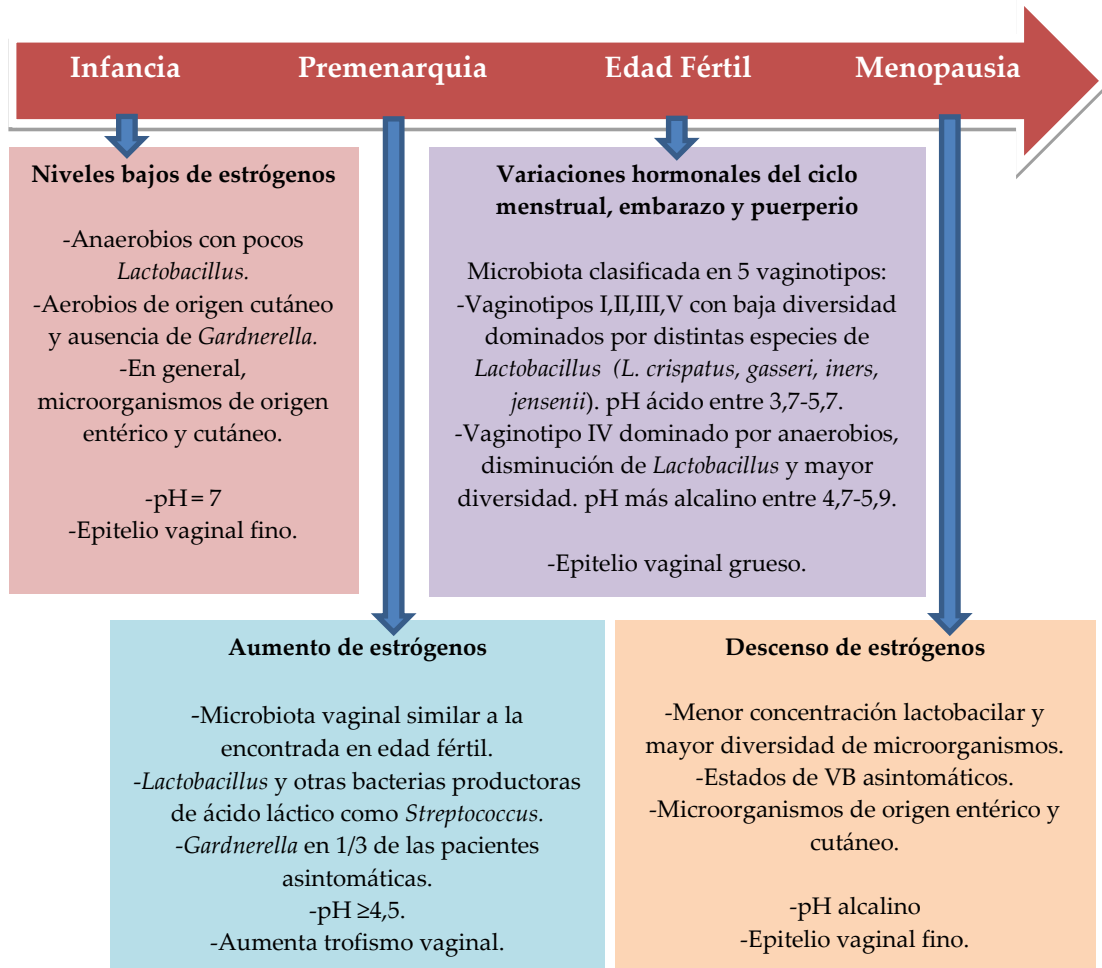


Figura 4. Evolución de la microbiota vaginal a lo largo de la vida ^{6,19,21-25}.

Petricević L et al²⁹, realizaron otro estudio en 70 mujeres postmenopáusicas con composición intermedia de su microbiota según escala Nugent (puntuación 4-6), a las que se les administró $2,5 \times 10^9$ UFC de *L. rhamnosus* GR-1 y *L. reuteri* RC-14 vs placebo diariamente/14 días. Tras finalizar el estudio, se observó una normalización de la microbiota vaginal en un 60% de las pacientes del grupo de intervención vs 16% del grupo placebo²⁹.

En general, los síntomas genitourinarios del climaterio al igual que la dominancia lactobacilar mejoran con el uso de la terapia hormonal sustitutiva asemejándose a la encontrada en población fértil²⁴. Sin embargo, muchas mujeres presentan contraindicaciones para el inicio de terapias hormonales como

antecedente de cáncer de mama, cáncer de endometrio u otros tumores hormono-dependientes, problemas cardiovasculares, tromboembolismo, entre otros. Además, la composición de la microbiota vaginal de las mujeres postmenopáusicas, aunque muchas veces se encuentren asintomáticas, puede ser un factor predisponente a infecciones recurrentes del trato genitourinario. Por tanto, representa un grupo que especialmente se beneficiaría de intervenciones terapéuticas con probióticos a largo plazo.

2.3 Microbiota del tracto genital femenino

La microbiota del tracto genital femenino presenta algunas variaciones en cuanto a las especies predominantes y concentración bacteriana debido a las características específicas de cada medio (Figura 5). Se revisaron tres estudios en los que se realiza un análisis integral de la microbiota en todo el tracto genital de mujeres sometidas a histerectomía por causa benigna. Mitchell CM et al en 2015³⁰, realizaron un muestreo de vagina, y posteriormente, de endocérvix y endometrio directamente de la pieza quirúrgica en 58 pacientes (14% menopáusicas). Los microorganismos predominantes en las 3 muestras fueron *Lactobacillus iners*, *L. crispatus* y *Prevotella*. La vagina mostró una mayor concentración bacteriana y continuidad de algunas de sus especies en el tracto genital superior después de desaparecer de la vagina y sin causar inflamación local³⁰. Las pacientes de raza afroamericana e hispana presentaron con mayor frecuencia una microbiota endometrial y endocervical no dominada por *Lactobacillus* en comparación con las de raza blanca (83% y 75% vs 54% respectivamente)³⁰. Estos hallazgos no se correlacionaron completamente con la incidencia de VB en estos grupos de pacientes, ya que se encontró en 17% de las mujeres de raza negra, 0% en hispánicas y 11% en las de raza blanca³⁰. Otras de las especies aisladas fueron *Gardnerella vaginalis* y *Atopobium vaginae* en 19 y 10% de los casos respectivamente³⁰.

Se encontraron resultados similares en el trabajo de Chen C et al⁴, en el cual se tomaron muestras de vagina, endocérvix, endometrio, trompas y peritoneo en 110 mujeres fértiles sin antecedentes de infecciones genitales sometidas a histerectomía. Las muestras vaginales evidenciaron un predominio de especies que sobreviven en condiciones ácidas como *L. crispatus* y *L. iners* con

mayor concentración bacteriana y menor diversidad⁴. Sin embargo, la población latobacilar fue disminuyendo progresivamente en el resto del tracto genital, con una mayor variedad de microorganismos típicos de entornos más alcalinos como *Acinetobacteria*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria* pero a una concentración más baja. Las especies encontradas en el endocervix fueron similares a la microbiota endometrial y peritoneal de cada paciente, por lo que pueden inferirse a través del estudio del primero de manera poco invasiva⁴. En el endometrio se aislaron frecuentemente los géneros *Pseudomonas*, *Vagococcus*, *Sphingobium* y *Acinetobacter*⁴. De forma típica, se encontraron *Pseudomonas*, *Erysipelothrix* y *Facklamia* en las trompas de Falopio⁴. En el líquido peritoneal, la microbiota es muy variada con mayor concentración de *Sphingobium*, *Pseudomonas*, *Vagococcus* *Morganella* y carencia de *Lactobacillus*⁴. Además, los autores señalaron que existe una correlación entre las muestras endometriales transcervicales y las tomadas directamente del endometrio en la pieza de histerectomía, por lo que la vía transcervical es fiable para el estudio de esta microbiota⁴.

Finalmente, Miles SM et al³¹ publican un estudio donde tomaron muestras vaginales a 10 mujeres pre y postmenopáusicas, y en pieza quirúrgica, muestras de endocervix, endometrio, trompas y ovarios. Se observó el phylum *Firmicutes* y género *Lactobacillus* como los más frecuentes en más de la mitad de los casos a lo largo del tracto genital, pero se encontró una mayor variedad en términos de especie entre áreas³¹. En vagina se aislaron *Lactobacillus iners*, *L. helveticus* y *L. reuteri* principalmente en las pacientes premenopáusicas, mientras que en las menopáusicas fueron más frecuentes los géneros *Streptococcus* y *Prevotella*³¹. A nivel cervical, los géneros encontrados con mayor frecuencia fueron *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Acinetobacter* y *Corynebacterium*³¹. Las especies del resto de áreas fueron más heterogéneas sin encontrarse un patrón típico por área³¹.

La metodología de estos tres estudios permite el muestreo directo de cada zona del tracto genital sin posibilidad de contaminación con los microorganismos de otras áreas, demostrando que la cavidad endometrial no es estéril y que una concentración baja de microorganismos es normal para esta zona. Entre las limitaciones de estos diseños se encuentran las muestras pequeñas de pacientes, la necesidad de antibioterapia durante la cirugía y la presencia de patología

benigna en todas las pacientes que, como señalan Chen C et al⁴, puede variar la microbiota encontrada.

En el estudio de Kyoto K et al, también observaron una correlación entre la microbiota vaginal y endometrial, ya que todas las pacientes que contaban con una microbiota sin predominancia lactobacilar a nivel vaginal, también la presentaban a nivel endometrial¹⁷. Tanto en este estudio como en el de Moreno I et al¹⁸, solo se encontraron alrededor de 20-25% de casos con variaciones importantes entre ambas microbiotas. Por otro lado, se observó un ecosistema endometrial y vaginal constante en 5 pacientes sanas a lo largo de un ciclo y en distintos ciclos menstruales¹⁷.

Por último, en el ovario existe una microbiota muy variada, siendo *Firmicutes*, *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* los reinos bacterianos más frecuentes^{32,33}. Entre los géneros más aislados se encuentran *Lactococcus*³², *Acinetobacteria*, *Morganella*, *Brevundimonas* y *Campylobacter*³³.

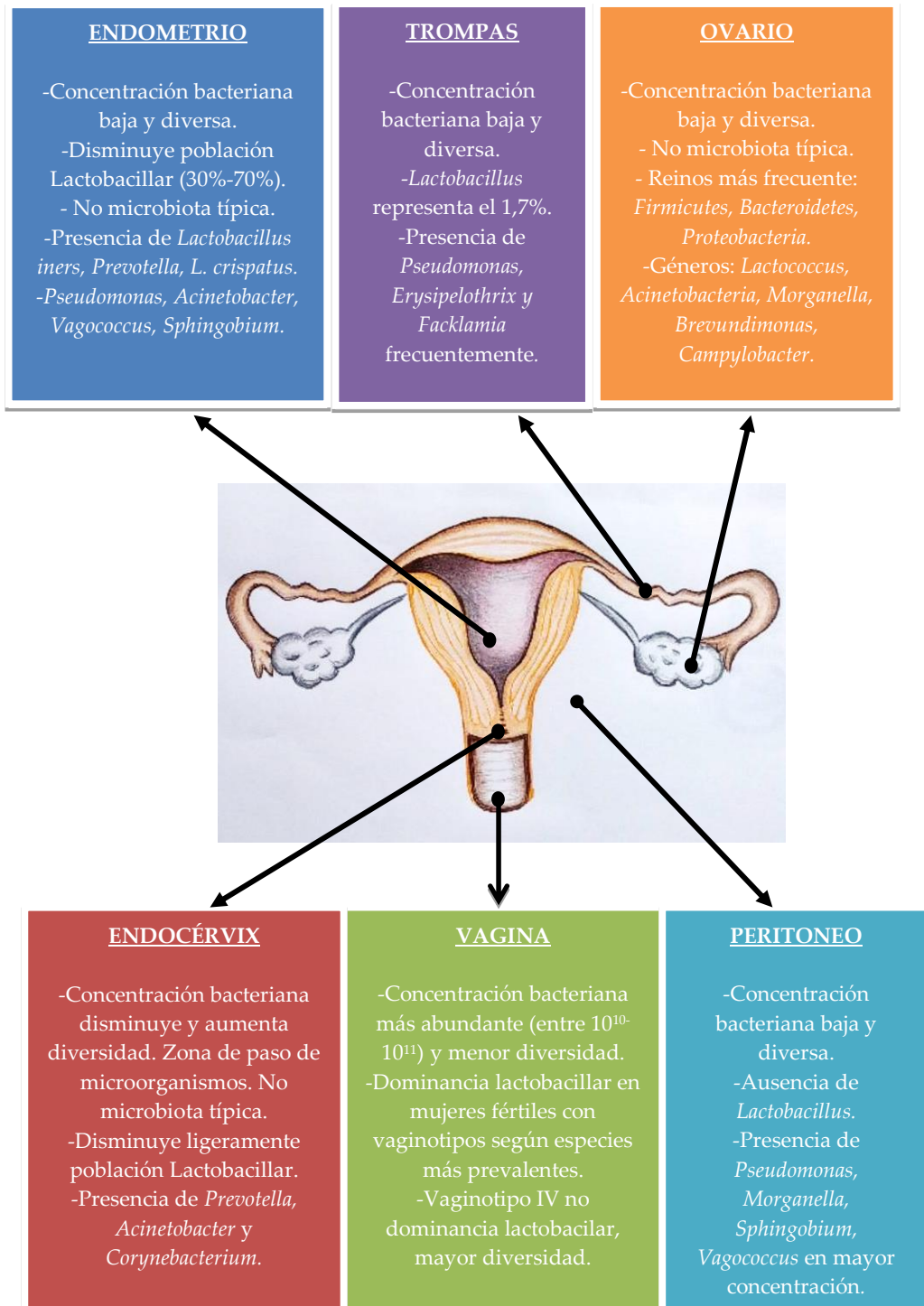


Figura 5. Microbiota del tracto genital femenino.

2.4 Mecanismos de defensa de los *Lactobacillus*

Los *Lactobacillus* vaginales tienen varias herramientas para proteger su entorno de los patógenos, las cuales se enumeran a continuación:

- ✓ Producción de compuestos antimicrobianos como las bacteriocinas que inhiben la multiplicación bacteriana y promueven su destrucción³⁴.
- ✓ Síntesis de biosurfactantes que dificultan la unión bacteriana y la generación de biopelículas³⁵.
- ✓ Co-agregación con microorganismos patógenos para evitar su adhesión al epitelio vaginal y eliminarlos con proteínas microbiocidas³⁶.
- ✓ Protección del epitelio vaginal. La depleción lactobacilar y el aumento de la diversidad bacteriana alteran la pared vaginal y la síntesis de la capa protectora mucina³⁷.
- ✓ Mecanismo específico de adhesión al epitelio vaginal, el cual es especie-dependiente y desempeña un papel clave para la colonización del entorno vaginal y el bloqueo del asentamiento de los patógenos³⁶. Algunas cepas de *Lactobacillus rhamnosus* han demostrado su adherencia al epitelio cervicovaginal como *L. rhamnosus* Lcr35³⁸ y GR-1³⁹.
- ✓ Síntesis de ácido láctico mediante la fermentación del glucógeno presente en el epitelio vaginal expuesto a estrógenos, generando así un pH ácido y aumentando la viscosidad del flujo vaginal. Esto dificulta el crecimiento de microorganismos nocivos y evita la propagación de diferentes virus, como el *Virus del Papiloma Humano* (VPH)⁴⁰.
- ✓ Propiedades citotóxicas contra las células malignas cervicales según lo evidenciado en dos estudios in vitro^{41,42}.

- ✓ Producción de peróxido de hidrógeno por algunas especies de *Lactobacillus*, la cual representa un factor protector contra bacterias y virus patógenos^{43,44}. Sin embargo, algunos estudios encontraron *Lactobacillus* productores de peróxido de hidrógeno presentes en la microbiota de pacientes sanas y en aquellas con disbiosis⁴⁵, que podría estar en relación con la cantidad de peróxido de hidrógeno generada que varía entre especies⁴³. Las especies identificadas con una mayor producción de peróxido de hidrógeno son *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii* y *L. vaginalis*, especialmente las dos últimas^{43,46}. Antonio MA et al⁴⁶, presentaron un artículo donde había una asociación entre el hallazgo en muestras vaginales y rectales de *L. crispatus*, *L. jensenii* u otros *Lactobacillus* liberadores de peróxido de hidrógeno y una menor incidencia de VB (5% si aislamiento de las cepas en ambas muestras, 20% solo en vagina, 47% solo en muestras rectales y 70% de vaginosis en mujeres no colonizadas por especies productoras de peróxido de hidrógeno en ninguno de los sitios).
- ✓ Los *Lactobacillus* disputan con los microorganismos patógenos por los nutrientes disponibles en el entorno vaginal⁴⁷.

Dentro de las proteínas producidas por los *Lactobacillus*, algunas presentan una eficacia superior a otras contra los patógenos. En esta línea, Sgibnev A et al⁴⁸ presentaron un estudio in vitro donde se evaluó la eficacia de las sustancias liberadas por los *Lactobacillus* como ayudantes de los antibióticos. Para ello, se expusieron diversos microorganismos causantes de disbiosis vaginal (*Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Klebsiella* y *Streptococcus*) a peróxido de hidrógeno, ácido láctico y surfactante producido por *L. casei rhamnosus* Lcr35 y otras 24 especies de *Lactobacillus* aisladas de muestras vaginales⁴⁸. A pesar de que los 3 metabolitos fueron capaces de sensibilizar a estos microorganismos oportunistas ante los antimicrobianos reduciendo su concentración mínima inhibitoria, el peróxido de hidrógeno y/o surfactante resultaron más eficaces⁴⁸. El ácido láctico resultó menos efectivo aunque se debe tomar en cuenta que las concentraciones empleadas del mismo fueron menores a las existentes de manera habitual en el entorno vaginal⁴⁸.

De cualquier forma, a través de todos estos mecanismos de defensa, estas bacterias ácido lácticas inhiben el crecimiento de patógenos y logran un equilibrio en la microbiota vaginal. Cuando su población disminuye, aumenta la incidencia de VB, una condición que si es recurrente, crea un ambiente de inflamación persistente que favorece a diferentes patógenos y que podría promover la carcinogénesis⁴⁹.

Rousseau V et al⁴⁷, realizaron un estudio in vitro donde se comprueba la eficacia de algunas especies contra distintos patógenos. Los autores lograron extraer 17 cepas de *Lactobacillus* de muestras vaginales, de los cuales seleccionaron a *L. vaginalis* BLL 9901, *L. crispatus* BLL 2008 y *L. jensenii* BLL 2108 por sus propiedades antagónicas frente a patógenos como producción de ácido láctico, peróxido de hidrógeno, competición por sustratos como arginina (únicamente BLL 2108), habilidad para colonizar el epitelio vaginal, entre otras. Todas las cepas presentaron antagonismo contra *Escherichia coli* (CIP 548T), *Neisseria gonorrhoeae*, *Prevotella intermedia* (CIP 103607T), *Gardnerella vaginalis* (CIP 7074T), *Corynebacterium seminale* y *Peptostreptococcus anaerobius* (AIP 10102T)⁴⁷. Debido a que *Candida albicans* suele ser resistente al pH ácido y al peróxido de hidrógeno que generan muchos *Lactobacillus*, solo *L. jensenii* BLL 2108 presentó una oposición importante a frente a este patógeno⁴⁷.

2.5 Probióticos

2.5.1 Definición y generalidades

Los probióticos son una herramienta fácil y viable para restablecer el equilibrio en la microbiota vaginal. Según la Organización Mundial de la Salud, los probióticos son "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped". Actualmente los probióticos representan un mercado multimillonario con expectativas de crecimiento de 65 billones de dólares para el 2024 según un estudio de Global Market Insights⁵⁰.

Son muchas las especies que se han usado como probióticos para diferentes indicaciones, las cuales se mencionaran de forma detallada en cada uno de los apartados correspondientes. Entre los géneros más frecuentemente

utilizados en probióticos se encuentran *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. También se emplean hongos como *Saccharomyces boulardii*⁵¹.

La palabra probiótico hace referencia a⁵¹:

- ✓ Alimentos probióticos: suplementos dietéticos, ingredientes alimentarios y comestibles en general). No necesitan la aprobación de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) antes de su comercialización.
- ✓ Fármacos probióticos: administrados con el objetivo de tratar o evitar una enfermedad en concreto. Debido a que son catalogados como fármacos, deben estar suscritos a la FDA como nuevo fármaco en investigación previo a su estudio en humanos.
- ✓ Microorganismos administrados directamente para uso animal.
- ✓ Probióticos genéticamente modificados.

Entre los requisitos que un producto debe tener para considerarse probiótico podemos mencionar^{9,51}:

- ✓ Bacterias u hongos.
- ✓ Género, especie y cepa de acuerdo a la nomenclatura actual utilizando métodos de ADN, además de las UFC que contiene.
- ✓ Microorganismos vivos (aunque pueden perder viabilidad tras su administración).
- ✓ Inocuos para la indicación terapéutica para la que fueron creados.

Además, todo producto probiótico debe contener información correspondiente a las indicaciones terapéuticas, almacenamiento, posología e información de contacto del fabricante^{9,51}. Los probióticos deben estar correctamente almacenados, al igual que no deben ser ingeridos con líquidos calientes para conservar la viabilidad de las cepas y no disminuir su efecto terapéutico. En general, las especies formadoras de esporas presentan una mayor resistencia ambiental⁹.

2.5.2 Beneficios de los probióticos

La administración de probióticos es una herramienta viable, fácil y segura que cuenta con los siguientes beneficios:

- ✓ Potenciar el efecto de los antimicrobianos mediante su administración conjunta⁵² actuando como “asistentes de los antibióticos”⁴⁸ o pautarlos tras ellos para restablecer el ecosistema vaginal normal⁵³⁻⁵⁵.
- ✓ Representan una alternativa a los antimicrobianos y podrían resultar, en ocasiones, más efectivos⁵⁶.
- ✓ Para el tratamiento de la VB se suele emplear metronidazol, clindamicina, tinidazol, entre otros que se pueden asociar a reacciones alérgicas y efectos adversos como molestias gastrointestinales y candidiasis. El metronidazol también puede causar sabor metálico y efecto antabus con la ingesta de bebidas alcohólicas. Además, los antibióticos podrían ser efectivos a corto plazo, pero podrían alterar la microbiota intestinal y vaginal a largo plazo.
- ✓ Desempeñan un papel muy importante en la prevención de recurrencias, muy frecuentes en algunas mujeres y que puede alcanzar hasta el 80%⁵⁷. Esto se debe principalmente a bacterias resistentes a antibióticos y a la capacidad de generar biopelículas que se adhieren a las paredes vaginales⁵. Estos nichos bacterianos evitan la correcta penetración del tratamiento y están compuestos principalmente por *Garnerella vaginalis* y *Atopobium vaginae*⁵.
- ✓ El uso de probióticos como tratamiento y prevención de la disbiosis vaginal evita la creación de resistencias debido al mal uso de antibióticos, algo común con los tratamientos profilácticos prolongados con antimicrobianos.

- ✓ También se han empleado para la optimización de la microbiota de neovaginas en mujeres transexuales. Esta microbiota suele contar con concentraciones lactobacilares muy bajas y una compleja mezcla de especies anaerobias y aerobias⁵⁸. Kaufmann U et al⁵⁸, realizó un ensayo que consistió en la administración de *L. crispatus* LbV88, *L. rhamnosus* LbV96, *L. jensenii* LbV116 y *L. gasseri* LbV150N (0,2-1 x10⁹ de cada cepa/ 7 días) vs placebo⁵⁸. Tras el análisis de las muestras vaginales mediante examen microscópico, cultivo y detección del ADN bacteriano, se observó una mejoría en la escala Nugent en el 48% de las integrantes del grupo probiótico vs 14% del grupo placebo de forma estadísticamente significativa (p<0,006)⁵⁸. Además se detectó un aumento de *Lactobacillus* de 1x10⁴ UFC en el primero vs 1,6x10³ UFC en el segundo grupo (p<0,0001)⁵⁸.
- ✓ La mayoría de las especies de probióticas se consideran como tratamientos generalmente seguros (GRAS) por la FDA.

2.5.3 Vía de administración y formulaciones farmacéuticas

En el mercado actual, existen formulaciones farmacéuticas con diferentes cepas de *Lactobacillus* que administradas por vía vaginal u oral optimizan el estado de la microbiota vaginal.

2.5.3.1 Vía vaginal

La ruta vaginal se ha utilizado de manera clásica para administrar exógenamente bacterias como *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*. Entre los beneficios de esta ruta podemos mencionar:

- ✓ El tratamiento se administra directamente en el sitio diana de acción.
- ✓ Garantía de que la concentración inicial de microorganismos viables administrados ejercen su función en el sitio deseado y no se ve afectada por las secreciones gástricas ni el tránsito intestinal.
- ✓ En general, se precisan pautas de tratamientos más cortos.

- ✓ No causan las molestias gastrointestinales asociadas al empleo de probióticos orales.
- ✓ Cuenta con muy pocas contraindicaciones e interacciones medicamentosas debido a su efecto local.

Existen diversas formulaciones farmacéuticas como geles, óvulos vaginales, y recientemente, ha surgido la posibilidad de proporcionar este tratamiento mediante un anillo vaginal. Gunawardana M et al⁵⁹, desarrollaron un dispositivo vaginal de liberación controlada de $1,1 \times 10^7$ - 14×10^7 / día de *Lactobacillus gasseri* ATCC 33323 por 21 días. Según lo observado en este estudio in vitro, a diferencia de otros dispositivos con antimicrobianos disponibles en la actualidad, este es capaz de liberar microorganismos viables⁵⁹. Esto representa una atractiva estrategia para la liberación controlada a largo plazo de *Lactobacillus* evitando la manipulación vaginal repetida y mejorando la adherencia al tratamiento⁵⁹.

2.5.3.2 Vía oral

Desde las últimas dos décadas, han surgido nuevos estudios con el objetivo de estudiar la aplicación de probióticos orales como una opción natural para tratar y prevenir infecciones vaginales. La base de la administración oral está fundada en la propiedad que tienen los microorganismos de migrar de un sistema a otro por su relación anatómica estrecha, tanto para patógenos como comensales. Según la evidencia actual disponible, el recto actúa como una fuente de *Lactobacillus* que tiene la capacidad de colonizar la vagina. En el estudio presentado por Strus M et al en el 2012⁶⁰, se observa la presencia en recto y vagina de las especies *Lactobacillus fermentum* 57A, *Lactobacillus plantarum* 57B y *Lactobacillus gasseri* 57C tras su administración oral (1×10^8 UFC en total / día). En un segundo estudio realizado por El Aila et al en 2009⁶¹, analizaron muestras rectales y vaginales de 132 mujeres embarazadas y, dentro de las especies aisladas, el 44% estaban presentes en ambas muestras. Las especies de *Lactobacillus* más comúnmente detectadas fueron *L. crispatus*, *L. jensennii* y *L. gasseri*, dentro de las que casi el 70% de las presentes en ambos nichos tenían el mismo genotipo⁶¹. Por tanto, se puede deducir que existe un tránsito constante de

microorganismos entre el aparato digestivo y el genital, lo que valida esta vía de tratamiento.

Además, la administración vía oral de *Lactobacillus* tiene una serie de ventajas importantes que se enumeran a continuación:

- ✓ Evitar la manipulación vaginal, que puede ser incómoda para mujeres mayores.
- ✓ Se cree que a través de esta ruta se puede controlar el paso de microorganismos patógenos desde el recto a la vagina⁶².
- ✓ El efecto alcanzado con los probióticos administrados vía oral es sistémico, por lo que se obtienen beneficios a todos los niveles. Recientemente, se han empleado en:
 - Gastrointestinal (diarrea, encefalopatía hepática, colitis ulcerosa, síndrome de intestino irritable, enterocolitis necrotizante, entre otros)^{9,63}.
 - Piel (tratamiento con formulaciones orales o tópicas de dermatitis atópica, acné, psoriasis, entre otros)^{64,65}.
 - Cardiovascular (control de factores de riesgo cardiovasculares como dislipemias, control metabólico, hipertensión arterial, entre otros)⁶⁶⁻⁶⁸.
 - Cavidad oral (disminución de patógenos en la cavidad oral)⁶⁹.
 - Enfermedades neurológicas (síndrome de fatiga crónica, ansiedad, estrés, depresión, autismo, trastorno obsesivo compulsivo, memoria, entre otros)⁷⁰.
 - Sistema genitourinario (infección del tracto urinario, VB, vulvovaginitis candidiásica (VC), tricomoniasis, VPH, entre otros).
- ✓ Modulación de nuestro sistema inmune al inducir la migración de macrófagos y mejorar su actividad de presentación de antígeno a las células B, contrarrestando la falta de respuesta inmune observada en la VB que podría perpetuar la presencia de los patógenos⁹. Además, ayudan a la adaptación del huésped a los antígenos alimentarios y la modulación de

las citoquinas⁹. Muchas especies probióticas han demostrado su potencial antiinflamatorio extraintestinal como *L. rhamnosus* GG y GR-1⁷¹. Estas inducen a los macrófagos para la liberación del factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF) que tiene la capacidad de inhibir el factor de necrosis tumoral (TNF), liberado por algunas bacterias y macrófagos, así como la disminución de las citoquinas proinflamatorias⁷¹.

2.5.4 Tiempo de administración y persistencia de las cepas

La persistencia de las cepas administradas así como el impacto en la microbiota del huésped dura poco después del fin de su administración, por lo que en general se precisan tratamientos prolongados⁵¹. Hay pocos estudios que estudien la permanencia de las cepas tiempo después de su administración y la duración del tratamiento varía según la especie y ruta de entrada. Reid G et al⁷² en el 2000, administraron *L. rhamnosus* GR-1 y *L. fermentum* RC-14 (1×10^9) vía oral / 2 semanas, aislándose dichas cepas en vagina desde la primera semana. Además en tres pacientes se estudió la presencia de las cepas en la semana 8 y 12 de seguimiento con resultados positivos. El mismo equipo en el 2001⁷³, observaron la persistencia de una microbiota vaginal normal en el 90% de las pacientes dos semanas tras la finalización de un mes de tratamiento con las mismas cepas vía oral en comparación con el grupo control. Vujic et al⁷⁴, emplea también GR-1 y RC-14 ($>1 \times 10^9$ UFC) vía oral/ 12h/ 6 semanas, encontrando una normalización de la microbiota vaginal en $>60\%$ de las pacientes al finalizar el tratamiento, efecto que se mantuvo en $>50\%$ de las pacientes a las 12 semanas de seguimiento. En resumen, las cepas *L. rhamnosus* GR-1 y *L. fermentum* RC-14 (1×10^9) administradas vía oral son eficaces con tratamientos de 2 semanas o más y pueden persistir en vagina entre 6-12 semanas después, dependiendo de la pauta.

Mezzasalma V et al⁷⁵, administraron dos combinaciones probióticas vía oral, consistentes en: Grupo 1, *L. rhamnosus* PBS070, *L. plantarum* PBS067, *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis* PBS075; Grupo 2, *L. acidophilus* PBS066, *L. reuteri* PBS072 (todas las cepas a 5×10^9 UFC/día/2 semanas). Estas cepas se detectaron en vagina desde la primera semana de tratamiento (con excepción de *L. plantarum* PBS067 que precisó de dos semanas de tratamiento para su

aislamiento en vagina de forma significativa) y una semana después de finalizar el estudio⁷⁵. Sin embargo, este ensayo fue realizado entre ciclos menstruales por lo que los autores presentan la duda de si las cepas pueden persistir tras la menstruación⁷⁵.

En cuanto al estudio de Strus et al⁶⁰ mencionado previamente, se administraron vía oral las cepas *Lactobacillus fermentum* 57A, *Lactobacillus plantarum* 57B y *Lactobacillus gasseri* 57C, detectándose en vagina/recto a partir de la semana 3 de su administración y precisaron de una semana más de tratamiento para observar mejorías en la escala de Nugent. En este caso, bien sea por la dosis (1×10^8 UFC en total/día) o por las cepas empleadas, se requieren muchos días para alcanzar el efecto terapéutico deseado, por lo que no parece rentable su empleo.

Cabe destacar el estudio de Kaufmann U et al⁵⁸, ya que es uno de los pocos estudios realizados sobre el efecto de los probióticos orales en la microbiota de neovaginas de mujeres transexuales. Los autores administraron *L. crispatus* LbV88, *L. rhamnosus* LbV96, *L. jensenii* LbV116 y *L. gasseri* LbV150N ($0,2-1 \times 10^9$ de cada cepa/ 7 días) con resultados significativos al finalizar el tratamiento⁵⁸. A pesar de que en la muestra tomada dos semanas después no existieron diferencias con el grupo placebo, se concluye que con una pauta de tratamiento muy corta se puede aportar exógenamente *Lactobacillus* a esta población para prevenir infecciones⁵⁸.

En cuanto a la vía vaginal, en el estudio de Parent D et al⁷⁶ se emplea un régimen de administración muy corto (*Lactobacillus acidophilus* 10^7 UFC + 0.03mg de estriol + 600mg de lactosa/ 12-24h/ 6 días), en el que los efectos del probiótico persisten en más del 80% de las pacientes tres semanas después. Ehrström S et al⁷⁷ emplearon cápsulas vaginales con *Lactobacillus gasseri* LN40, *L. fermentum* LN99, *L. casei subespecie rhamnosus* LN113 y *Pedicococcus acidilactici* LN23 (10^8-10^{10} UFC en total/12h/5 días) vs placebo tras el antimicrobiano⁷⁷. Existieron tasas de curación elevadas con persistencia de al menos una de las cepas tras la primera menstruación en el 53% y, 6 meses después, aún fueron detectadas en el 9% de estas pacientes⁷⁷. En general, la cepa más persistente fue LN40, y en segundo y tercer lugar, LN99 y LN113 respectivamente⁷⁷. Este estudio demuestra la eficacia

y el potencial de permanencia de estas cepas en vagina hasta 6 meses con un tratamiento corto de 5 días vía vaginal.

Sin embargo, la cepa administrada en el estudio de De Seta F et al⁷⁸, no resultó tan efectiva. Los autores emplearon *L. plantarum* P17630 vía vaginal (1×10^8 /día/6 días y semanalmente/4 semanas). Al cabo de uno y dos meses no se observaron diferencias en relación con el grupo placebo. A los tres meses, se encontró un aumento de la población lactobacilar vaginal en 80% de las pacientes, pero solo una tendencia al beneficio en cuanto a la disminución de recurrencias de VC en comparación con el grupo placebo (12,5% vs 2,5%, $p < 0,095$)⁷⁸.

2.5.5 Dosificación

No existe una dosis mínima recomendada ya que varía ampliamente dependiendo de la cepa y la vía de administración por lo que la dosificación debe basarse en ensayos clínicos en humanos con buenos resultados. En cuanto a la vía oral, Bohdot JM et al publicaron un artículo en el que se administraron cápsulas orales de *L. casei rhamnosus* LCR35 1×10^8 (Grupo A) o 2×10^8 UFC (Grupo B)/ día durante un mes a mujeres fértiles sanas. Observaron que en el 10% del Grupo A frente al 40% del Grupo B tenían presente la cepa administrada en vagina⁷⁹. Reid G et al⁷³, ejecutaron otro estudio en mujeres sanas en las que se pautó el probiótico oral *L. rhamnosus* GR-1 y *L. fermentum* RC-14 durante un mes, donde el Grupo A contaba con 8×10^8 UFC/día de ambos, Grupo B con $1,6 \times 10^9$ UFC/día, Grupo C 6×10^9 , mientras que el Grupo D (control) recibió 1×10^{10} de *Lactobacillus rhamnosus* GG. Tras finalizar el tratamiento, se compararon las muestras vaginales con las basales de cada grupo mediante escala Nugent⁷³. Tanto el Grupo A como el C no mostraron cambios significativos ($p=0,611$ y $p=0,147$), mientras que el Grupo B sí mostró una mejoría significativa, pasando de 50% a 90% de muestras con microbiota normal ($p=0,017$)⁷³. El Grupo D no reportó ningún beneficio. Se concluye que es necesario más de 8×10^8 UFC/dosis de GR-1 y RC-14 cuando se administran vía oral para la normalización de la microbiota vaginal⁷³.

Es importante tener en cuenta que estos resultados no se pueden extrapolar a otras cepas u otras vías de administración debido a las propiedades inherentes de cada especie.

2.5.6 Aspectos legales

La mayoría de los probióticos se encuentran a la venta como suplementos dietéticos o ingredientes alimentarios que ofrecen beneficios para la salud en la población sana y que no están sujetos a evaluación por la FDA⁵¹. Por tanto, no se encuentran autorizados para su uso como prevención o tratamiento de una enfermedad, como es el caso de los fármacos probióticos⁵¹.

Existen muchos casos de incumplimiento del producto comercializado conforme a su etiquetado, normalmente en relación a la concentración y al tipo de microorganismo que contienen^{9,51}. Más no siempre es mejor. Los pacientes tienden a centrar su selección de probióticos en el número y concentración de especies presentes cuando, a menudo, la interacción entre estas especies no se ha estudiado antes de la comercialización del producto. Por tanto, las cepas deben seleccionarse cuidadosamente de acuerdo con las propiedades que proporcionan para un objetivo específico.

2.5.7 Seguridad de los probióticos

En general, los probióticos contienen especies seguras catalogadas como GRAS por la FDA. La ingesta de formulaciones probióticas con *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* presentan un riesgo infeccioso similar al de nuestras propias bacterias, por lo que aunque es muy poco frecuente, estas pueden causar infecciones en condiciones normales sin la ingesta de probióticos^{80,81}. Por otro lado, existen suplementos dietéticos basados en los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Escherichia* y *Enterococcus* cuya seguridad es controversial, además del riesgo de la posible transmisión de algunos genes a especies patógenas del huésped, por lo que deben ser utilizadas con precaución y solo en casos selectos⁵¹.

Existen algunos casos descritos en la literatura de *Lactobacillus* causantes de infecciones graves. En la revisión de Cannon JP et al⁸² en 2004, se reúnen 200 casos de infecciones asociadas a *Lactobacillus* en diferentes localizaciones, pero con mayor frecuencia endocarditis y bacteriemias. Las especies predominantes fueron *L. casei* y *L. rhamnosus* GG, mientras que la patología subyacente más común fueron los procesos oncológicos, la diabetes y los trasplantes de órganos^{81,82}. En

este estudio hacen referencia a que la mortalidad registrada en estos casos puede estar atribuida a la patología de base de los pacientes y no necesariamente al proceso infeccioso⁸². En dicha revisión solo existen 22 casos atribuidos a microorganismos comensales vaginales a lo largo de 53 años, lo que representa un porcentaje extremadamente bajo de traspaso de estos microorganismo a otras localizaciones con carácter de patógenos^{11,82}. Además, en aproximadamente un 40% de pacientes con bacteriemia se detectaron otros patógenos concomitantes además de *Lactobacillus*, observándose en general, una mortalidad en sujetos con infecciones polimicrobianas del 43% vs 25% en las adjudicadas a un solo microorganismo ($p < 0,004$)⁸². Por último, existió un mayor porcentaje de defunciones en los sujetos con bacteriemias que no recibieron el tratamiento indicado ($p < 0,001$)⁸². Husni RN et al⁸³, presentó una revisión de 45 casos de bacteriemias por *Lactobacillus*, de las cuales 60% eran polimicrobianas en pacientes con patologías de base severa (neoplasias malignas, post-operatorios recientes, diabetes, tratamientos inmunosupresores) y hospitalización de larga evolución. La mitad de ellos habían recibido previamente antibioterapia no efectiva contra esta especie, hecho que pudiera haber seleccionado a los *Lactobacillus*⁸³. Excepto en un caso, el resto de las muertes fueron atribuidas a la patología concomitante y no a la bacteriemia por *Lactobacillus*⁸³.

Ouwenhand et al⁸⁴ obtuvieron cepas similares a *L. rhamnosus* GG presentes en muestras sanguíneas de pacientes con patologías asociadas importantes y las compararon con las homologas presentes en probióticos. Observaron que aunque no existían diferencias genéticas entre estas cepas, las aisladas de muestras biológicas si presentaron variaciones fenotípicas que pueden corresponder a factores potenciales de virulencia tales como fuerte adhesión epitelial y liberación de especies reactivas del oxígeno⁸⁴.

Prucoli G et al⁸⁵, realizaron un compendio de 15 casos pediátricos relacionados con infecciones por *Bifidobacterium*, todos ellos con patologías asociadas (prematuridad, enterocolitis necrotizante, procesos oncológicos, bajo peso al nacimiento, entre otros) y muerte en solo un caso en el cual no hay información sobre si existía toma de probióticos.

Redman MG et al⁸⁶, realizan un meta-análisis de probióticos (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces boulardii*, *Bacillus*) empleados en pacientes oncológicos, donde reportan 5 casos de infecciones relacionadas con la ingesta de estos tratamientos entre una muestra de 1500 pacientes y sin ninguna muerte atribuida. Los autores concluyen que en general, se necesita más evidencia para ratificar el beneficio de los probióticos en esta población de pacientes⁸⁶.

Boyle RJ et al⁸⁷, proponen una serie de criterios de riesgo de sepsis a considerar antes de la prescripción de fármacos probióticos si se cumple alguno de los criterios mayores o más de uno de los menores reflejados en la Tabla 3. Estos criterios están respaldados por otros artículos donde se añade además pacientes con nutrición vía parenteral, alteraciones hematológicas, post-operatorios recientes y trasplantados (hepáticos principalmente)^{82,85,86,88}.

| Factores de riesgo asociados a sepsis por probióticos | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Criterios mayores de riesgo | Criterios menores de riesgo |
| <ul style="list-style-type: none"> ✓ Inmunodepresión. ✓ Procesos oncológicos. ✓ Pacientes gravemente enfermos. ✓ Prematuros. | <ul style="list-style-type: none"> ✓ Alteración de la integridad de la pared intestinal como procesos inflamatorios, diarrea, entre otros. ✓ Yeyunostomía. ✓ Portadores de vía central. ✓ Probióticos que se adhieran fuertemente a la mucosa intestinal o que presenten propiedades patogénicas. ✓ Antibioterapia de amplio espectro que seleccione a las cepas del probiótico por resistencia al mismo. ✓ Alteración valvular cardiaca. |

Tabla 3. Factores de riesgo asociados a la sepsis por probióticos. Modificada de: Boyle RJ et al⁸⁷.

En general, se pueden utilizar diversos antibióticos para el tratamiento de las infecciones por *Bifidobacterium* siendo la penicilina el fármaco de elección⁸⁵. En cuanto al tratamiento de la patología relacionada con *Lactobacillus*, Cannon JP et al⁸² recomiendan eritromicina, clindamicina o ampicilina más gentamicina de forma empírica, aunque la capacidad de este género para disminuir el pH del entorno puede afectar la efectividad de los aminoglucósidos y algunos betalactámicos⁸². Husni RN et al⁸³ señalan que existe una sensibilidad total de los *Lactobacillus* a ampicilina, oxaciclina, clindamicina, eritromicina, tetraciclinas, cloranfenicol y 96% para penicilina. Dicha sensibilidad disminuye a un 60% para gentamicina y cefazolina y un 27% para vancomicina⁸³.

2.6 Prebióticos y simbióticos

Según la International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP)⁸⁹, los prebióticos son “sustratos que son utilizados selectivamente por los microorganismos del huésped, confiriéndole un beneficio para su salud”. Representan elementos de la dieta no digeribles presentes en hortalizas, leche, miel, legumbres, cereales, entre otros⁹⁰. Estos tienen la capacidad de crear cambios en la estructura y funcionamiento de la microbiota.

Entre los prebióticos más frecuentes se encuentran la inulina, lactulosa, oligosacáridos de la leche materna, galacto-oligosacáridos y oligofructosa⁹. Actualmente existen formulaciones prebióticas disponibles para su administración oral o tópica incluyendo vía vaginal, mayormente como productos simbióticos. Los simbióticos son formulaciones que contienen prebióticos y probióticos, en el que el primero favorece al segundo de forma específica⁸¹.

Entre los principales beneficios que aportan los prebióticos se encuentran:

- ✓ Favorecer el crecimiento y/o función de un número limitado de bacterias de forma selectiva⁸¹.
- ✓ Representan el sustrato de la microbiota. Existe una gran variedad de microorganismos que se benefician de los prebióticos

como el género *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Roseburia*, entre otros⁸⁹.

- ✓ Contribuir en la formación de ácidos grasos de cadena corta necesarios para la función de las células del epitelio gastrointestinal, hecho que puede repercutir en otros órganos⁸⁹.
- ✓ Aumentar la absorción de calcio, magnesio y hierro⁹.
- ✓ Estimular el sistema inmune mediante su influencia sobre las citoquinas y la síntesis de IgA⁹.
- ✓ Acelerar el tránsito gastrointestinal mediante el incremento de la masa fecal⁹⁰.
- ✓ Dificultar la unión de los patógenos a la pared intestinal y vaginal⁹¹.

Para su empleo vía vaginal, se requieren prebióticos que actúen rápidamente debido a su corta vida media a este nivel⁹². Además, se necesita una adecuada composición basal de la microbiota del huésped para conseguir el efecto deseado con la administración de prebióticos⁸⁹. Por esta razón, los resultados en los estudios con prebióticos pueden presentar una gran variabilidad interindividual en cuanto a su eficacia⁸⁹.

Para su efecto a nivel intestinal, los prebióticos deben ser administrados únicamente en la dosis necesaria para conseguir el efecto terapéutico deseado ya que su exceso puede causar efectos adversos como el meteorismo y la diarrea^{89,90}. Algunos estudios recomiendan 10 g/día de galacto-oligosacáridos en la edad adulta y ¼ de esta dosis en población mayor para potenciar las *Bifidobacterias* intestinales ya que se parte de una concentración bacteriana más reducida⁹⁰.

Actualmente, existen pocos ensayos dirigidos a analizar el impacto de los prebióticos como coadyuvante de los antimicrobianos en el tratamiento de las disbiosis vaginales y su empleo en la restauración de la microbiota vaginal a largo plazo. En un reciente estudio in vitro de Collins et al⁹², se expusieron diferentes especies de *Lactobacillus* y microorganismos causantes de vaginosis bacteriana (*Gardnerella*, *Atopobium*, *Prevotella* y *Mobiluncus*) a los prebióticos lactitol, lactulosa, rafinosa y oligofruktosa. Se observó que la lactulosa era el prebiótico que más beneficiaba las colonias de *Lactobacillus crispatus* ATCC 33820T, *L. vaginalis* NCFB

2810, *L. gasseri* ATCC 33323T, *L. jensenii* RC28 y resultaba perjudicial para *Candida* y *Atopobium*⁹². La lactulosa promueve la formación de ácido láctico y la acidificación del pH, esencial para la inhibición de microorganismos patógenos vaginales⁹². El efecto sobre *L. crispatus* fue el más destacado debido a que no era cepa-dependiente por lo que potencialmente beneficiaría a todas las de su especie⁹². No se observó un beneficio para *L. iners* excepto por la reducción del pH⁹². En cuanto a los otros prebióticos empleados, el lactilol aumentó la concentración lactobacilar pero no contribuyó a la acidificación del medio⁹². La rafinosa y oligofruktosa inhibieron a *L. iners* y tampoco beneficiaron a las otras especies de *Lactobacillus*. Además, este tipo de prebióticos tiene la capacidad de estimular el crecimiento de patógenos como *Trichomonas* y *Candida* respectivamente⁹². Sin embargo, en este estudio solo se ha probado su efecto sobre unas cepas seleccionadas y existen estudios con otros oligosacáridos que si han resultado beneficiosos. Rousseau V et al⁴⁷, realizaron un estudio in vitro donde seleccionaron las cepas *L. vaginalis* BLL 9901, *L. crispatus* BLL 2008 y *L. jensenii* BLL 2108 de muestras vaginales por sus propiedades antagónicas frente a patógenos como la producción de ácido láctico, peróxido de hidrógeno, competición por sustratos como arginina (únicamente BLL 2108), capacidad de colonizar el epitelio vaginal, entre otras. Todas las cepas presentaron antagonismo contra *Escherichia coli* (CIP 548T), *Neisseria gonorrhoeae*, *Prevotella intermedia* (CIP 103607T), *Gardnerella vaginalis* (CIP 7074T), *Corynebacterium seminale* y *Peptostreptococcus anaerobius* (AIP 10102T)⁴⁷. Debido a que *Candida albicans* suele ser resistente al pH ácido y al peróxido de hidrógeno que generan muchos *Lactobacillus*, solo *L. jensenii* BLL 2108 presentó una oposición importante a la cepa de *Candida* ATCC2091⁴⁷. Posteriormente, las cepas patógenas y *Lactobacillus* seleccionados fueron expuestos a formulaciones prebióticas con oligosacáridos DP3 (Grado de polimerización 3) de FOS Actilight® y los gluco-oligosacáridos α -1,6/ α -1,4, beneficiando a los segundos sin promover el crecimiento de las primeras⁴⁷.

En cuanto a los estudios en humanos, Coste I et al⁹¹ realizaron un ensayo clínico en 42 mujeres premenopáusicas con VB a las que se les pauta un tratamiento oral con metronidazol 7 días, y posteriormente, se administra vía vaginal una formulación prebiótica con gluco-oligosacáridos alfa (300 mg) y el

extracto de la planta *trifolium pratense* al 2% por 16 días vs placebo. En el día 8 y 16 se observó normalidad en la microbitota vaginal según escala de Nugent en todas las pacientes del grupo prebiótico⁹¹. Sin embargo en el grupo placebo se observó un 33% y 24% de pacientes con Nugent patológico en el día 8 y 16 respectivamente⁹¹. Tester R et al⁹³, emplearon otro prebiótico en mujeres con vulvovaginitis por *Candida albicans* a las que se les administró un tratamiento con nistatina vaginal 500.000 UI/ 8h/ 7días, y posteriormente, Glucomanano hidrolizado konjac (GMH) 200mg bisemanal/30 días vs placebo. El tratamiento prebiótico resultó efectivo en mejorar la microbiota vaginal, aumentar la población bacteriana y bloquear a *Candida albicans* según el estudio microscópico de las muestras. Además, este compuesto tiene la capacidad de inhibir la unión de microorganismos patógenos a las células epiteliales, activar la respuesta inmune local y regenerar el colágeno⁹⁴.

En relación a los estudios con simbióticos publicados hasta el momento, podemos destacar el de Parent D et al⁷⁶ (comentado en detalle en el apartado 2.7.1 Vaginosis bacteriana), donde se emplea de forma exitosa un régimen de tratamiento vaginal con *Lactobacillus acidophilus* + 0.03mg de estriol + 600mg de lactosa/ 12-24h/ 6 días a 32 mujeres premenopaúsicas con VB. En este caso, la lactosa sirve de sustrato para las colonias lactobacilares administradas⁷⁶.

En el apartado 2.7.2 Vulvovaginitis candidiásica, se hace referencia al estudio de Ehrström S et al⁷⁷ donde a pacientes con VB y/o VC se les pautó un tratamiento vía vaginal con clindamicina óvulos 100mg/3 días y/o clotrimazol óvulos de 200mg/3 días. Posteriormente, se administraron cápsulas con *Lactobacillus gasseri* LN40, *L. fermentum* LN99, *L. casei* subespecie *rhamnosus* LN113, *Pedicoccus acidilactici* LN23 / 12h/ 5 días y el prebiótico maltodextrina con buenos resultados, teniendo en cuenta el corto periodo de tratamiento. Este compuesto prebiótico proviene de la hidrolisis del almidón y forma parte de muchas formulaciones simbióticas comercializadas actualmente.

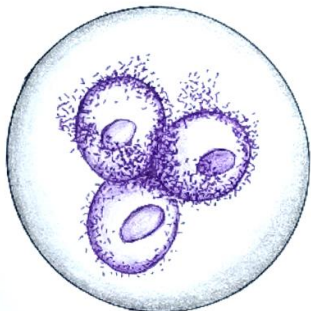
Para finalizar, se necesitan más estudios con formulaciones vía oral y vía vaginal para determinar exactamente qué prebiótico es el más indicado para estimular cada especie lactobacilar y su aplicación en la prevención y tratamiento

de las disbiosis vaginales como coadyuvante de los antimicrobianos. Para ello es necesario concretar la dosis y la combinación simbiótica adecuada para cada fin con el objetivo de restaurar el ecosistema vaginal.

2.7 Infecciones vaginales y microbiota

2.7.1 Vaginosis bacteriana

La VB representa la infección vaginal más frecuente en mujeres premenopáusicas, caracterizada por la disminución de la población de *Lactobacillus* y aumento de otras bacterias anaeróbicas como *Gardnerella vaginalis*, *Bacteroidetes*, *Acinetobacteria*, *Prevotella*, *Mobiluncus*, *Mycoplasma hominis*, entre otras⁹⁵⁻⁹⁷. Se caracteriza por leucorrea blanquecina o grisácea maloliente y prurito menos frecuentemente.



El diagnóstico se realiza mediante la presencia de los 3 criterios clínicos de Amsel⁹⁸, tinción de Gram y escala Nugent⁹⁹ (no toma en cuenta la presencia de otras especies) y examen microscópico en fresco (presencia de “clue cells” (Figura 6), pocos *Lactobacillus* y leucocitos)⁹⁷, (Tabla 4).

Figura 6. Clue cells en VB.

El tratamiento habitual en pacientes sintomáticas es con metronidazol o clindamicina vaginal u oral, pero cuenta con un alto porcentaje de recurrencias (Tabla 5). Una de las principales causas de las recaídas tras el tratamiento antimicrobiano es la formación de biofilms adheridos a las paredes vaginales, compuestos principalmente por *Gardnerella vaginalis*, *Lactobacillus* y otras bacterias, que impide la correcta penetrancia del tratamiento⁵. Existen estudios con ambos medicamentos donde se evidencia la ausencia de riesgo durante la gestación^{100,101}. Algunos autores recomiendan la administración oral en el embarazo (aunque a dosis más bajas) por su potencial beneficio en la prevención

de la corioamnionitis⁹⁷. Sin embargo, estos fármacos no están exentos de riesgos, sobre todo con la administración oral. Ambos pueden causar reacciones alérgicas, problemas gastrointestinales, candidiasis tras antibioterapia, y además, el metronidazol puede causar sabor metálico y efecto antabus con la ingesta de bebidas alcohólicas.

| Criterios clínicos de Amsel | Criterios cito-morfológicos Escala de Nugent | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------|
| | Puntuación | <i>Lactobacillus</i> | <i>Gardnerella Bacteroides</i> | <i>Mobilincus</i> |
| Presencia de 3 o más de los siguientes: -Flujo patológico (leucorrea homogénea, no inflamatoria que se adhiere a paredes vaginales). -Olor a pescado con o sin la adición de hidróxido de potasio 10% (prueba de aminas). -pH vaginal >4.5. -“Clue cells” (células epiteliales vaginales rodeadas de microorganismos patógenos). | 0 | 4+ | 0 | 0 |
| | 1 | 3+ | 1+ | 1+ o 2+ |
| | 2 | 2+ | 2+ | 3+ o 4+ |
| | 3 | 1+ | 3+ | |
| | 4 | 0 | 4+ | |
| | Se realiza extensión de flujo vaginal con tinción de Gram y se puntúa según la cantidad de cada microorganismo presente con objetivo de inmersión x1000 de la siguiente manera: 0= Ningún microorganismo presente 1= <1 microorganismo/campo 2= 1-4 microorganismos/campo 3= 5-30 microorganismos/campo 4= >30 microorganismos/campo | | | |
| | Puntuación total | <ul style="list-style-type: none"> -Vaginosis bacteriana = ≥ 7 puntos. -Microbiota intermedia = 4-6 puntos. -Microbiota normal = 0-3 puntos. | | |

Tabla 4. Criterios diagnósticos de Amsel y escala de Nugent para el diagnóstico de la vaginosis bacteriana^{98,99}.

| Principio activo | Vía de administración y posología |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Metronidazol | VO 500mg/ 12h / 7 días. VV gel 0,75%/ 24h/ 5 días |
| Clindamicina | VV Crema 2% 1 aplicación/ 24h/ 7 días VV Óvulos 100 mg / 24h/ 3 días. VO 300 mg/ 12 h /7 días. |
| Tinidazol* | VO 2g / 24h / 2 días o 1g/ 24h/ 5 días. |
| Cloruro de decualinio | VV Comprimidos 10mg/24h/6 días. |

Tabla 5. Regímenes de tratamiento recomendados para la vaginosis bacteriana¹⁰²⁻¹⁰⁴. VV: Vía vaginal, VO: Vía oral. *No durante el embarazo.

Otra opción terapéutica además de los antibióticos es el cloruro de decualinio, un tratamiento de amplio espectro contra bacterias, hongos y protozoos. Su mecanismo de acción es aumentar la permeabilidad de la pared de estos microorganismos con el consiguiente fracaso de su actividad enzimática¹⁰³. No se han evidenciado resistencias hasta el momento¹⁰³. En un estudio realizado por Weissenbacher ER et al¹⁰⁵, se comprueba una eficacia equiparable a la clindamicina vaginal. La absorción sistémica es mínima y actualmente es el tratamiento de elección durante el embarazo¹⁰². En una revisión realizada por Mendling W et al¹⁰³, se incluyeron a 181 gestantes en las cuales se empleó este tratamiento con éxito sin encontrarse ningún efecto patológico sobre la gestación ni el feto.

En el tratamiento de las VB, también se han utilizado probióticos tras la administración de antimicrobianos observándose una potenciación de su efecto, y en ocasiones, resultados superiores con la administración únicamente de probióticos (Tabla 6).

Parent D et al⁷⁶, propusieron un régimen de tratamiento vaginal con *Lactobacillus acidophilus* (10⁷ UFC) + 0.03mg de estriol + 600mg de lactosa/ 12-24h/ 6 días vs placebo a 32 mujeres premenopáusicas con VB, 8 de ellas gestantes. El día 14 y 28 de seguimiento la tasa de curación del grupo de tratamiento fue del 77% vs 25% en el grupo placebo y del 88% vs 22% respectivamente, determinado mediante los criterios de Amsel y tinción de Gram⁷⁶. La adición del estriol

estimula la disponibilidad del glucógeno del epitelio vaginal para la acidificación del medio y la lactosa sirve de sustrato para las colonias lactobacilares administradas⁷⁶.

Martínez RCR et al en 2009⁵⁵, realizaron un estudio para el tratamiento de la VB con tinidazol 2g dosis única, y posteriormente, *L. rhamnosus* GR-1 + *L. reuteri* RC-14 (1×10^9 cada uno/ 12h) o placebo por 4 semanas, ambos vía oral. Se estudiaron las muestras vaginales mediante los criterios de Amsel y escala de Nugent⁵⁵. Se observó una curación del 87% en el grupo probiótico vs 50% en el grupo placebo. Macklaim JM et al en 2015⁵⁴, encontraron resultados similares al administrar el mismo tratamiento a mujeres con VB por 28 días, y posteriormente, analizar su microbiota mediante la secuenciación del gen 16S rARN. El estudio mostró una microbiota vaginal normal dominada por *Lactobacillus* en el 74% de los casos del grupo probiótico vs 35% del grupo placebo⁵⁴. Sin embargo, las especies encontradas con mayor frecuencia no fueron las administradas, sino *L. iners* y *L. crispatus*, aumentando su concentración con respecto a la muestra basal y disminuyendo los microorganismos patógenos⁵⁴.

Anukan KC et al en 2006⁵⁶, realizan un estudio en pacientes con VB a las que se les pauta un tratamiento vía vaginal con metronidazol 0.75% gel/12h vs cápsulas vaginales de *L. rhamnosus* GR-1 + *L. Reuteri* RC-14 (1×10^9 cada uno/12h), ambos por 5 días. Las muestras estudiadas según la escala de Nugent, test de KOH (hidróxido de potasio) y test de sialidasa con BV Blue test (enzima presente en bacterias anaeróbicas Gram negativas y en otros patógenos), muestran un 90% de curación de la VB en el grupo de probióticos vaginales vs 55% en el grupo de metronidazol el día 30 de seguimiento⁵⁶. Estos autores en 2006⁵³, realizaron otro estudio similar pero administrando metronidazol 500mg/ 12h/ 7 días vía oral a todas las pacientes, además de la misma formulación probiótica vía oral vs placebo por 1 mes a 106 mujeres de raza africana con VB. El grupo de probióticos presentó un 88% de curación vs 40% en el grupo placebo, determinado mediante la escala de Nugent, test de sialidasa y la sintomatología presente⁵³. Además, se obtuvo un recuento lactobacilar superior a 10^5 mediante cultivo en 96% del grupo probiótico vs 53% del grupo placebo.

Vujic et al⁷⁴, presentaron un estudio con el probiótico *L. rhamnosus* GR-1 + *L. Reuteri* RC-14 ($>1 \times 10^9$ UFC) vía oral/ 12h/ 6 semanas vs placebo para el tratamiento de VB, VC y tricomoniasis en 544 mujeres. Para el estudio de las

muestras se emplearon los criterios de Amsel, escala de Nugent y cultivo de *Lactobacillus*. De las 395 pacientes asignadas al grupo probiótico, en un 61.5% se observó normalización de la microbiota vaginal vs en el 26.9% del grupo placebo al finalizar el tratamiento. En la semana 12 de seguimiento, la microbiota vaginal del grupo probiótico se mantuvo normal en la mitad de las pacientes vs en 1/5 de las pacientes del grupo placebo.

Ehrström S et al⁷⁷, publicaron un estudio donde administraron clindamicina óvulos vaginales 100mg/3 días a todas las pacientes y, posteriormente, una formulación probiótica vaginal (*Lactobacillus gasseri* LN40, *L. fermentum* LN99, *L. casei* subespecie *rhamnosus* LN113 y *Pedicoccus acidilactici* LN23) por 5 días vs placebo a mujeres con VB obteniendo buenos resultados, como se explica en el apartado 2.7.2 Vulvovaginitis candidiásica.

Laue C et al en 2018¹⁰⁶, presentaron un trabajo en 36 mujeres pre y postmenopáusicas con VB en el que emplearon metronidazol oral 500mg/ 12h/ 7 días, y posteriormente, una bebida de yogurt/ 12h/ 4 semanas con *L. rhamnosus* LbV96, *L. crispatus* LbV 88, *L. gasseri* LbV 150N y *L. jensennii* LbV 116 a una concentración de 1×10^7 UFC de cada especie/ml, además de *L. delbrueckii* subespecie *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* ya presentes en la bebida vs placebo (leche acidificada sin bacterias). Tras finalizar el tratamiento, se observó una curación mediante criterios de Amsel del 100% en el grupo probiótico vs 35.3% en el grupo placebo¹⁰⁶. Esta es la tasa de curación más alta obtenida hasta el momento, hecho que es atribuido por los autores a que se han empleado las especies más frecuentemente aisladas en la microbiota vaginal¹⁰⁶. Estudios similares con otras cepas como el de Martínez RCR et al⁵⁵ reportan una tasa de curación del 87%. Debido al diseño del estudio, no se determinó cuáles de las especies fueron las más detectadas en vagina tras su administración oral¹⁰⁶. Además, también se desconoce si los resultados del estudio se debieron a la presencia de las otras dos especies ya presentes en el yogurt (*L. delbrueckii* subespecie *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) o a los *Lactobacillus* añadidos, tomando en cuenta que al grupo placebo se le administró leche carente de bacterias.

En el trabajo de Anukan KC et al⁵⁶, se demuestra que formulaciones probióticas como *L. rhamnosus* GR-1 + *L. reuteri* RC-14 vía vaginal no solo son

equiparables al empleo de antimicrobianos, sino que además, pueden ser superiores a estos en el tratamiento de las VB con un régimen de tratamiento corto. Además, en el ensayo de Vujic et al⁷⁴ se observó la eficacia del mismo probiótico, en este caso vía oral, vs placebo en el restablecimiento de la microbiota vaginal tras distintos tipos de infecciones vaginales de forma prolongada en el tiempo. El hecho de que este probiótico haya sido el más ampliamente estudiado tanto vía oral como vaginal para el tratamiento de distintas afecciones vaginales, no implica que se puedan generalizar sus propiedades farmacológicas a todas las cepas de la misma especie ni que sea la formulación probiótica más adecuada en todos los casos. Por último, a pesar de que en todas las publicaciones mencionadas los resultados fueron positivos, se necesitan más estudios randomizados, doble-ciego, controlados con placebo y comparativos de antimicrobianos vs probióticos para valorarlos como una alternativa de tratamiento y prevención eficaz contra las VB. En futuros estudios, es recomendable el análisis de las muestras mediante técnicas de secuenciación masiva en grupos grandes de pacientes y concretar las cepas lactobacilares y dosis más idóneas para las VB.

| Estudio | Regímenes terapéuticos |
|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Parent D et al en 1996 ⁷⁶ | VV <i>Lactobacillus acidophilus</i> (10 ⁷ UFC) + 0.03mg de estriol + 600mg de lactosa/ 12-24h/ 6 días. |
| Anukan KC et al en 2006 ⁵⁶ | VV metronidazol 0.75% gel + <i>L. rhamnosus</i> GR-1 + <i>L. reuteri</i> RC-14 1x10 ⁹ cada uno/12h/5 días. |
| Anukan KC et al en 2006 ⁵³ | VO metronidazol 500mg/ 12h/ 7 días + <i>L. rhamnosus</i> GR-1 + <i>L. reuteri</i> RC-14 1x10 ⁹ cada uno /12h/4 semanas. |
| Ehrström S et al en 2010 ^{77*} | VV clindamicina óvulos 100mg/3 días y/o clotrimazol óvulos de 200mg/3 días + <i>Lactobacillus gasseri</i> LN40, <i>L. fermentum</i> LN99, <i>L. casei</i> subespecie <i>rhamnosus</i> LN113 y <i>Pedicoccus acidilactici</i> LN23 (10 ⁸ -10 ¹⁰ UFC en total/12h/5 días) + maltodextrina. |
| Martínez RCR et al en 2009 ⁵⁵ Macklaim JM et al en 2015 ⁵⁴ | VO tinidazol 2g + <i>L. rhamnosus</i> GR-1 + <i>L. reuteri</i> RC-14 1x10 ⁹ cada uno /12h/4 semanas. |
| Vujic et al en 2013 ^{74**} | VO <i>L. rhamnosus</i> GR-1 + <i>L. reuteri</i> RC-14 1x10 ⁹ / 12h/ 6 semanas. |
| Laue C et al en 2018 ¹⁰⁶ | VO metronidazol oral 500mg/ 12h/ 7 días + bebida de yogurt con <i>L. rhamnosus</i> LbV96, <i>L. crispatus</i> LbV 88, <i>L. gasseri</i> LbV 150N, <i>L. jensennii</i> LbV 116 1x10 ⁷ UFC de cada especie/ml, además de <i>L. delbrueckii</i> subespecie <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> . |

Tabla 6. Estudios con probióticos para el tratamiento de la vaginosis bacteriana. VO: Vía oral, VV: Vía vaginal. *Estudio realizado en VB y VC. **Estudio realizado en VB, VC, tricomoniasis.

2.7.2 Vulvovaginitis candidiásica

La VC es la segunda infección más frecuente del tracto genital femenino. Está causada por una alteración en la homeostasis e inmunidad del ecosistema vaginal sin que ello implique disminución de *Lactobacillus*^{107,108}. Existen estudios donde no se han encontrado diferencias entre la población lactobacilar de mujeres sanas y aquellas con candidiasis¹⁰⁹.

Entre los principales factores predisponentes para la VC se encuentra la inmunodepresión, diabetes mellitus mal controlada, antibioterapia de amplio espectro, aumento de estrógenos (embarazo, anticoncepción hormonal de alta dosis y terapia hormonal sustitutiva), prácticas sexuales, duchas vaginales, entre otros.

El agente causal es *Candida albicans* en aproximadamente el 90% de los casos y se encuentra presente como comensal en muchas mujeres asintomáticas premenopáusicas^{110,111}. En el 10% restante la infección es causada por otras especies como *Candida glabrata* (70% de los casos), *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, entre otras¹¹⁰. Holland J et al¹¹⁰ presentaron un estudio en el que se incluyeron más de 1200 pacientes con aislamiento de hongos en cultivo, en el que no se observaron diferencias entre *Candida albicans* y *C. glabrata* en cuanto a embarazo, diabetes mellitus y presencia de otros patógenos. Sí existieron diferencias en la edad de las pacientes, siendo algo mayores las que presentaban *Candida glabrata* vs *Candida albicans* (43 años vs 33 años)¹¹⁰.

Los síntomas y signos más frecuentes de esta afección son prurito, sensación de quemazón, dolor, eritema local y flujo vaginal blanquecino espeso. El diagnóstico se realiza mediante el examen microscópico en fresco o con KOH y si negativo se debe realizar cultivo vaginal^{104,112}. El pH permanece ácido habitualmente¹¹².

Se catalogan de VC complicada aquellas que cuentan con alguna de las siguientes características¹¹³:

- ✓ Recidivantes (4 o más episodios/año).
- ✓ Síntomas/hallazgos severos.

- ✓ Factores de riesgo como diabetes, inmunosupresión, embarazo, patología de base grave, entre otros.
- ✓ Causada por *Candida no albicans*.

En cuanto al tratamiento de la vulvovaginitis candidiásica no complicada en mujeres sintomáticas se recomiendan imidazoles tópicos como clotrimazol y miconazol o con triazoles orales como fluconazol e itraconazol en dosis única o regímenes de tratamiento muy cortos^{104,112,113}. En la candidiasis recidivante, en general se recomienda un tratamiento de inducción tópico prolongado por 1-2 semanas u oral como el fluconazol oral/72h/3 días^{112,113}. Como terapia de mantenimiento se recomienda fluconazol 150mg/semana/6 meses o clotrimazol 500mg comprimidos vaginales/semana^{112,113}. La Tabla 7 ilustra las recomendaciones de las guías SEGO (Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia), AEPCC (Asociación Española de Patología Cervical y Colposcopia), IUSTI (International Union against Sexually Transmitted Infections) y la CDC (Centers for Disease Control and Prevention).

Las especies de *Candida no albicans* suelen ser resistentes al tratamiento habitual con azoles probablemente por la automedicación indiscriminada con antifúngicos de corta duración o por tratamientos largos profilácticos con bajas dosis de fluconazol en el que prolifera *Candida glabrata*¹¹⁴. En general se recomiendan azoles excepto fluconazol con tratamientos más prolongados orales o tópicos^{97,113,114}. También se puede emplear anfotericina B vaginal 50mg/24h/14días^{112,115}, ácido bórico vaginal 600 mg/24h/14 días^{112,113,116} o flucitosina crema/24h/14 días^{114,116}. Hetticarachchi N et al¹¹⁷, realizaron una revisión retrospectiva de las pacientes con vulvovaginitis por *Candida no-albicans* tratadas con anfotericina 100mg y flucitosina 1g vía vaginal/14 días tras fracaso del tratamiento con los azoles habituales. Obtuvieron 100% de cultivos negativos para la especie de *Candida no-albicans* detectada inicialmente y en 11% se aisló *Candida albicans* de forma sintomática tras las 4 semanas de seguimiento¹¹⁷. El único inconveniente de este tratamiento es que debe ser administrado en menos de dos días tras la producción del tratamiento y fuera del periodo menstrual¹¹⁷.

| Vulvovaginitis candidiásica no complicada | Vulvovaginitis candidiásica recidivante |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>Vía vaginal</p> <p>-Clotrimazol comprimido vaginal 500 mg dosis única, 100mg/12-24h por 3-7 días o 200mg/24h/3días^{112,102,104}. Crema vaginal 1-2% 5g/24h/7-14 días^{102,112,113}.</p> <p>-Miconazol óvulo vaginal 1200 mg dosis única o 200-400 mg/24h/3días^{104,112,113}.</p> <p>Miconazol crema 2% 5g/24h/7-14días^{102,113}.</p> <p>-Econazol óvulo vaginal 150 mg/dosis única^{104,112} o por 3 días^{102,112}.</p> <p>-Fenticonazol óvulo vaginal 200mg/24h/3días o 600mg dosis única¹⁰² o crema 2% 5g/24h/7días¹¹².</p> | <p>Vía vaginal</p> <p>-Clotrimazol 500 mg/semana/2 semanas^{97, 102}. Mantenimiento 500mg/semana/6-12m^{97,102,112}.</p> <p>-Fenticonazol 600mg/24h/3días. Mantenimiento 600mg/semana/5-12meses¹⁰².</p> |
| <p>Vía oral</p> <p>-Fluconazol 150mg/dosis única^{97,102,104,113}.</p> <p>-Itraconazol 200mg/12h/1 día^{97,102,104} o 100mg/12h/3días^{102,112}.</p> | <p>Vía oral</p> <p>- Fluconazol 150mg /72h/3 dosis^{97,102,104,113}. Mantenimiento 150mg/semana/6 meses^{97,102,112}.</p> <p>-Itraconazol 200mg/24h/10días¹⁰² o 200mg/12h/3días⁹⁷. Mantenimiento 100-200mg/24h/6-12m¹⁰² o 200mg/semana/6 meses⁹⁷.</p> |

Tabla 7. Regímenes de tratamiento antifúngico para vulvovaginitis candidiásica no complicada y recidivante.

Como fue observado en el estudio de Sobel JD et al¹¹⁸, a pesar del tratamiento inicial con fluconazol 150mg/72h/3dosis, y posteriormente, pauta de mantenimiento semanal por 6 meses vs placebo, el 57% de las pacientes tuvieron recidivas al cabo de un año vs 78% en el grupo placebo. En este estudio no se observaron resistencias al tratamiento antifúngico ni presencia de especies de *Candida no-albicans*¹¹⁸. Por lo tanto, se precisan de nuevas alternativas terapéuticas

efectivas y seguras para evitar estos episodios como pueden ser los probióticos (Tabla 8).

Los *Lactobacillus* presentes en la microbiota vaginal cuentan con diversas herramientas de defensa contra *Candida albicans*. En primer lugar, está demostrada la coagregación de *L. gasseri*, *L. jensenii* y *L. acidophilus* con *Candida albicans* y la inhibición de la unión de esta a las células epiteliales vaginales por parte de *Lactobacillus acidophilus*¹¹⁹. Además, algunas cepas como *Lactobacillus fermentum* RC-14 (renombrada como *L. Reuteri* RC-14¹⁰⁷) evita la unión de *Candida albicans* y otros patógenos mediante la producción de biosurfactantes¹²⁰. Martínez RCR et al¹²¹, presentaron un estudio in vitro donde observaron restricción de la proliferación de *Candida albicans* 3153a (2×10^4 UFC/ml) tras agregar la cepa *Lactobacillus reuteri* RC-14 y en co-cultivo con *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 (1×10^7 UFC/ml), posiblemente por competición de sustratos y la inhibición en la formación de sus biofilms¹²¹. Otro estudio realizado en 64 mujeres sanas mostró la eficacia de GR-1 y RC-14 en la disminución de hongos vaginales (sin especificar tipo) tras la administración de estas cepas vía oral (1×10^9 UFC de cada cepa) desde el día 28 de tratamiento⁶².

Actualmente en la literatura, existen otras formulaciones probióticas administradas vía oral y vaginal con muy buenos resultados. Vladareanu R et al en 2018¹²², presenta un ensayo con una muestra de 93 mujeres con historia de VC recurrente en el que se administraron cápsulas orales de *L. plantarum* P17630 (5×10^9 UFC/cápsula) vs placebo durante 3 rondas de 15 días de tratamiento/descanso. Observaron un aumento significativo en la población de *Lactobacillus* vaginales determinado por escala de Nugent y Grado Lactobacilar desde el día 45 de seguimiento y mejoría de los síntomas asociados a la vulvovaginitis en comparación con grupo placebo¹²². En el estudio de De Seta F et al⁷⁸, emplearon este mismo probiótico vía vaginal con buenos resultados. Inicialmente, se trató a 89 mujeres con VC con clotrimazol crema vaginal al 2% por 3 días y, a continuación, en el grupo probiótico se inició la administración de *L. plantarum* P17630 (1×10^8 /cápsula/6 días y semanalmente/4 semanas) vs grupo placebo (cápsulas lubricantes). A pesar de que en la visita basal el grupo probiótico contaba con un menor recuento de *Lactobacillus* en comparación con el

grupo lubricante, a los 3 meses se observó un aumento de la población lactobacilar vaginal (tinción Gram con 5-30 células/campo) en 80% de las pacientes del grupo probiótico vs 40% del grupo lubricante. Además el grupo probiótico presentó mejoría significativa de los síntomas de vulvovaginitis (90% vs 67%)⁷⁸. No existieron diferencias en cuanto al porcentaje de recurrencias a los 3 meses (12.5% grupo lubricante vs 2.5% grupo probiótico), pero sí se observó un $\text{pH} \geq 5$ en el 20% del grupo control vs 0% en el grupo probiótico de forma significativa⁷⁸.

Ehrström S et al⁷⁷ llevaron a cabo un estudio en pacientes con VB (n=39), VC (n=45), ambas patologías (n=11) a las que se les administra el tratamiento antimicrobiano habitual (clindamicina óvulos vaginales 100mg/3 días y/o clotrimazol óvulos de 200mg/3 días). Posteriormente, las pacientes asignadas al grupo probiótico (n=60) reciben cápsulas vaginales con *Lactobacillus gasseri* LN40, *L. fermentum* LN99, *L. casei* subespecie *rhamnosus* LN113 y *Pedococcus acidilactici* LN23 (10^8 - 10^{10} UFC en total/12h/5 días) vs grupo placebo (n=35)⁷⁷. Se toman muestras vaginales en visita 1 (basal), visita 2 (48-72h tras finalizar el tratamiento), visita 3 y 4 (tras las dos primeras menstruaciones) y visita 5 (a los 6 meses)⁷⁷. Se analizaron mediante cultivo, detección de especies con 16S rADN y de cepas por Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)⁷⁷. Las cepas mencionadas demostraron su antagonismo in vitro contra *Candida albicans*, y las 3 últimas, contra *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*⁷⁷. Existieron tasas de curación en la visita 2 del 93% en el grupo probiótico vs 83% en grupo placebo⁷⁷. Además las cepas probióticas fueron aisladas en vagina en la visita 2 en casi el 90%, en la visita 3 se encontró al menos una de las cepas en el 53% y en la visita 5 se detectaron en casi el 9% de las pacientes⁷⁷. *Pedococcus acidilactici* LN23 se empleó principalmente por su capacidad de acidificar el pH rápidamente y permitir así la proliferación de los *Lactobacillus*, desapareciendo LN23 posteriormente⁷⁷. Este estudio demuestra la eficacia y el potencial de permanencia de estas cepas en vagina hasta 6 meses con un tratamiento corto de 5 días vía vaginal.

Se necesitan más estudios controlados empleando distintas especies probióticas vía oral y vaginal, de forma prolongada para el tratamiento y prevención de VC. De esta manera, podremos observar su efecto sobre el

porcentaje de recurrencias de VC que suele ser uno de los principales problemas que existen hoy en día con los antifúngicos habituales.

| Estudio | Regímenes terapéuticos |
|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Reid G et al en 2003 ⁶² | VO <i>Lactobacillus reuteri</i> RC-14 + <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GR-1 (1x10 ⁹ UFC de cada cepa/60 días, profiláctico). |
| Ehrström S et al en 2010 ^{77*} | VV clindamicina óvulos 100mg/3 días y/o clotrimazol óvulos de 200mg/3 días + <i>Lactobacillus gasseri</i> LN40, <i>L. fermentum</i> LN99, <i>L. casei</i> subespecie <i>rhamnosus</i> LN113 y <i>Pedicoccus acidilactici</i> LN23 (10 ⁸ -10 ¹⁰ UFC en total/12h/5 días) + maltodextrina. |
| Vujic et al en 2013 ^{74**} | VO <i>L. rhamnosus</i> GR-1 + <i>L. reuteri</i> RC-14 1x10 ⁹ / 12h/ 6 semanas. |
| De Seta F et al en 2014 ⁷⁸ | VV clotrimazol crema vaginal al 2%/3 días + <i>L. plantarum</i> P17630 (1x10 ⁸ /cápsula/6 días y semanalmente/4 semanas). |
| Vladareanu R et al en 2018 ¹²² | VO <i>L. plantarum</i> P17630 (5x10 ⁹ UFC/cápsula) 3 rondas de 15 días de tratamiento/descanso (profiláctico). |

Tabla 8. Estudios con probióticos para el tratamiento y prevención de la vaginitis candidiásica. VO: Vía oral, VV: Vía vaginal. *Estudio realizado en VB y VC. **Estudio realizado en VB, VC, tricomoniasis.

2.7.3 Tricomoniasis



La tricomoniasis vaginal representa la infección de transmisión sexual no vírica más frecuente⁹⁷ y está causada por un parásito anaerobio, *Trichomonas vaginalis*. Se trata de una infección habitualmente asintomática¹²³ que puede persistir mucho tiempo. Cuando es sintomática se puede observar flujo vaginal abundante amarillento, espumoso y maloliente

con prurito, eritema local, disuria, aspecto colposcópico de cérvix en fresa, entre otros.

El diagnóstico se realiza mediante la observación del parásito al examen microscópico, cultivo o pruebas de ampliación de ácidos nucleicos¹⁰⁴. Además, es recomendable realizar screening de otras infecciones de transmisión sexual por su frecuente asociación.

En cuanto al tratamiento, se emplea metronidazol 2g dosis única o 500mg/12h/7días o tinidazol 2g dosis única, advirtiéndole de evitar bebidas alcohólicas 48-72 horas tras finalización del tratamiento respectivamente^{97,104}. Se recomienda tratamiento de la pareja por la elevada tasa de reinfecciones que existe, abstinencia sexual y tomar una muestra vaginal para su estudio tras el tratamiento para comprobar la resolución del proceso infeccioso^{97,104}.

En el estudio de Brotman et al¹²³, se estableció la relación entre las características de la microbiota vaginal y la presencia de *Trichomonas vaginalis*. En una muestra de 394 mujeres sanas 11 resultaron positivas para este parásito, de las cuales un 72% contaba con un vaginotipo IV⁶, con concentración lactobacilar disminuida y predominio de anaerobios como *Sneathia*, *Mycoplasma*, *Parvimonas*, entre otros. El 18 % de los casos pertenecían al vaginotipo III (*L. iners*) y 9% al tipo I (*L. crispatus*)¹²³. No existieron casos con comunidades bacterianas tipo II (*L. gasseri*) ni V (*L. jensenii*), hecho que puede indicar un mayor antagonismo de estas especies hacia *Trichomonas vaginalis*, aunque se necesitan estudios con mayores muestras de pacientes¹²³. Sin embargo, se desconoce si el vaginotipo IV predispone a la tricomoniasis o es esta la que promueve la existencia de este microambiente vaginal¹²³. En esta línea, Phukan N et al en el 2013¹²³ realizaron un estudio in vitro con 34 cepas de *Lactobacillus* donde se observó que el *Lactobacillus gasseri* ATCC 9857 es uno de los que presentan una mayor oposición a la unión de la *Trichomonas vaginalis* B7RC2 (cepa de alta adhesión) al epitelio vaginal de forma contacto y dosis-dependiente desde una concentración de 1.5×10^6 *Lactobacillus*/ml. Sin embargo, la cepa CBI3 correspondiente a *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus pentosus*, contribuyó de forma significativa a la unión de *Trichomonas vaginalis* G3 (cepa de baja adhesión) al epitelio vaginal a partir de 5×10^7 *Lactobacillus*/ml¹²⁴. Este

Lactobacillus puede actuar como puente entre las *Trichomonas* y el epitelio vaginal, aumentando su potencial de adhesión¹²⁴. Por tanto, el tipo de microbiota vaginal presente puede modular la unión de este parásito a la pared vaginal, hecho que se debe tomar en cuenta en la creación de las nuevas formulaciones probióticas.

Existen pocos ensayos en humanos con probióticos para la resolución de la tricomoniasis vaginal. Como se comentó en el apartado de VB, Vujic et al⁷⁴ presentaron un estudio con el probiótico *L. rhamnosus* GR-1 + *L. Reuteri* RC-14 (>1x10⁹ UFC) vía oral/ 12h/ 6 semanas para el tratamiento de la VB, VC y tricomoniasis, donde se observó normalización de la microbiota vaginal en un 61.5% vs 26.9% del grupo placebo. Por otro lado, Sgibnev et al⁵² realizaron un estudio donde se evaluó el impacto de la co-administración de probióticos con antimicrobianos en la resolución de cuadros de tricomoniasis vaginal asociado a VB. Se incluyeron 90 pacientes con VB además de tricomoniasis resistente a tratamiento a las que se les pautó metronidazol 500mg/ 12h/ 7 días, además de comprimidos vaginales de *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 (concentración no especificada)/12h/7días en el Grupo 1 vs metronidazol más comprimidos placebo en el Grupo 2⁵². Posteriormente, ambos grupos continuaron con 7 días del mismo probiótico/12h. Tras los primeros 7 días de seguimiento, se observó una probabilidad de curación de la tricomoniasis del 88.6% en el Grupo 1 vs 42.9% en el Grupo 2, y de la VB del 63.6% vs 11.9% respectivamente⁵². El día 14 de seguimiento, se aisló el parásito en 11.4% de sujetos del Grupo 1 vs 57.1% del Grupo 2 y presencia de VB en 9,5% pacientes del Grupo 2 únicamente⁵². La concentración lactobacilar fue determinada estudiando el ADN mediante qPCR-RT (Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción inversa cuantitativa). Esta fue superior en el Grupo 1 (tratamiento concomitante con metronidazol más probiótico) en el día 7 de seguimiento que en el Grupo 2 (metronidazol seguido de 7 días de probióticos) en el día 14⁵². Al finalizar el estudio se concluye que existe un beneficio superior en la co-administración de metronidazol y *L. rhamnosus* Lcr35 en lugar de pautar este último en un segundo tiempo⁵².

Sin embargo, no se deben extrapolar estos resultados a todas las cepas probióticas ni la combinación con cualquier antimicrobiano. Para ello, es preciso de estudios in vitro e in vivo con cepas de colonización vaginal demostrada que presenten resistencia al agente antimicrobiano administrado, y que a su vez,

potencien su efecto para la resolución de éste proceso infeccioso de forma más eficaz.

2.7.4 Virus de la Inmunodeficiencia Humana

El *Virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)* actualmente afecta a más de 30 millones de personas alrededor del mundo y el índice de defunciones relacionadas con esta enfermedad alcanza otros 30 millones, por lo que representa un gran problema de salud pública¹²⁵.

La literatura publicada hasta el momento pone de manifiesto que los estados de disbiosis vaginal fomentan un estado proinflamatorio y alteran la barrera epitelial vaginal, facilitando la diseminación del virus. Como mencionamos previamente, las mujeres de raza Africana presentan con mayor frecuencia un vaginotipo IV⁶ lo que puede hacerlas más susceptibles a las VB, observándose altas tasas de recurrencia tras el tratamiento antimicrobiano. Las mujeres seropositivas con VB cuentan con una microbiota más variada en comparación con las seronegativas con VB, probablemente por la depresión de su sistema inmune¹²⁶. Gosmann C et al¹²⁷, publicaron un estudio prospectivo donde siguieron a 236 mujeres seronegativas sudafricanas por un año realizando muestreos vaginales y sanguíneos periódicos. El 10% de las mujeres presentaron un ecosistema vaginal dominado por *L. crispatus* (Grupo 1), 32% por *L. iners* (Grupo 2), y el resto, contaban con microbiotas con gran variedad microbiana, pobre en *Lactobacillus* y prevalencia de *Gardnerella* (Grupo 3) u otras bacterias (Grupo 4)¹²⁷. La muestra seleccionada era homogénea en cuanto a factores de riesgo como número de parejas y prácticas sexuales, uso de preservativo, anticoncepción con progesterona depot e incidencia de enfermedades de transmisión sexual excepto *Chlamydia* (más frecuente en el grupo 4)¹²⁷. Al finalizar el estudio, 31 mujeres resultaron infectadas por el VIH, de las cuales ninguna pertenecía al Grupo 1, un 29% era del Grupo 2 y el resto estaban adjudicadas a los Grupos 3 y 4¹²⁷. Los géneros *Prevotella*, *Mycoplasma*, *Veillonella* y *Sneathia* se relacionaron de forma positiva con el VIH¹²⁷. Los autores observaron que el riesgo de adquirir la infección se incrementa por cuatro para las mujeres con mayor diversidad microbiana con prevalencia de anaerobios distintos de *Gardnerella* y

depleción lactobacilar (Grupo 4), hecho que expone a un riesgo potencial de adquisición del virus a más de la mitad de su población¹²⁷. Este hecho está respaldado por el hallazgo de 17 veces más linfocitos T CD4+ CCR5+ (células diana del VIH) que las del Grupo 1 y aumento de las citoquinas que atraen a estas células¹²⁷.

Sha BE et al¹²⁸, presentaron un estudio en el que se obtuvieron muestras vaginales de mujeres con VIH con y sin VB. No se encontraron variaciones de carga viral ni linfocitos CD4 en plasma entre ambos grupos de pacientes¹²⁸. Tras la cuantificación de la presencia de patógenos mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), destacó una correlación negativa entre la población lactobacilar y la concentración del VIH en las muestras, y positiva, entre esta y el *Virus Herpes Simplex (VHS)*, *Micoplasma hominis* y *Candida*¹²⁸. Por tanto, alteraciones en la homeostasis de la microbiota vaginal en pacientes seropositivas, pueden resultar en una mayor diseminación del virus y riesgo de contagio a sus parejas sexuales y a su descendencia durante el parto¹²⁸. Nunn LK et al, encontraron que las pacientes con un ecosistema vaginal dominado por *Lactobacillus crispatus* cuentan con secreciones vaginales ricas en ácido láctico-D que presenta una mayor restricción a la diseminación del VIH-1, impidiendo su acceso a las células epiteliales vaginales¹²⁹. El caso contrario se observó en las microbiotas dominadas por *Lactobacillus iners* o *Gardnerella* con moco vaginal pobre en este ácido¹²⁹.

En el 2010, se realizó uno de los pocos estudios existentes hasta el momento empleando probióticos en mujeres africanas VIH positivo con disbiosis vaginal¹³⁰. Las que presentaban VB, previamente se les administró metronidazol oral por 10 días, y posteriormente, cápsulas orales con *L. rhamnosus* GR-1 y *L. reuteri* RC-14 (2×10^9 UFC/12h/6 meses) vs placebo¹³⁰. La tasa de curación de la VB tras el metronidazol fue de solo 28% a las 5 semanas (valores significativamente más bajos que en mujeres sin VIH), sin diferencias entre el grupo probiótico vs placebo¹³⁰. En la semana 15 de seguimiento, se observó una predisposición a una microbiota vaginal normal con mayor frecuencia en el grupo probiótico (53% vs 25%, $p=0.08$) lo que puede ayudar a prevenir la VB a largo plazo¹³⁰. A pesar de que no se encontró una asociación entre la tasa de curación y los niveles de

linfocitos CD4, deben existir factores inmunitarios que dificulten la resolución de esta disbiosis en las pacientes seropositivas¹³⁰.

En 2013, Mitchell et al¹³¹ realizaron un estudio en 104 mujeres *VIH-1* positivo de las que se obtuvieron muestras de lavado vaginal para cuantificar la carga viral y estudiar la población de *Lactobacillus* mediante 16s rARN. Se observó que el riesgo de eliminación vaginal del virus en mujeres sin tratamiento antirretroviral (TAR) era un 35% menor en las colonizadas por *L. crispatus*. En pacientes con TAR, la detección del *VIH* era menor si el *L. jensenii* estaba presente y aumentaba cuando se aislaban bacterias relacionadas con la VB¹³¹. Además, la VC fue la única disbiosis vaginal que se correlacionó de forma estadísticamente significativa con la excreción viral, lo que puede estar asociado con un estado proinflamatorio persistente¹³¹. En resumen, la diseminación del *VIH-1* aumentó en los estados de disbiosis vaginal, de forma independiente al empleo o no de la TAR y algunas especies de *Lactobacillus* pueden ser protectoras contra esta afección. Resultados similares fueron encontrados en el estudio de Borgdorff H et al en el 2014¹³², en el que observaron que en las pacientes con microbiota dominada por *L. crispatus*, y *L. iners* en menor medida, existía una menor detección vaginal del *VIH* (10% vs 40% de las pacientes con microbiotas dominadas por anaerobios). Las microbiotas con alta concentración de *L. crispatus* también presentaron menos *VPH*, *VHS-2* y no presentaron otras enfermedades de transmisión sexual¹³². Por último, los autores mencionan que sería recomendable tratar a las pacientes con alteraciones de la microbiota vaginal aunque se encuentren asintomáticas, sobre todo si son seropositivas o cuentan con malos antecedentes obstétricos, vaginosis recurrente, profesiones de riesgo, entre otros¹³².

Dizzel S et al¹³³, realizaron un estudio in vitro donde se cultivaron células epiteliales cervicales y endometriales extraídas de mujeres que se sometieron a una histerectomía y se les trató con estradiol, progesterona, medroxiprogesterona y con las especies *Lactobacillus reuteri* RC-14 y *L. rhamnosus* GR-1. Posteriormente se añadió *VIH-1* a dichos cultivos y se observó su efecto en la función de la barrera epitelial¹³³. La combinación de estradiol más las cepas de *Lactobacillus*

presentó el mayor beneficio para el mantenimiento de la función epitelial y disminución del ambiente inflamatorio¹³³.

Por último, se está trabajando en la modificación genética de especies de *Lactobacillus* para que expresen productos anti-*VIH* aunque aún no han sido probados en humanos. Wei W et al¹³⁴, presentaron un estudio in vitro y en modelo animal con *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 modificado para expresar la proteína CD4 que se une a gp120 del *VIH-1*. En los cultivos de tejidos, este *Lactobacillus* fue capaz de inhibir la infección viral. En el modelo animal, observaron una protección del 57% tras la instilación de los viriones vía rectal, pero no se obtuvo efecto vía vaginal¹³⁴. Los autores declaran que la falta de efectividad puede ser debida a que el ambiente ácido vaginal es capaz de inactivar la proteína CD4 y tampoco se conoce el potencial de colonización vaginal de la cepa modificada¹³⁴. Liu JJ et al¹³⁵ realizaron un estudio empleando *Lactobacillus reuteri* RC-14, cepa capaz de colonizar vagina, modificada para expresar proteínas que interfieren con 3 pasos claves para la penetración del virus en el epitelio (adhesión a CD4, CCR5 y la fusión de la membrana celular del *VIH*)¹³⁵. La cepa RC-14 modificada para exhibir la proteína CD4D1D2-similar a anticuerpo fue capaz de unirse in vitro al *VIH-1*¹³⁵.

En general, *Lactobacillus* como *L. crispatus* y *L. jensenii* cuentan con diversas herramientas contra el *VIH* como la acidificación del medio mediante la producción de ácido láctico, liberación de peróxido de hidrógeno, producción de bacteriocinas e interferencia de su unión al epitelio. En el futuro, se deberían iniciar nuevas líneas de investigación con probióticos vía oral y vaginal con estas especies y otras específicamente modificadas mediante ingeniería genética para actuar contra el virus y así, prevenir a largo plazo la diseminación de un virus tan prevalente como este, sobre todo en poblaciones de riesgo.

2.8 Microbiota y embarazo

2.8.1 Generalidades

El embarazo representa una época de grandes variaciones hormonales que pueden generar cambios importantes en la microbiota vaginal e intestinal, además de la influencia que puede tener la carga genética del individuo, etnia, dieta y otros factores ambientales. Debido al incremento de los estrógenos, existe una mayor disponibilidad de glucógeno en el epitelio vaginal, lo que contribuye en parte a la acidificación del medio junto con el ácido láctico producido por la población lactobacilar. El estudio de Romero R et al¹⁵, compara la microecología vaginal de mujeres embarazadas y no embarazadas fértiles, observando que las primeras presentan un patrón de microorganismos muy estable que varían principalmente entre el vaginotipo I (*L. crispatus*) y el III (*L. iners*), con baja incidencia del tipo IV (diversidad microbiana). Además, se evidenció un aumento en la concentración de *Lactobacillus* y una menor cantidad de especies relacionadas con la VB en comparación con las no gestantes¹⁵. Otro estudio¹³⁶ observó una disminución en la diversidad alfa bacteriana vaginal en los casos de parto pretérmino vs gestantes con parto a término caucásicas. Por el contrario, se determinó un aumento en la diversidad microbiana vaginal de gestantes de raza negra e hispana¹³⁶, de forma idéntica a los hallazgos del estudio de Ravel J et al realizado en mujeres no gestantes, donde el vaginotipo IV se encontró con más frecuencia en estas poblaciones⁶.

La VB se ha visto asociada, aunque de forma contradictoria, a efectos adversos en el embarazo como el parto pretérmino (PP)³. Meis PJ et al¹³⁷, estudiaron cerca de 3000 gestantes a las que se les tomó una muestra vaginal a las 24 y 28 semanas, observando una asociación entre la VB a las 28 semanas con el PP de forma estadísticamente significativa (OR 1.84, IC 95% 1.15 - 2.95, $p < 0.01$). Sin embargo, es posible que la VB no sea el único agente causal del parto pretérmino¹³⁷. Por otro lado, no se ha visto un impacto en el tratamiento de la VB sobre el riesgo de parto pretérmino³. Finalmente, no se encontró asociación entre la tricomoniasis y el PP¹³⁷.

Durante el embarazo, el arsenal de antimicrobianos disponibles para el tratamiento de los estados de disbiosis se estrecha mucho por su perfil de seguridad, además del impacto que estos tienen en la microbiota vaginal e intestinal. Por tanto, se precisa de herramientas seguras para su administración durante el embarazo como los probióticos. La Tabla 9 refleja los regímenes de probióticos que han resultado efectivos en el embarazo de forma significativa. En este sentido, Nishijima K et al¹³⁸ realizaron un ensayo en gestantes de >35 semanas a las cuales les administró leche fermentada enriquecida con *Lactobacillus johnsonii* La1 1×10^9 UFC/día/2 semanas vs placebo (leche fermentada). Tras el análisis de las muestras de la última visita, se encontró una mayor concentración lactobacilar vaginal en el grupo probiótico¹³⁸. Además se observó una disminución de géneros patógenos como *Gardnerella* y *Corynebacterium* en el grupo probiótico (visita basal 4/12 pacientes positivos vs última visita 0/12 pacientes positivos para estos microorganismos)¹³⁸. Sin embargo, en el grupo placebo estas bacterias permanecieron sin cambios, con 3/12 pacientes positivas al inicio y al final del periodo de seguimiento¹³⁸. Tal como mencionamos en el apartado 2.7.1 Vaginosis bacteriana, Parent D et al⁷⁶ realizaron un tratamiento vaginal para la VB con *Lactobacillus acidophilus* (10^7 UFC) + 0.03mg de estriol + 600mg de lactosa/ 12-24h/ 6 días en mujeres gestantes y no gestantes, observando tasas de curación significativamente más elevadas en el grupo probiótico en comparación con el grupo placebo.

Aunque con menos éxito, Husain S et al¹³⁹ administraron comprimidos orales probióticos con *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 y *Lactobacillus reuteri* RC-14 (2.5×10^9 UFC de cada uno) vs placebo en 238 gestantes desde la semana 9-14 de embarazo hasta el parto. No existieron cambios en el porcentaje de VB según escala Nugent entre ambos grupos en la semana 18-20 ni en la 34-36 semanas¹³⁹. En la semana 18-20, tras la secuenciación del gen 16S rARN, no se observaron cambios en la composición de la microbiota vaginal, en la incidencia de colonización por *Streptococcus agalactiae* B, *Escherichia coli*, ni en la concentración de las cepas probióticas administradas (los valores de GR-1 permanecieron estables y no se detectó RC-14)¹³⁹. La incidencia de aborto espontáneo y PP entre ambos grupos no fue estadísticamente significativa (1 en el grupo placebo vs 3 casos en el grupo probiótico y 9 vs 8 casos respectivamente)¹³⁹. Sharpe M et al¹⁴⁰, llevaron a

cabo un ensayo con las mismas concentraciones y cepas probióticas orales a 110 gestantes desde la semana 23-25 por 12 semanas y evaluaron la incidencia del estatus de portador del *Streptococcus agalactiae* B determinado en la semana 35-37 de embarazo. Al igual que en el estudio de Husain S et al, no se encontraron diferencias entre el grupo probiótico vs placebo (15.8 vs 21.43%, $p=0,48$)¹⁴⁰. Una vez más, el tratamiento resultó seguro para su administración en el embarazo¹⁴⁰. Mantaring J et al¹⁴¹, publicaron un estudio donde randomizaron a 208 gestantes en 3 grupos: Grupo 1, suplementos alimenticios de 140kcal; Grupo 2, suplementos más probióticos; Grupo C, placebo. Las pacientes tomaron los comprimidos asignados dos veces al día desde la semana 24-28 hasta el segundo mes de lactancia como mínimo¹⁴¹. La formulación probiótica contaba con *Bifidobacterium lactis* CNCC I-3446 y *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1.3724 (7×10^8 UFC de cada uno)¹⁴¹. No se observaron diferencias en cuanto a episodios de diarrea del neonato, ganancia ponderal materna al final del embarazo ni número de complicaciones del embarazo¹⁴¹. Al año de vida, se encontró mayor peso y talla en los Grupos 1 y 2 en comparación con el Grupo 3 de forma significativa¹⁴¹. El tratamiento administrado resultó seguro durante el embarazo y lactancia¹⁴¹.

2.8.2 Diabetes gestacional y probióticos

El estado de la microbiota intestinal puede tener repercusiones metabólicas importantes, especialmente en grupos de riesgo como las embarazadas, donde existe una tendencia a la resistencia insulínica e intolerancia a la glucosa. En un reciente estudio¹⁴², se observó que la microbiota fecal de mujeres con diabetes gestacional (DG) y hasta 8 meses tras el parto se ve alterada en comparación con gestantes sanas, de manera similar a la encontrada en pacientes con diabetes mellitus tipo 2. Se aisló mayor concentración de *Faecalibacterium* y *Anaerotruncus*, así como disminución de *Clostridium* y *Veillonella*¹⁴². Géneros como *Akkermansia* se correlacionaron con una mayor resistencia a la insulina y *Christensenella* con más hiperglucemias en el ayuno¹⁴².

Resulta evidente la importancia en la disminución de la incidencia de la DG por las graves repercusiones que pueden tener sobre el embarazo y el recién nacido, tales como macrosomía, distocia de hombros, preeclampsia, PP, parto por

cesárea, riesgo de diabetes mellitus tipo 2 en la madre y el neonato, entre otros¹⁴³. Habitualmente, se aconseja seguir una dieta estricta y realizar ejercicio físico para controlar los niveles de glucemia, pero estas estrategias representan un cambio de hábitos de vida importante que suelen tener baja adherencia. Los probióticos pueden formar parte de nuestro arsenal terapéutico disponible para su administración en gestantes de riesgo de forma segura.

En esta línea, un meta-análisis realizado en el 2018⁶⁷ encontró en gestantes sanas y con DG una asociación inversa entre la ingesta de probióticos y la insulinemia durante el ayuno (OR -3.76, $p < 0.00001$ y OR -2.94, $p = 0.04$, respectivamente), al igual que la resistencia insulínica (HOMA-IR) (OR -0.57, $p = 0.03$ y OR -0.65, $p = 0.02$, respectivamente) de forma estadísticamente significativa. Para ello se incluyeron estudios donde se administraron los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en concentraciones de 10^7 - 10^{10} ⁶⁷. No se observaron beneficios en cuanto al perfil lipídico de las gestantes⁶⁷. A diferencia de otros estudios en población general, no se observó una disminución de la glucemia en ayunas⁶⁷. No efectos en el peso al nacimiento de los recién nacidos en los estudios realizados en gestantes con DG⁶⁷. Sin embargo, muchos de ellos aportaron beneficios metabólicos a la gestante, lo que se podría traducir en disminución de la morbilidad futura en madre e hijo.

Dentro de este análisis sistemático, destaca el estudio de Luoto R et al del 2010⁶⁸, donde se randomizó a gestantes sanas dentro de 3 grupos desde el primer trimestre hasta finalizar la lactancia: Grupo A, formulación probiótica con *Lactobacillus rhamnosus* GG + *Bifidobacterium lactis* Bb12 (1×10^{10} UFC/día) + consejo dietético; Grupo B, placebo + consejo dietético; Grupo C, placebo. Se encontró una disminución en la incidencia de DG, con un porcentaje del 13% vs 36% vs 34% respectivamente ($p = 0.003$)⁶⁸. En el Grupo A y B, se detectó una disminución del peso y talla alta al nacimiento de forma significativa en comparación con el Grupo C, lo que puede ayudar a disminuir la casuística de obesidad infantil cada vez más frecuente actualmente⁶⁸. Además, Dolatkhah et al¹⁴⁴ realizaron un ensayo en gestantes con DG a las que se les administró una formulación probiótica con *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium* BB-12, *Streptococcus thermophilus* STY-31 y *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* LBY-27 con $> 4 \times 10^9$ UFC/día, desde el diagnóstico (24-28 semanas) hasta el parto por 8 semanas. Se obtuvieron

resultados estadísticamente significativos en cuanto a menor ganancia ponderal, menores glucemias en ayuno y menor índice de resistencia insulínica¹⁴⁴. Por último, el ensayo de Karamali M et al¹⁴⁵ ejecutado en mujeres con DG, empleó las especies *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum* a una concentración de 2×10^9 UFC/día vs placebo, desde el diagnóstico hasta el parto por 6 semanas. También presenta resultados de significancia estadística en disminución de glucemia en ayunas, insulinemia, HOMA-IR, triglicéridemia y VLDL¹⁴⁵.

2.8.3 Parto pretérmino y probióticos

La prematuridad puede tener graves consecuencias en la vida futura del neonato, desde retraso psicomotor y cognitivo, parálisis cerebral, distrés respiratorio hasta muerte neonatal precoz. Aunque frecuentemente la causa desencadenante es desconocida, puede estar asociada a infecciones subyacentes como la VB. Se ha visto que hasta un 70% de las gestantes con amenaza de parto prematuro (APP) presentan disbiosis vaginal, dentro de la cual, la VB representa el 50% de los casos¹⁴⁶. En el estudio de Hillier SL et al¹⁴⁷, encontraron una correlación estadísticamente significativa entre la VB y el PP de neonatos de bajo peso (OR 1,4; IC 95% 1.1-1.8) y el riesgo fue mayor cuando se aislaron *Bacteroides* y *Mycoplasma hominis* (OR 2,1; IC 95% 1,5-3).

El empleo de probióticos puede modular la reacción inflamatoria y la producción de prostaglandinas inducida por microorganismos patógenos, desplazarlos y estabilizar la microbiota vaginal para disminuir así el riesgo del ascenso de estos patógenos a la cavidad uterina¹⁴⁶. En la revisión Cochrane de Grev J et al del 2018¹⁴⁸, se analizaron 12 estudios realizados en gestantes de bajo riesgo de PP que tomaron probióticos antes de la semana 36 y hasta los 3 meses postparto. Los estudios incluyeron administración de probióticos orales con *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L.delbrueckii*, *L. salivarius* y el género *Bifidobacterium*, con dosis entre 10^8 - 10^{10} , durante > 6 semanas. Se concluye que no existe suficiente evidencia actual para afirmar que esta medida reporte un beneficio en gestantes de bajo riesgo en cuanto a prevención del PP de <34-37 semanas, reducción en la mortalidad del recién nacido ni diferencias en el peso al

nacimiento¹⁴⁸. De cualquier forma, resultó difícil comparar los estudios por la heterogeneidad existente en cuanto a cepas administradas, dosis, tiempo de administración, criterios de inclusión, entre otros¹⁴⁸. Una segunda revisión del 2012 incluyó 3 ensayos¹⁴⁹, donde se analizó el efecto de probióticos en el PP de <32-37 semanas sin resultados significativos. Los dos primeros estudios incluidos emplearon probióticos con *Lactobacillus johnsonii* La1 1×10^9 UFC/14 días y *L. rhamnosus* GG + *Bifidobacterium lactis* Bb12 1×10^{10} UFC/día de cada uno desde el primer trimestre hasta el final de la lactancia⁶⁸. No se encontraron mejorías en la incidencia de PP <32-37 semanas. En el estudio de Neri et al¹⁵⁰ incluido en esta revisión, se trató a gestantes del primer trimestre que padecían de VB con yogurt compuesto por *Lactobacillus acidophilus* vía vaginal $10\text{-}15 \times 10^8$ / 12h/ 7 días/ 2 ciclos separados por 7 días vs tampones de ácido acético vs placebo. El impacto de los probióticos vaginales sobre la reducción de la VB resultó beneficioso, con un porcentaje de curación del 87,5 vs 37,5% en el grupo de ácido acético vs 15% en el grupo placebo el primer mes y cuyo efecto persistió en el segundo mes de seguimiento¹⁵⁰.

Por otro lado, la normalización de la microbiota intestinal también puede tener un papel importante en la prevención del PP. Shiozaki A et al¹⁵¹, realizaron un estudio comparativo de microbiota intestinal y vaginal en pacientes con PP, APP y parto a término (PT) mediante la colección de muestras vaginales y de heces. Tras el análisis del gen 16s rARN presente en las muestras de heces, se observó en las pacientes con PP una disminución de algunas especies de *Clostridium* y *Bacteroides*, al igual que un incremento del orden *Lactobacillales* en comparación con el grupo PT¹⁵¹. Específicamente, las especies *Clostridium* subcluster XVIII y *Clostridium* subcluster XIVa se aislaron en concentraciones ascendentes desde las pacientes con PP < APP < PT¹⁵¹. Sin embargo, no se encontraron diferencias en cuanto a la microecología vaginal de estos grupos de pacientes¹⁵¹. En esta línea, Kirihara N et al¹⁵² desarrollaron un estudio retrospectivo donde se analizó el papel en la prevención del PP de una formulación probiótica oral, inicialmente administrada para prevenir la VB o el estreñimiento, desde la semana 12 aproximadamente y hasta el final de la gestación. Los comprimidos contaban con 3-6g de *Streptococcus faecalis*, *Clostridium butyricum* y *Bacillus mesentericus*¹⁵². El estudio incluyó a 121 pacientes de alto

riesgo, definido como acortamiento cervical de <20 semanas, antecedentes de PP <36 semanas o pérdidas gestacionales de >12 semanas¹⁵². Se realizó cerclaje si existía antecedente de incompetencia cervical o hallazgo de una longitud cervical de <25mm antes de la semana 22¹⁵². Al finalizar el estudio, se encontró una prolongación de la edad gestacional al nacimiento con una media de 36.8 vs 34.6 semanas, un porcentaje de nacimientos de <32 semanas del 2% vs 25% y una incidencia de corioamnionitis del 2% vs 15.8% (grupo probiótico vs no probiótico respectivamente)¹⁵². Se observó también una diferencia del peso del recién nacido al nacimiento superior a 300g a favor del grupo probiótico¹⁵². Por último, se determinó mediante cultivo la presencia de una microbiota vaginal normal en el 97.8% del grupo probiótico vs 74.6% del grupo no probiótico de las gestantes de >20 semanas¹⁵². Los autores comentan que la reducción del PP observada puede deberse a la menor incidencia de corioamnionitis y al efecto de los probióticos sobre el sistema inmune del huésped¹⁵². En esta línea, un estudio¹⁵³ demostró una depleción decidual de linfocitos T reguladores presente en las gestantes que sufrieron un PP o una rotura prematura de membranas pretérmino, al compararlas con aquellas que tuvieron un PT normal. Wilks M et al⁴³ determinaron mediante cultivo vaginal tomado en la semana 20 de embarazo, que las gestantes donde se aisló *L. jensenii* o *L. vaginalis* contaban con una menor incidencia de PP y/o corioamnionitis (20% vs 40%) y de VB (0% vs 19%) en comparación con aquellas donde estaban ausentes estas especies. Estos *Lactobacillus* demostraron ser unos de los que mayor cantidad de peróxido de hidrógeno producen, a lo cual puede atribuirse parte de su efecto⁴³. En otro estudio⁴⁵ se encontraron *Lactobacillus* productores de peróxido de hidrógeno en altas concentraciones en pacientes con y sin disbiosis, lo que puede estar relacionado con la cantidad producida por las especies presentes.

2.8.4 Neonatos, lactancia y probióticos

La microbiota del recién nacido es de origen materno y es adquirida intraútero a través de los microorganismos presentes en la placenta y líquido amniótico y, tras el nacimiento, mediante el contacto con las secreciones vaginales, orales, leche materna y piel. Los neonatos prematuros pueden tener una alteración y disminución de la variedad de microorganismos de su

microbiota debido a un mayor número de partos por cesárea, estancias hospitalarias y tratamientos antibióticos prolongados, entre otros¹⁵⁴. Esta menor diversidad y aumento de patógenos puede desencadenar una enterocolitis necrotizante con una elevada mortalidad y una incidencia en prematuros del 5-10%¹⁵⁴.

Así como la ingesta de probióticos en el adulto suele tener efecto a corto plazo, la modulación de la microbiota del neonato que generan estos tratamientos puede tener repercusiones a muy largo plazo como una menor incidencia de atopia, alergias alimentarias, enfermedad inflamatoria intestinal, obesidad, intolerancia hidrocarbonada, entre otros¹⁴⁸. AlFaleh K et al¹⁵⁵, realizaron una revisión sistemática donde incluyeron 24 estudios con recién nacidos pretérmino (<37 semanas) de <2500g, a los que se le administraron probióticos con *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Saccharomyces boulardii* (efectividad principalmente con los primeros por sí solos o en coadministración con los segundos) con dosis variables entre 10^6 - 10^9 . Se encontró una disminución significativa de más del 50% de los casos de enterocolitis necrotizante y un 35% en la mortalidad (RR de 0,4; IC 95% 0.33-0.56 y RR de 0,65; IC 0.52-0.81, respectivamente)¹⁵⁵. El empleo de probióticos resultó seguro en esta población¹⁵⁵. Los resultados obtenidos no se pueden generalizar para neonatos de <1kg¹⁵⁵.

A pesar de que los probióticos son considerados como seguros en población adulta, se debe tener precaución con su administración en recién nacidos pretérmino de muy bajo peso¹⁴⁸. Una alternativa para reducir los efectos adversos es la administración indirecta al lactante a través de la suplementación materna de probióticos, aunque se precisan más estudios para validar esta medida¹⁴⁸. Benor S et al¹⁵⁶, realizaron un estudio donde incluyeron 58 lactantes prematuros de madres que tomaban probióticos, con edad gestacional media al nacimiento de 29.5 semanas y <1500g de peso. El probiótico empleado estaba compuesto por *L. acidophilus* NCFM y *Bifidobacteria lactis* Bi-07 2×10^{10} UFC al día desde los primeros 3 días de vida vs placebo. No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a la mortalidad pero si una tendencia al beneficio en la incidencia de enterocolitis necrotizante (12% de casos del grupo probiótico vs 27% en el grupo placebo, $p=0.15$), tomando en cuenta que la

muestra estudiada fue reducida¹⁵⁶. Además, se observó que el tiempo que tardaban los lactantes en alcanzar la mitad de su nutrición vía enteral fue menor en el grupo probiótico pero sin alcanzar significancia estadística (40,3 vs 49,9 días, $p=0,25$)¹⁵⁶. El probiótico resultó seguro para su administración de forma indirecta en esta población¹⁵⁶.

En cuanto a la mastitis puerperal, Fernández L et al¹⁵⁷ realizaron un estudio en gestantes con antecedentes de mastitis puerperal a las que se les administró un probiótico vía oral con *Lactobacillus salivarius* PS2 10^9 UFC/día desde la semana 30 hasta el parto. La incidencia de mastitis en el grupo probiótico fue del 25% vs 57% ($p=0,001$) en el grupo placebo de forma estadísticamente significativa¹⁵⁷. Arroyo R et al¹⁵⁸, realizaron un estudio en mujeres con mastitis puerperal a las cuales trataron con: Grupo A, *L. fermentum* CECT5716 (10^9 UFC) vs Grupo B, *L. salivarius* CECT5713 (10^9 UFC) vs Grupo C, antibioterapia (amoxicilina +/- clavulánico, cloxacilina, eritromicina o cotrimoxazol) durante 21 días. La cantidad de bacterias presentes inicialmente en la leche materna fue similar en los tres grupos con ausencia de *Lactobacillus* y, tras 21 días, esta cantidad fue inferior en los grupos A y B que en el C¹⁵⁸. En más del 50% de los casos se detectaron las especies probióticas en la leche materna¹⁵⁸. Inicialmente, la puntuación del dolor fue de 2 (0=dolor intenso - 10=no dolor) y tras el periodo de seguimiento se observó una disminución del dolor mayor en los grupos probióticos (A y B=8,6 vs C=5,8, $p=0,001$)¹⁵⁸. Al combinar el porcentaje de recurrencias observado a los 3 meses de A y B, estas resultaron menores que las del Grupo C de forma significativa (8,8% vs 30,7%)¹⁵⁸. Por tanto, la administración de probióticos resultó una medida eficaz para el tratamiento de la mastitis puerperal y futuros estudios dictaminaran si es posible su empleo como alternativa a los antimicrobianos en la práctica clínica habitual¹⁵⁸.

| Estudio y objetivo | Pauta de tratamiento | Resultados |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Microbiota vaginal Nishijima K et al ¹³⁸ (Prospectivo, controlado, randomizado) | VO leche fermentada enriquecida con <i>Lactobacillus johnsonii</i> La1 (1x10 ⁹ UFC/ 2 semanas) vs placebo (leche fermentada). | -Mayor concentración lactobacilar vaginal en el grupo probiótico. -Disminución de géneros patógenos como <i>Gardnerella</i> y <i>Corynebacterium</i> (visita basal 4/12- última visita 0/12 pacientes positivos). |
| Kirihara N et al ¹⁵² (estudio retrospectivo) | VO <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Clostridium butyricum</i> y <i>Bacillus mesentericus</i> (3-6g en total) vs no probiótico, desde semana 12 aproximadamente-parto. | Microbiota vaginal normal en el 97.8% del grupo probiótico vs 74.6% del grupo no probiótico de las gestantes de >20 semanas. |
| VB Neri et al ¹⁵⁰ (Prospectivo, controlado, randomizado). | VV yogurt con <i>Lactobacillus acidophilus</i> (10-15x10 ⁸ / 12h/ 7 días/ 2 ciclos separados 7 días) vs tampones con ácido acético vs placebo, en gestantes del primer trimestre. | Curación del 87,5 grupo probiótico vs 37,5% grupo de ácido acético vs 15% grupo placebo el primer mes. Efecto persiste en el segundo mes de seguimiento. |
| Parent D et al ⁷⁶ (Prospectivo, controlado, randomizado) | VV <i>Lactobacillus acidophilus</i> (10 ⁷ UFC) + 0.03mg de estriol + 600mg de lactosa vs placebo/ 12-24h/ 6 días. | Tasa de curación de la VB del grupo probiótico 77% vs 25% grupo placebo y del 88% vs 22% en el día 14 y 28 de seguimiento respectivamente. |
| Diabetes gestacional Zheng J et al ⁶⁷ Meta-análisis | En el meta-análisis se incluyeron 10 estudios donde se emplearon los géneros <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i> (concentraciones de 10 ⁷ -10 ¹⁰). | En gestantes sanas y con DG: -Asociación inversa entre la ingesta de probióticos e insulinemia durante el ayuno (OR -3.76, p <0.00001 y OR -2.94, p=0,04, respectivamente), al igual que con el HOMA-IR (OR -0.57, p=0.03 y OR -0.65, p=0,02, respectivamente). |
| Luoto R et al ⁶⁸ (Prospectivo, doble ciego, controlado, randomizado) | VO A) <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG + <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb12 (1x10 ¹⁰ UFC/día) + consejo dietético vs B) dieta + placebo vs C) placebo, desde el primer trimestre hasta el fin de la lactancia. | En gestantes sanas: -Menor incidencia de diabetes gestacional (13% grupo probiótico + dieta vs 36% grupo dieta + placebo vs 34% grupo placebo, p<0,003). -Disminución del peso y talla alta al nacimiento (p<0,035 y p<0,028, respectivamente). |
| Dolatkhah et al ¹⁴⁴ (Prospectivo, doble ciego, controlado, randomizado) | VO <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5, <i>Bifidobacterium</i> BB-12, <i>Streptococcus thermophilus</i> STY-31, <i>Lactobacillus delbrueckii bulgaricus</i> LBY-27 (> 4 x 10 ⁹ UFC/día) vs placebo, desde 24-28 semanas hasta el parto por 8 semanas. | En gestantes con DG: -Menor ganancia ponderal(p<0,05). -Menor glucemia en ayunas (p<0,05). -Menor HOMA-IR (p<0,05). |

| | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Karamali M et al ¹⁴⁵ (Prospectivo, doble ciego, controlado, randomizado) | VO <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> (2×10^9 UFC/día) vs placebo, desde el diagnóstico hasta el parto por 6 semanas. | En gestantes con DG: -Menor glucemia en ayunas ($p < 0,001$). -Menor insulínemia ($p < 0,01$). -Menor HOMA-IR ($p < 0,003$). -Menor triglicéridemia y VLDL ($p < 0,003$). |
| Parto pretérmino Kiriha N et al ¹⁵² (estudio retrospectivo) | VO <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Clostridium butyricum</i> y <i>Bacillus mesentericus</i> (3-6g en total) vs no probiótico, desde semana 12 aproximadamente-parto. | -Mayor edad gestacional al nacimiento con 36.8 vs 34.6 semanas ($p < 0,01$). -Menos nacimientos de <32 semanas (2% vs 25%, $p < 0,001$). -Menos corioamnionitis (2% grupo probiótico vs 15.8% no probiótico, $p < 0,03$). -Mayor peso al nacimiento (300g más en grupo probiótico, $p < 0,02$). |
| Enterocolitis necrotizante prematuros AlFaleh K et al ¹⁵⁵ (revisión sistemática) | VO <i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> y <i>Saccharomyces boulardii</i> (efectividad principalmente con los primeros por sí solos o con los segundos). | -Disminución de más del 50% de enterocolitis necrotizante (RR 0,4, IC 95% 0.33-0.56) -Disminución del 35% de la mortalidad (RR 0,65, IC 0.52-0.81). |
| Benor S et al ¹⁵⁶ (Prospectivo, doble ciego, controlado, randomizado) | VO <i>L. acidophilus</i> NCFM y <i>Bifidobacteria lactis</i> Bi-07 (2×10^{10} UFC/día) vs placebo, desde 3º día de vida. | -Tendencia al beneficio en incidencia de enterocolitis necrotizante (4% grupo probiótico vs 18.2% grupo placebo, $p = 0,12$). -Acortamiento del tiempo que tardan los lactantes en alcanzar la mitad de su nutrición vía enteral en grupo probiótico (40,3 vs 49,9 días, $p = 0,25$). |
| Lactancia Fernández L et al (Prospectivo, doble-ciego, controlado, randomizado) ¹⁵⁷ | VO <i>Lactobacillus salivarius</i> PS2 (10^9 UFC/día) vs placebo, de semana 30-parto. | Menor incidencia de mastitis (25% grupo probiótico vs 57% grupo placebo, $p < 0,001$) |
| Arroyo R et al ¹⁵⁸ (Prospectivo, controlado con antibioterapia, randomizado) | VO A) <i>L. fermentum</i> CECT5716 (10^9 UFC/día) vs B) <i>L. salivarius</i> CECT5713 (10^9 UFC/día) por 21 días vs C) Antibioterapia. | -Menor recurrencias de mastitis en grupos probióticos 8,8% vs 30,7% grupo antibiótico. -Mayor disminución del dolor en los grupos probióticos (A y B=8,6 vs C=5,8, $p = 0,001$). |

Tabla 9. Tratamientos probióticos que reportaron beneficios en el embarazo y lactancia. VO= vía oral. VV=vía vaginal. RR= Riesgo Relativo. IC=Intervalo de confianza. VB= Vaginosis bacteriana. HOMA-IR= Modelo homeostático para evaluar la resistencia insulínica.

2.9 Microbiota y fertilidad

El fallo de implantación es uno de los mayores problemas que existe actualmente en el campo de la fertilidad. Existen una serie de factores que se han visto relacionados con el fallo de implantación como lo son las alteraciones genéticas en los embriones transferidos, trombofilias, patología tiroidea, alteraciones endometriales, hidrosalpinx, entre otros¹⁷. En cuanto al factor embrionario, Harton GL et al¹⁵⁹ encontraron una tasa de implantación alrededor del 40% cuando se transferían embriones euploides, sin que existieran diferencias relacionadas con la edad de las pacientes hasta los 42 años. Por lo tanto, en casi la mitad de los casos, el fracaso del tratamiento se debe a otros factores distintos al embrionario y la edad de la paciente¹⁵⁹.

Como mencionamos anteriormente, el endometrio cuenta con una menor concentración pero mayor diversidad bacteriana al compararlo con la microbiota vaginal⁴. Los microorganismos más frecuentemente encontrados son *Lactobacillus*^{30,17,18}, *Prevotella*^{30,17,18}, *Acinetobacteria*⁴, *Bacteroidetes*⁴, *Proteobacteria*⁴, *Gardnerella*^{17,18}, *Bifidobacterium*^{17,18}, *Streptococcus*^{17,18}, *Atopobium*¹⁷, *Sneathia*¹⁷, *Staphilococcus*¹⁷, entre otros.

Existen varios estudios donde se ha encontrado una correlación entre el tipo de microbiota endometrial y los resultados reproductivos. Moreno I et al¹⁸ presentó un estudio en el que observaron que a pesar de un estado de buena receptividad endometrial, en casos de prevalencia de otras especies distintas a los *Lactobacillus* las tasas de implantación descendían del 60% al 23%, el porcentaje de embarazos evolutivos disminuía aún más de aproximadamente 60% al 13% y el de recién nacido vivo caía drásticamente de casi un 60% al 7%. Estos resultados se vieron con mayor frecuencia en los casos donde se aislaron los géneros *Gardnerella* y *Streptococcus*¹⁸. Además, no encontraron variaciones entre la microbiota de estados endometriales pre-receptivos y los receptivos en 81% de las pacientes, por lo que concluyen que ésta no se ve influenciada por los cambios hormonales¹⁸. Tampoco se observaron modificaciones de la microecología con los cambios de pH¹⁸. Por último, solo el grupo de pacientes en el que coincidió un estado de

receptividad endometrial más una predominancia de *Lactobacillus* obtuvieron un embarazo evolutivo¹⁸.

Kyono k et al¹⁷, encontraron similares resultados en un estudio realizado en población asiática, donde existía un menor porcentaje de microbiotas endometriales con predominancia lactobacilar en las pacientes sometidas a un tratamiento de fertilización in vitro (FIV) que en las mujeres infértiles a las que no se les realizó FIV y en voluntarias sanas (38% vs 73% vs 85% respectivamente). Entre los factores que pueden explicar estos hallazgos podemos mencionar una mayor manipulación vaginal y procedimientos invasivos, tratamientos antibióticos prolongados, variaciones hormonales e infertilidad de mayor evolución¹⁷. El grupo de mujeres que consiguieron una gestación durante el estudio, en su mayoría, contaban con porcentajes elevados de *Lactobacillus* en vagina y endometrio (96-97% respectivamente)¹⁷. Además, la mayoría de los casos que contaban con una microbiota baja en *Lactobacillus* a nivel endometrial también la presentaban a nivel vaginal¹⁷. No se encontraron diferencias relacionadas con la edad¹⁷. Por último, es importante destacar que es posible que los microorganismos distintos a *Lactobacillus* presentes puedan ser comensales y no patógenos del endometrio, pero que de igual manera tengan un efecto negativo en las tasas de éxito de embarazo¹⁷.

Moore DE et al¹⁶⁰, publicaron los resultados de un estudio de pacientes en tratamiento FIV a las que se les realizaron cultivos vaginales y del catéter de transferencia embrionaria. Observaron un 88% de recién nacidos vivos en las mujeres con una microbiota rica en *Lactobacillus* secretores de peróxido de hidrógeno tanto en vagina como en el catéter de transferencia embrionaria¹⁶⁰. Sin embargo, en los casos donde se detectó *Streptococcus viridans* la tasa de embarazo fue solo de un 7%¹⁶⁰. No encontraron diferencias en la microbiota vaginal con la administración de doxiciclina profiláctica previo a la transferencia¹⁶⁰. Los autores concluyen que es posible que una mínima respuesta inflamatoria a organismos patógenos endometriales pueda disminuir las tasas de embarazo¹⁶⁰.

Koedooder R et al¹⁶¹, proponen un modelo predictivo de éxito de transferencia embrionaria que consiste en el estudio de la microbiota vaginal de las pacientes dos meses previos al tratamiento de fertilidad y, en caso de obtenerse una microbiota desfavorable, posponer el ciclo hasta un cambio en la microecología vaginal. Los autores definen como perfil desfavorable de

microbiota vaginal aquella con <20% de *Lactobacillus*, >35% de *Lactobacillus jensenii*, aislamiento de *Gardnerella vaginalis* IST I (Interspace profiling technique I) o *Proteobacterias* >28% de la carga bacteriana total¹⁶¹. Éste patrón contó con solo un 6% de éxito de la transferencia embrionaria con una sensibilidad baja pero una especificidad de un 97%¹⁶¹. Por otro lado, el perfil favorable se puede dividir en dos subgrupos donde un porcentaje superior al 60% de *L. crispatus* cuenta con una probabilidad de embarazo del 24% y, cuando es menor de esta cifra, la probabilidad asciende a un 53%¹⁶¹. Según el vaginotipo, encontraron que los tipos IV y V contaban con porcentajes del 70 y 100% de fracaso de la técnica de reproducción, observándose cifras más bajas en el resto de vaginotipos¹⁶¹. En resumen, la dominancia vaginal de *L. crispatus* y un perfil desfavorable de microbiota vaginal contaron con 3 y 7 veces menor tasa de embarazo que el resto de pacientes respectivamente.

Por último, la presencia de ciertas citoquinas y ambientes proinflamatorios endometriales se han visto asociados con la infertilidad¹⁶². Chenoll E et al¹⁶² realizaron un estudio in vitro con cultivos de células endometriales extraídas de mujeres premenopáusicas. Los autores observaron que la adición de la cepa probiótica *L. rhamnosus* CECT 8800 (1x10⁶ UFC/ml) causó una disminución de citoquinas inflamatorias, normalmente propiciadas por bacterias patógenas como IL-6, IL-8, MCP-1 (Proteína Quimiotáctica de Monocitos-1) e incrementó las citoquinas antiinflamatorias IL-1RA e IL-1 beta en co-cultivo con *A. vaginae*, *G. vaginalis* y *S. agalactie*¹⁶². Además, CECT 8800 fue capaz de disminuir el pH, producir ácido láctico y disminuir la presencia de *Propionibacterium acnes* CECT 5684 y *Streptococcus agalactie* CECT 183¹⁶². La depleción observada de *Gardnerella vaginalis* DSM 4944 y de *Atopobium vaginae* DSM 15829 no fue significativa¹⁶². Por último, se estudió el perfil de seguridad de esta cepa probiótica en modelo animal sin hallazgos patológicos¹⁶². El estudio no evaluó la capacidad de producción de peróxido de hidrógeno o bacteriocinas de esta cepa¹⁶².

En conclusión, el estado de la microbiota vaginal juega un papel muy importante en los resultados de las técnicas de reproducción asistida y las tasas de embarazos evolutivos. Las microbiotas con dominancia lactobacilar suelen ser beneficiosas, pero un aumento en la concentración de *L. crispatus* (vaginotipo I) o *L. jensenii* (vaginotipo V), al igual que la diversidad bacteriana (vaginotipo IV)

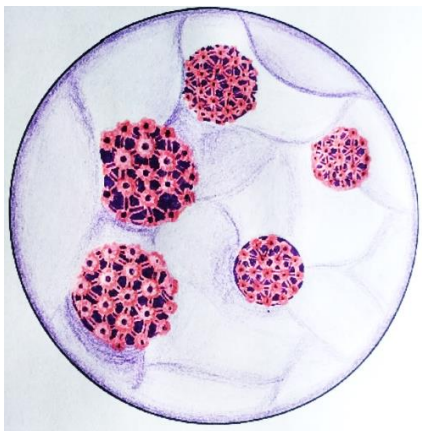
puede ir asociado a peores resultados reproductivos¹⁶¹. El modelo predictivo de éxito en los tratamientos de fertilidad diseñado por Koedooder R et al¹⁶¹, resulta una alternativa interesante y un paso más hacia la medicina personalizada, a falta de más estudios que lo validen para su empleo en la práctica clínica habitual. Finalmente, se necesitan más ensayos para evaluar el potencial efecto de los probióticos específicamente diseñados para la optimización de la microbiota endometrial previo a tratamientos de reproducción, como la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800, y su impacto en la eficacia de los mismos.

2.10 Microbiota y cáncer ginecológico

La evidencia del impacto del estado de la microbiota en el cáncer no es insignificante, especialmente si tenemos en cuenta que alrededor del 15-18% de los casos se han asociado con un microorganismo como el *Virus de la Hepatitis B* y *C* en el cáncer hepático, *Helicobacter pylori* en el cáncer gástrico, *VPH* en el cáncer cervical, vulvar, vaginal, anal, orofaríngeo y de pene, entre otros¹⁶³⁻¹⁶⁶.

2.10.1 Cáncer de cérvix

El cáncer de cérvix es el segundo en frecuencia de las neoplasias ginecológicas tras el cáncer de mama, con una incidencia de 569.800 casos y una mortalidad atribuida de 311.400 casos en todo el mundo en el 2018¹⁶⁷.



El *VPH* infecta alrededor del 75% de las mujeres sexualmente activas¹⁶⁸. La mayor parte de estas infecciones son temporales y se solucionan espontáneamente en menos de dos años¹⁶⁹. La persistencia de genotipos de alto riesgo del *VPH* es el principal factor de riesgo para el desarrollo del cáncer de cuello uterino y sus lesiones precursoras¹⁶⁹. También está asociado a las neoplasias intraepiteliales vulvares de tipo común, verrugas anogenitales y papilomatosis respiratoria recurrente¹⁶³.

Existen una serie de factores relacionados con un mayor riesgo de persistencia de la infección viral como la inmunodepresión (sobre todo la causada por el VIH), edad mayor de 30 años, genotipo viral 16, carga viral, anticonceptivos orales, tabaquismo, multiparidad y coexistencia con otras enfermedades de transmisión sexual como la causada por el VHS tipo 2 y *Chlamydia trachomatis*^{168,170}.

2.10.1.1 Microbiota y persistencia del VPH

En los últimos años ha surgido nueva evidencia que sugiere que el estado de la microbiota vaginal juega un papel muy importante en la persistencia o la eliminación del VPH. La disbiosis vaginal crea un ambiente propicio para distintos patógenos que generan un ambiente de inflamación persistente que fomenta la carcinogénesis⁴⁹. Además existe un mayor estrés oxidativo que puede facilitar la integración del VPH en el ADN de las células del huésped, paso necesario para la progresión de las lesiones intraepiteliales cervicales (CIN)². Según un meta-análisis realizado en el 2011, en las mujeres con VB de repetición hay mayor detección del VPH (OR 1.4), pero no está claro si este propicia la disbiosis o sucede a la inversa¹⁷¹. Por otro lado, la VB provoca un aumento de las enzimas que desintegran la mucina presente en el flujo vaginal, eliminando así la capa de protección natural del epitelio y generando pequeñas lesiones en el mismo, haciéndolo más vulnerable a la penetración del VPH¹⁷¹. También se cree que la VB puede estar relacionada con la persistencia y reactivación viral debido a la escasa respuesta inmune local y depleción de leucocitos vaginales que se observa en esta disbiosis¹⁷¹.

Según la evidencia científica disponible actualmente, las especies de microorganismos que se han visto relacionadas de manera positiva y negativa con el VPH y las lesiones que éste origina se encuentran reflejadas en la Tabla 10. Entre las especies asociadas con la persistencia viral cabe destacar el *L. iners* que, a diferencia de otros de su género, carece de un elemento esencial con efecto bactericida y viricida como el peróxido de hidrógeno^{2,44}. Además, *L. iners* segrega ácido láctico-L, que cuando es predominante sobre la otra isoforma producida por *L. crispatus*, ácido láctico-D, activan proteinasas que alteran la barrera epitelial cervical permitiendo la penetrancia del VPH¹⁷². Por último, esta especie no

presenta una defensa adecuada frente a anaerobios y forma parte de un vaginotipo de transición entre la normalidad y la disbiosis⁶.

Por otro lado, *L. crispatus* es la especie respaldada por un mayor número de estudios por presentar una mayor asociación inversa entre CIN y VPH^{12,173-175}. Este microorganismo es el predominante en el vaginotipo I⁶ que cuenta con el pH más ácido de todos, produce peróxido de hidrógeno, y además, presenta una resistencia importante a la presencia de otras bacterias². Un reciente meta-análisis¹⁷³ muestra la asociación inversa entre la disminución de la población de *Lactobacillus*, especialmente de *L. crispatus*, y la positividad del VPH¹⁷⁴⁻¹⁷⁵.

| VPH | Microorganismos asociados |
|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Eliminación viral | <i>L. crispatus</i> ^{173,12,173-175} , <i>L. gasseri</i> ¹⁷⁶ , <i>Ureaplasma urealyticum</i> ¹⁷⁴ , <i>Eubacterium eligens</i> ¹⁷⁴ , <i>Gardnerella vaginalis</i> ¹⁷⁴ , <i>L. jensenii</i> ¹⁷⁷ y <i>L. coleohominis</i> ¹⁷⁷ . Como probióticos: <i>L. casei</i> ¹⁷⁸ (oral), <i>L. rhamnosus</i> BMX 54 ¹⁷⁹ (vaginal). |
| Persistencia viral | <i>L. Iners</i> ^{173,175,176} , <i>Gardnerella vaginalis</i> ¹⁷⁶ , <i>Atopobium</i> ¹⁷⁶ , <i>Prevotella</i> ¹⁷⁶ , <i>L. johnsonii</i> ¹⁷⁴ , <i>Haemophilus</i> ¹⁷⁴ , <i>Mycoplasmataceae</i> ¹⁷⁴ . |
| Lesiones cervicales | Microorganismos asociados |
| Lesiones intraepiteliales cervicales en general | <i>L. iners</i> ^{12,173} , <i>Megasphaera elsdenii</i> ¹⁷⁵ , <i>Shuttleworthia satelles</i> ¹⁷⁵ , <i>Gardnerella vaginalis</i> ¹² . Géneros <i>Atopobium</i> ¹² y <i>Sneathia</i> ¹⁷⁵ . |
| Lesiones intraepiteliales cervicales de alto grado | <i>Sneathia sanguinegens</i> ¹⁷⁷ , <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ¹⁷⁷ , <i>Anaerococcus tetradius</i> ¹⁷⁷ |
| Cáncer cervical | Género <i>Fusobacterium</i> (especialmente <i>Fusobacterium necrophorum</i>) ¹⁷⁵ y <i>L. iners</i> ¹⁷³ . |

Tabla 10. Microorganismos asociados a la presencia y eliminación del VPH y sus lesiones cervicales.

Brotman et al¹⁷⁶ realizaron un ensayo longitudinal durante 16 semanas en mujeres premenopáusicas para estudiar la relación entre el VPH y la microbiota presente mediante muestreos vaginales bisemanales. Inicialmente, se observó la presencia del VPH con mayor frecuencia en las mujeres con vaginotipos III y IV (70% aproximadamente en cada grupo), mientras que las pertenecientes a los vaginotipos I y II lo presentaban en un 45 y 12% respectivamente¹⁷⁶. Al finalizar el estudio, observaron una mayor persistencia viral en las pacientes con vaginotipo IV (mayor diversidad, depleción lactobacilar y alta presencia del género *Atopobium*)¹⁷⁶. Las microbiotas dominadas por *L. gasseri* (vaginotipo II), presentaron la mayor negativización del VPH¹⁷⁶. Arokiyaraj S et al¹⁷⁴ llevaron a cabo un estudio similar, donde siguieron a 41 mujeres por 6 meses comparando las muestras vaginales basales con las obtenidas al finalizar el ensayo. El *L. crispatus* fue observado con mayor frecuencia en las pacientes VPH negativo. Las especies predominantes en las mujeres que eliminaron el VPH fueron *Eubacterium eligens*, *Gardnerella vaginalis* y *Ureaplasma urealiticum*¹⁷⁴. Este hallazgo puede estar relacionado con que la mayor reacción inflamatoria causada por estas bacterias puede tener un papel anti-viral importante¹⁷⁴. *L. johnsonii*, el género *Haemophilus* y la familia *Mycoplasmataceae* fueron los microorganismos que se correlacionaron de forma positiva con la persistencia viral¹⁷⁴ (Tabla 10).

2.10.1.2 Lesiones intraepiteliales cervicales

Las bacterias más comúnmente asociadas con el CIN se encuentran reflejadas en la Tabla 10. Oh HY et al¹², analizaron la composición de la microbiota vaginal de 120 mujeres sanas y con CIN mediante el estudio del gen 16S rARN. El riesgo de CIN se incrementó en mujeres con microbiotas dominadas por *L. iners*, *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* y depleción de *L. crispatus*^{12,173}. En relación a *G. vaginalis*, estos resultados son contradictorios a los hallazgos de Arokiyaraj et al¹⁷⁴ que la asociaron de forma significativa con la eliminación del VPH, por lo que se precisan más estudios al respecto. El estudio de Mitra A et al, mostró una asociación entre el vaginotipo IV (grupo de diversidad) y CIN, siendo dos veces más común en mujeres con LSIL (Lesión Intraepitelial Escamosa de Bajo grado), tres veces en HSIL (Lesión Intraepitelial Escamosa de Alto grado) y cuatro veces más frecuente en mujeres con cáncer cervical al compararlo con el grupo

control¹⁷⁷. En general, mientras más diversidad de la microbiota y menos *Lactobacillus*, se encontraron lesiones más graves sin poder establecer una relación de causalidad¹⁷⁷. Por otro lado, Audirac-Chalifour A et al¹⁷⁵ proponen un patrón de cambio en la microbiota vaginal según el estadio de la enfermedad (Figura 7), encontrando el *L. crispatus* como microorganismo predominante en pacientes VPH negativo y, en pacientes VPH positivo sin lesiones, *L. iners*. Con la aparición de CIN, se puede encontrar una mayor variedad de microorganismos dominados por el género *Sneathia*, mientras que en estadios avanzados de cáncer cervical predomina el género *Fusobacterium*¹⁷⁵. La especie *F. necrophorum* solo se aisló en los casos de cáncer cervical¹⁷⁵. Existen varios estudios que asocian éste género con cánceres de otras localizaciones como el colorrectal¹⁸⁰. Otro hallazgo relevante fue la correlación encontrada entre *Fusobacterium* y el aumento de IL-4 y TGF- β 1 (factor de crecimiento tumoral - β 1) que, junto con otras citoquinas, pueden producir una disminución de la inmunidad local ideal para fomentar la carcinogénesis¹⁷⁵.

En esta línea, las oncoproteínas del VPH también juegan un papel importante en la modulación de la inmunidad local. La oncoproteína E2 induce a las células infectadas a producir IL-10 y TGF- β 1, también inmunosupresoras¹⁸¹. Además, E6 y E7 intervienen en la proliferación y transformación celular maligna. Estas oncoproteínas se unen respectivamente a la proteína p53 y a la del Retinoblastoma encargadas de controlar el ciclo celular, evitando así la apoptosis de las células con alteraciones genéticas y permitiendo el crecimiento celular descontrolado que se observa en las neoplasias. Actualmente, existen dos estudios in vitro en los que se ha evidenciado una disminución de la expresión de los oncogenes E6 y E7 con la administración de probióticos con *Bifidobacterium adolescentis* SPM1005-A¹⁸² y de *Lactobacillus crispatus* SJ-3C-US, *L. jensenii* ATCC 25258 y *L. gasseri* ATCC 9857⁴¹.

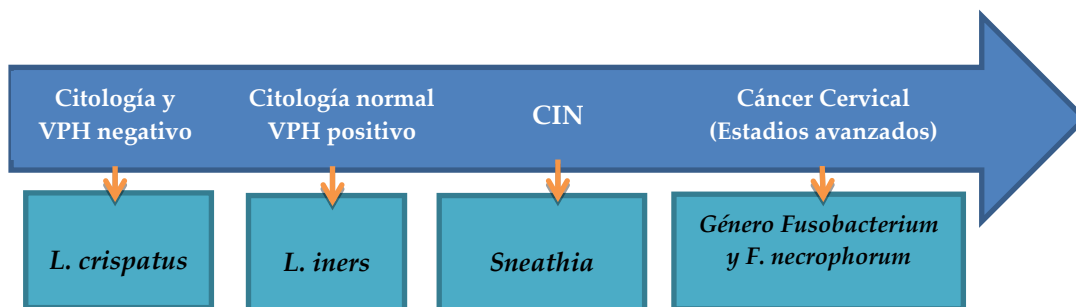


Figura 7. Progresión de la microbiota según el estadio de la displasia cervical de acuerdo a Audirac-Chalifour A et al¹⁷⁵.

2.10.1.3 VPH y probióticos

Actualmente, existen pocos estudios disponibles donde se estudie el impacto de formulaciones probióticas sobre el estatus de portador de VPH y CIN. Verhoeven V et al¹⁷⁸, realizaron un estudio controlado en 51 mujeres donde se administró una bebida rica en *L. casei Shirota* ($6,5 \times 10^9$ UFC) por 6 meses, observándose un mayor aclaramiento del VPH (29% vs 19%) y disminución del doble de LSIL en relación con el grupo control (60% vs 31%). El estudio de Palma E et al¹⁷⁹, mostró resultados similares en 117 mujeres portadoras de VPH con VB o VC tratadas con metronidazol o fluconazol, seguido de un tratamiento probiótico vaginal por 3 o 6 meses formado por 10^4 UFC/cápsula de *L. rhamnosus* BMX 54¹⁷⁹. Se realizaron citologías, test de VPH y colposcopias a los 0, 3, 6 y 9 meses. En la visita de los 3 meses, no se encontraron diferencias entre ambos grupos¹⁷⁹. Sin embargo, tras finalizar el periodo de seguimiento los resultados mostraron una tasa de eliminación del VPH del 11% en el grupo tratamiento corto frente al 31% en el grupo de tratamiento largo. Además, se encontró una reducción del LSIL dos veces superior en el último grupo (37% vs 79%)¹⁷⁹.

Desafortunadamente, la persistencia de la infección está vinculada a una serie de factores, la mayoría no modificables, lo que reduce las estrategias terapéuticas que tenemos para ayudar a combatir esta infección. Precisamente, aquí es donde los probióticos juegan un papel fundamental consiguiendo un balance en la microbiota para facilitar la eliminación del virus y sus lesiones

premalignas. Se necesita de mayor evidencia para dilucidar si una alta diversidad bacteriana en el entorno vaginal es la causa o la consecuencia de la persistencia del VPH y la progresión del CIN. Sería interesante estudiar si el análisis de la microbiota de estas pacientes podría ser una herramienta viable para detectar las que pertenezcan a grupos de alto riesgo para la progresión de la displasia cervical. Así se puede incentivar medidas preventivas como la vacunación del VPH en pacientes con disbiosis vaginal persistente¹⁷¹, administración de probióticos a largo plazo, seguimiento más estrecho del CIN de estas pacientes, entre otros.

2.10.2 Cáncer de endometrio

El cáncer de endometrio representa el tercero en frecuencia dentro de las neoplasias ginecológicas tras el de mama y cérvix, con una incidencia de 382.100 casos y una mortalidad de 89.900 alrededor del mundo en el año 2018¹⁶⁹. Entre los principales factores de riesgo para su aparición se encuentra la hormonoterapia con estrógenos, Síndrome de Lynch II, antecedente de cáncer de mama, tratamiento con tamoxifeno, obesidad, hipertensión arterial, diabetes mellitus, menopausia tardía, nuliparidad, menarquia precoz, entre otros¹⁸³.

En la literatura actual, existen pocos estudios que analicen la relación entre la microbiota y el cáncer de endometrio. En 2016, Walther-António MR et al¹⁸⁴ realizaron un estudio en pacientes con patología benigna uterina, hiperplasia y cáncer endometrial mediante muestreo de todo el tracto genital femenino y su análisis mediante secuenciación del gen 16S rADN¹⁸⁴. Encontraron diferencias claras entre la microbiota presente en las pacientes con patología benigna y las que padecían hiperplasia o cáncer, pero no se observaron diferencias entre estas dos últimas áreas¹⁸⁴. En los casos de benignidad, a nivel endometrial se encontraron géneros como *Shigella*, *Barnesiella*, *Staphilococcus*, *Blautia* y *Parabacteroides*, mientras que en vagina *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Stenotrophomonas* y *Shigella* fueron los microorganismos más frecuentes¹⁸⁴. Las pacientes con patología maligna presentaron predominancia de *Bacteroides* y *Faecalibacterium* en las muestras endometriales, y en las vaginales, se aislaron algunos géneros asociados a disbiosis como las *Porphiromonas*¹⁸⁴. Así mismo, se observó una correlación

positiva entre el cáncer endometrial y un pH vaginal elevado (> 4,5), presencia de *Atopobium vaginae* y *Porphyromonas* en el tracto genital femenino¹⁸⁴. En las muestras vaginales, la coalición de estas dos especies tuvo hasta un 90% de sensibilidad y especificidad para el cáncer de endometrio¹⁸⁴. El género *Porphyromonas* se ha visto asociada a otros cánceres como el colorrectal¹⁸⁵, el orofaríngeo¹⁸⁶ y puede ser también un inductor del cáncer endometrial¹⁸⁴. Además, se encontró una uniformidad en la microbiota de todo el aparato genital femenino y las muestras de heces obtenidas de cada paciente, hecho que puede explicarse por una posible migración bacteriana entre los distintos nichos o características particulares de las pacientes que seleccionan su microbiota particular¹⁸⁴. El estudio de Walsh DM et al¹⁸⁷, mostró resultados similares tras estudiar la microbiota de todo el tracto genital femenino en mujeres con cáncer de endometrio, hiperplasia y en el grupo control. Observaron que factores de riesgo del cáncer de endometrio como la menopausia y obesidad, además del pH vaginal >4,5 afectaban el estado de la microbiota, aumentando su diversidad¹⁸⁷. Entre los géneros más frecuentemente aislados se encontraron *Anaerococcus*, *Peptoniphilus* y *Porphyromonas*¹⁸⁷. Específicamente, se encontró una fuerte correlación de la presencia de *Porphyromona somerae* vaginal con el cáncer de endometrio, con una alta sensibilidad y especificidad (74% y 63%)¹⁸⁷, aproximable al de la citología cervicovaginal para CIN (55.4% y 94.1%)¹⁸⁸. Por este motivo, se plantea la detección de esta bacteria como posible marcador del cáncer de endometrio mediante una prueba no invasiva en pacientes con factores de riesgo, aunque se precisan más estudios para su validación en la práctica clínica habitual¹⁸⁷.

Por último, Dossus L et al¹⁸⁹ hacen referencia a que el aumento de riesgo que representa la obesidad en el cáncer endometrial puede deberse a un ambiente inflamatorio crónico. Este riesgo se vio incrementado cuando lo hacía la Proteína C Reactiva, IL-6 e IL-1Ra¹⁸⁹. El efecto de los probióticos sobre la inflamación del tracto genital superior y la prevención del cáncer aún no se ha dilucidado, pero podría ser un enfoque interesante para futuros ensayos clínicos.

2.10.3 Cáncer de ovario

El cáncer de ovario representa el cuarto en frecuencia dentro de las neoplasias ginecológicas tras el de mama, cérvix y endometrio con una incidencia

de 295.400 casos y una mortalidad que alcanzó las 184.800 defunciones en todo el mundo en el año 2018¹⁶⁹. Entre los principales factores de riesgo para padecer esta neoplasia se encuentran la postmenopausia, nuliparidad, los tratamientos de fertilidad con inductores de la ovulación, antecedentes familiares de cáncer de ovario, historia de cáncer de mama, endometrio y colon principalmente¹⁹⁰.

En los últimos años, se han realizado algunos estudios sobre el oncobioma del cáncer de ovario aunque aún se precisa de ensayos de intervención sobre la microbiota. Bo Z et al en 2019³², publicaron un estudio que comparó la microbiota encontrada en muestras de cáncer de ovario y la de trompas de Falopio normales, detectando menor variedad de microorganismos en las primeras³². El phylum más recurrente en las muestras de cáncer de ovario fue *Proteobacteria*, dentro del cual, *Acinetobacter iwoffii* fue la especie más frecuentemente encontrada. Sin embargo, el phylum *Firmicutes* y la especie *Lactococcus piscium* fueron las más prevalentes en las muestras normales³². Se encontraron resultados similares en el estudio realizado por Banerjee S et al en 2017³³, donde aislaron una serie de microorganismos que solo estaban presentes en pacientes con cáncer de ovario, y por lo tanto, pueden estar relacionados con su génesis³³. En cuanto a los virus, *Retroviridae* fue el más frecuentemente aislado. También encontraron la presencia del VPH 16 y 18 insertados únicamente en el genoma de los especímenes cancerígenos³³. Los phylum bacterianos predominantes fueron *Proteobacteria* en más de la mitad de los casos y *Firmicutes* en 1/5 de ellos. *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* y *Treponema* fueron algunos de los géneros bacterianos detectados en más del 90% de las muestras y otros como *Brucella*, *Chlamydia* y *Mycoplasma* en un 60-70% de los casos³³. Por último, cabe destacar *Cladosporium* y *Dyphylium* que representan los géneros de hongos y parásitos encontrados en todos los pacientes con cáncer³³. Ambos grupos de autores concluyen que la disbiosis puede fomentar la carcinogénesis mediante la inmunosupresión local, a la vez que el tumor puede propiciar un entorno microbiano favorable para la progresión neoplásica^{32,33}.

Nené NR et al¹⁹¹, encontraron que en pacientes con cáncer de ovario y aquellas sanas con factores de riesgo como edad avanzada o mutación BRCA1 tenían una microbiota cervicovaginal no dominada por *Lactobacillus*. Además, las pacientes con más de 50 años que usaron anticonceptivos orales al menos 5 años,

presentaban un entorno vaginal dominado por *Lactobacillus*, por lo que se piensa que su uso puede retrasar la depleción lactobacilar asociada a los casos oncológicos. Por tanto, se postula la hipótesis de que mantener un equilibrio en el entorno vaginal podría desempeñar un papel en la prevención de la oncogénesis del tracto genital superior. Finalmente, Miles SM et al³¹, mencionan que la reducción del riesgo de cáncer de ovario relacionada con la salpinguectomía bilateral total podría estar asociada a la eliminación de microorganismos patógenos que pueden promover la carcinogénesis.

2.10.4 Tratamientos oncológicos

La microbiota humana presenta una gran variabilidad interindividual e intraindividual a lo largo del tiempo y es influenciada por nuestra dieta, factores ambientales y genéticos, toma de medicamentos como antibióticos, probióticos, entre otros. Esto puede explicar la diferente respuesta que existe entre los pacientes ante la administración del mismo tratamiento¹⁹². Tanto la composición de la microbiota, las enzimas que metabolizan los fármacos influenciadas por la microecología, el estado de la barrera epitelial intestinal y la capa protectora de mucina pueden modular el metabolismo, toxicidad, absorción y efecto que los medicamentos tienen en el huésped¹⁹².

En cuanto al tratamiento del cáncer, una revisión reciente plantea un modelo para el estudio de la microbiota presente en tejidos, heces, orina y otros fluidos corporales antes del inicio de las terapias oncológicas mediante secuenciación del gen 16S rARN y otros análisis funcionales¹⁹³. De esta manera se puede optimizar la microbiota del huésped, mejorar su respuesta al tratamiento y evitar o disminuir los efectos secundarios farmacológicos^{193,194}. Los autores refieren que la disbiosis causada por algunos tratamientos oncológicos puede afectar el éxito de otras terapias empleadas posteriormente¹⁹³. Así, la composición de la microbiota intestinal puede llegar a predecir el éxito de estos tratamientos. También se ha observado que los pacientes con baja diversidad microbiana intestinal son más susceptibles a presentar cuadros infecciosos¹⁹³. Sin embargo, se necesitan más estudios para poder aplicar una atención médica personalizada (dieta dirigida, probióticos, prebióticos, entre otros) en la práctica clínica como

una herramienta válida para el tratamiento del cáncer a través de la mejora de la microbiota^{193,194}.

Existen varios estudios que demuestran la eficacia de los probióticos en la prevención de los síntomas gastrointestinales relacionados con la quimioterapia. Österlund P et al, administraron comprimidos orales de *L. rhamnosus* GG ($1-2 \times 10^{10}$ UFC/día) y fibra guar gum vs placebo a pacientes con cáncer colorrectal durante su tratamiento quimioterápico con 5-Fluorouracilo (24 semanas)¹⁹⁵. Los pacientes del grupo probiótico presentaron menores episodios de diarrea (22% vs 37%), menos molestias intestinales y precisaron menos ajuste de dosis del quimioterápico por mala tolerancia¹⁹⁵. No se observaron efectos adversos relacionados con la ingesta del probiótico y la fibra administrada no cambió la tolerancia al tratamiento oncológico¹⁹⁵. Wada M et al¹⁹⁶, realizaron otro ensayo similar en población pediátrica sometida a tratamiento quimioterápico, donde se administró *Bifidobacterium breve* (Yakult®) vs placebo. Los pacientes del grupo probiótico presentaron menos episodios febriles y precisaron menor antibioterapia intravenosa en comparación con el grupo control¹⁹⁶.

Recientemente, se ha observado el importante papel que juega la microbiota intestinal en la eficacia de algunos tratamientos inmunoterápicos. Pinato DJ et al en 2019¹⁹⁷, publicaron un estudio que muestra la impresionante reducción en la supervivencia global de pacientes oncológicos (cáncer de pulmón no microcítico, melanoma, entre otros) que recibieron antibióticos antes del tratamiento con Inhibidores del punto de Control Inmunitario (ICI) vs no antibioterapia (2 vs 26 meses)¹⁹⁷. Estos resultados fueron similares independientemente del tipo de tumor¹⁹⁷. No se observaron diferencias con la administración concomitante de antibióticos con ICI¹⁹⁷. Además, el grupo con antibioterapia previa presentó mayor resistencia al tratamiento (81% vs 44%). Los autores comentan que este resultado podría estar asociado al impacto que los antimicrobianos pueden causar en nuestra microbiota e inmunidad contra el cáncer¹⁹⁷.

III - OBJETIVOS CIENTÍFICOS E HIPÓTESIS

CAPÍTULO III - OBJETIVOS CIENTÍFICOS E HIPÓTESIS

3.1 Objetivos principales

- ✓ Analizar la composición de la microbiota vaginal basal como un estudio longitudinal en una población de mujeres fértiles.
- ✓ Determinar la presencia de *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800 en la microbiota vaginal tras la ingesta del producto probiótico, definido como el porcentaje de pacientes en las que se detecta, en ambos grupos.

3.2 Objetivos secundarios

- ✓ Estudiar la evolución de la microbiota vaginal, a través de la comparación de los niveles antes y después de la intervención, en ambos grupos.
- ✓ Estudiar la evolución del género *Lactobacillus* en la microbiota vaginal, a través de la comparación de los niveles antes y después del periodo de intervención, en ambos grupos.
- ✓ Estudiar la evolución de la especie *Lactobacillus rhamnosus* en la microbiota vaginal, a través de la comparación de los niveles antes y después del periodo de intervención, en ambos grupos.
- ✓ Evaluar los cambios producidos en los vaginotipos, definido como el porcentaje de pacientes pertenecientes a cada uno de ellos en ambos grupos, antes y después del periodo de intervención.

3.3 Hipótesis

- ✓ La cepa *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800 administrada vía oral es capaz de colonizar y optimizar la microbiota vaginal de las pacientes de forma superior al placebo tras un periodo de tratamiento de 4 semanas.

IV- MATERIAL Y MÉTODOS

CAPÍTULO IV - MATERIAL Y MÉTODO

4.1 Diseño del estudio

En este trabajo analizamos ampliamente la microbiota vaginal en su estado basal y el impacto que ejerce sobre esta la ingesta de probióticos vía oral mediante un estudio de intervención, controlado con placebo, randomizado, doble-ciego, en una población de mujeres fértiles.

4.2 Producto probiótico a estudio

4.2.1 Descripción

El producto a estudio es un probiótico en formato de cápsula oral que contiene la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800 en concentración igual o superior a 1×10^{10} UFC/dosis.

4.2.2 Composición

Las cápsulas vegetales están compuestas de hidroxipropilmetilcelulosa y contienen:

- ✓ Probiótico (*Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800; 100 mg).
- ✓ Maltodextrina (170 mg).
- ✓ Estearato de magnesio (4,35 mg).

El placebo utilizado contiene únicamente maltodextrina, en un formato idéntico al probiótico.

4.2.3 Dosis y modo de empleo

- ✓ La dosis diaria del producto fue de una cápsula oral al día.

- ✓ Las cápsulas son de un tamaño adecuado para ser deglutidas con facilidad.
- ✓ Las cápsulas se pueden abrir, vertiendo el contenido en un vaso con un poco de agua.
- ✓ Se recomendó a las pacientes evitar su toma junto con bebidas calientes.
- ✓ El producto fue almacenado en un lugar fresco, seco y alejado de la luz.

4.2.4 Efectos adversos

No se han registrado efectos adversos significativos tras el consumo de este probiótico. Estudios anteriores han descrito leves molestias digestivas en los primeros días de la toma.

4.3 Muestra

4.3.1 Selección de la muestra de pacientes

Se siguió un tipo de muestreo no probabilístico secuencial en el que se fueron seleccionando las primeras 80 pacientes que acudieron a la Consulta de Ginecología General y del Tracto Genital Inferior del Hospital Universitario de Torrevieja que cumplieran los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión descritos más adelante. El proceso de captación de pacientes continuó hasta alcanzar el tamaño muestral deseado. El periodo de reclutamiento fue de Noviembre del 2018 a Mayo del 2019.

4.3.2 Cálculo de la muestra

Los principales factores que se han tenido en consideración para el cálculo muestral son:

- ✓ El tamaño de la diferencia entre las variables a medir de los dos grupos para poder detectarla.
- ✓ La variabilidad existente en el factor de interés a analizar.

- ✓ El valor “p” que se tiene previsto utilizar como criterio de significancia estadística (riesgo alfa).
- ✓ La “seguridad” para detectar una diferencia estadísticamente significativa, en el supuesto de que esa diferencia exista (potencia = 1 - riesgo beta).

Se incluyeron en el análisis final de datos (sujetos evaluables) todas las pacientes que finalizaron las visitas programadas para el estudio, mientras que el resto fueron excluidas, no siendo sustituidas por nuevas pacientes una vez retiradas del estudio.

El software utilizado para el cálculo del tamaño muestral ha sido el programa R versión 3.4.3. Este cálculo se ha realizado aceptando como clínicamente significativa una diferencia igual o superior al 25% entre los porcentajes de pacientes que obtienen una respuesta favorable (presencia de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800 en la microbiota vaginal) en cada grupo de intervención, teniendo en cuenta que la respuesta esperada en el grupo placebo fue del 4% y del 44% en el grupo de intervención. Además, se ha considerado un ratio de distribución entre el grupo de intervención y el placebo de 1:1 y una tasa de pérdidas de seguimiento del 10%.

Con todas estas consideraciones y asumiendo un error de tipo I de 0.05 y una potencia de 0.8 en el marco de un contraste bilateral, se obtiene que es necesario incluir a 80 pacientes (40 sujetos por grupo), para detectar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los grupos de tratamiento.

Para contrastar si existe una diferencia estadísticamente significativa entre las proporciones de respuesta favorable asociadas a los dos grupos de tratamiento se empleó el test exacto de Fisher. Este contraste no paramétrico tiene como principal bondad que ofrece un cálculo exacto de la probabilidad del estadístico Chi-cuadrado, a diferencia de la prueba Chi-cuadrado de Pearson que nos ofrece una aproximación a la misma.

4.3.3 Criterios de inclusión y exclusión

A continuación, se detallan los criterios de inclusión y exclusión que definen la población que fue candidata a participar en el estudio.

4.3.3.1 Criterios de inclusión

Los sujetos deben cumplir todos los criterios de inclusión siguientes:

- ✓ Mujeres en edad fértil (de una edad igual o superior a 30 años).
- ✓ Mujeres sin diagnóstico clínico de vaginosis.

4.3.3.2 Criterios de exclusión

Las participantes no deben cumplir ninguno de los siguientes criterios de exclusión:

- ✓ Mujeres embarazadas, en periodo de lactancia o que no se comprometan a utilizar un método anticonceptivo de barrera.
- ✓ Uso de espermicidas o anticonceptivos (dispositivos intrauterinos, subdérmicos, vaginales u orales).
- ✓ Consumo de antibióticos en las dos semanas previas al comienzo del mismo.
- ✓ Contraindicación para la toma del producto o alguno de sus excipientes.
- ✓ Consumo de probióticos, por vía oral o vaginal, en los dos meses anteriores al comienzo del estudio.

4.4 Variables a estudio

4.4.1 Variables principales

- ✓ Detección de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800 en la microbiota vaginal.
- ✓ Composición de la microbiota vaginal a nivel de phylum, familia, género y especie.

4.4.2 Variables secundarias

- ✓ Porcentaje del género *Lactobacillus* presente en la microbiota vaginal.
- ✓ Porcentaje de *Lactobacillus rhamnosus* presente en la microbiota vaginal.
- ✓ Porcentaje de *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800 presente en la microbiota vaginal.
- ✓ Porcentaje de las especies patógenas vaginales *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Streptococcus agalactiae* y *Cutibacterium acnes* presentes en la microbiota vaginal.
- ✓ Seguridad: número de eventos no graves y eventos graves atribuidos por el investigador al probiótico en estudio.

4.5 Diseño y desarrollo del estudio

El estudio constó de un periodo de intervención con el producto a estudio (o el placebo en su caso) de 4 semanas. Durante el estudio, cada paciente acudió a dos visitas: inicial (antes de comenzar el consumo del producto) y final (tras finalizar las 4 semanas de intervención), en las que se realizó una toma de muestra vaginal. Dada la complejidad de obtener muestras a tiempo intermedio en mujeres sanas, se incluyó la posibilidad de realizar una visita intermedia de control opcional a las 2 semanas desde el comienzo del tratamiento. En la Tabla 11 se refleja el esquema del diseño del estudio.

| Visita | 0/1 | 2 | 3 |
|----------------------------------------|-----|---|---|
| Semana | 0 | 2 | 4 |
| Hoja de información al paciente | X | | |
| Firma del consentimiento informado | X | | |
| Criterios de inclusión y exclusión | X | | |
| Aleatorización | X | | |
| Entrega del producto | X | | |
| Historia clínica del paciente | X | | |
| Tratamiento farmacológico del paciente | X | | |
| Toma de muestra vaginal | X | X | X |
| Acontecimientos adversos | | | X |
| Recuento del producto sobrante | | | X |

Tabla 11. Esquema del diseño del estudio

4.5.1 Visita 1. Entrevista de reclutamiento o inicial (Semana 0/1)

Con el fin de reclutar pacientes, se informó del estudio a todas las mujeres que acudieron a la Consulta de Ginecología General y del Tracto Genital Inferior del Hospital Universitario de Torrevieja. A las pacientes interesadas, se les entregó la Hoja de Información al Paciente (Anexo 1) que contiene información detallada sobre el estudio y las implicaciones de su participación a fin de que pudiera firmar el Consentimiento Informado (CI) si así lo deseara (Anexo 2). Antes de firmar, las pacientes tuvieron tiempo suficiente para leer, considerar la información detallada y hacer las preguntas que desearan al investigador. Una vez firmado por duplicado el CI, se les realizó la entrevista inicial de su historia clínica, donde se comprobó que cumplían con todos los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión (ver apartado 4.3.3 Criterios de inclusión y exclusión). También se realizó un test de embarazo en orina.

El investigador procedió a asignar a cada una de las pacientes el siguiente número de participante correspondiente en el estudio y, según la

lista de aleatorización previamente elaborada, se les asignó el tratamiento que recibirían durante el estudio. Esta lista estuvo a cargo de una persona responsable ajena al estudio con la que el investigador contactó cada vez que debía incluir un nuevo paciente.

Así mismo, en esta visita inicial, se procedió a realizar un examen ginecológico mediante especuloscopia para descartar si existía cualquier signo de vaginosis bacteriana como flujo patológico, eritema o edema local. En caso de resultar negativo, se tomó la primera muestra vaginal, siguiendo el procedimiento descrito en el Anexo 3¹⁹⁸. Para ello se empleó el equipo de recogida (Figura 8) que consiste en un hisopo y un recipiente con 1ml de un estabilizador de ADN y ARN bacteriano. No se tomaron muestras durante el periodo menstrual. Se procedió inmediatamente a la correcta identificación de la muestra, señalando:

- ✓ El número del paciente en el estudio.
- ✓ Identificación de la muestra como perteneciente al Hospital Universitario de Torrevieja.
- ✓ La visita a la que corresponde la muestra.



Figura 8. Equipo de recogida de la muestra. OMNIgene•VAGINAL (OMR-130, DNA Genotek).

Las muestras se preservaron a -30°C durante un máximo de 6 meses antes de ser analizadas y fueron transportadas al laboratorio en un contenedor de temperatura controlada manteniendo la cadena de frío en todo momento.

4.5.2 Visita 2 o intermedia (Semana 2)

Como se ha comentado previamente, dada la complejidad de obtener muestras a tiempo intermedio en mujeres sanas, se incluyó la posibilidad de evaluar pacientes en una visita intermedia (2 semanas desde el comienzo del tratamiento), no siendo esta visita obligatoria para la paciente participante. En esta visita únicamente se tomó una segunda muestra vaginal.

4.5.3 Visita 3 o final (Semana 4)

La visita final se realizó hasta cinco días después de haber finalizado las cuatro semanas del periodo de tratamiento. Sólo en caso de que la paciente estuviera menstruando, se retrasó la visita hasta finalizar el sangrado. En esta visita, se realizó la toma de la última muestra vaginal y se registraron los posibles acontecimientos adversos, especificando fecha de comienzo y finalización, además de si hubo tratamientos adicionales recibidos. Por último, se recogió el producto a estudio sobrante de cada paciente, a fin de poder calcular el cumplimiento del tratamiento.

4.6 Proceso de aleatorización y enmascaramiento

El presente estudio clínico fue aleatorizado y doble ciego, por lo que el tratamiento se asignó de forma aleatoria y al azar a las pacientes y ni ellas ni el investigador del estudio conocían el tratamiento asignado. Las cajas de tratamiento estaban etiquetadas de forma codificada y no mostraban signos distintivos del grupo de tratamiento, como se observa en la Figura 9.



Figura 9. Caja de tratamiento codificada e idéntica para ambos grupos de tratamiento. Cada caja contiene un total de 30 cápsulas.

En la Visita 1, las pacientes fueron aleatorizadas a cada uno de los dos grupos de intervención en proporción 1:1 (probabilidad de 50% para el grupo de intervención y 50% para el grupo placebo), para minimizar el desequilibrio entre grupos. Estas listas fueron custodiadas por la persona responsable de la aleatorización, ajena al equipo investigador y estuvieron ocultas al personal investigador y a las participantes del mismo. El responsable de aleatorización era el encargado de proporcionar al investigador el número de la paciente y el código de tratamiento asignado en cada caso.

4.7 Recogida de datos

La recogida de datos se realizó de forma codificada en el Cuaderno de Recogida de Datos (CRD) (Anexo 4) único para cada paciente que se cumplimentó en el momento de la entrevista. Tras la aleatorización, se colocó la pegatina correspondiente al grupo de tratamiento codificado al cual fue adjudicada la paciente en la página 7 del CRD.

Todos los datos que figuran en el CRD, así como el resto de la historia clínica de cada paciente también se reflejó en el programa informático de historias clínicas Florence al que solo accedió el investigador encargado de incorporar a

dicha paciente en el estudio. Para ello se siguió la Regulación de la Unión Europea de protección de datos 2016/679.

4.8 Análisis de las muestras

4.8.1 Extracción, amplificación y secuenciación del ADN.

A partir de las muestras vaginales, se obtuvo ADN de alta pureza empleando el kit comercial (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Germany) y el protocolo de extracción para muestras biológicas basado en una lisis enzimática y una posterior física para evitar sesgos entre bacterias Gram positivas y negativas. Se realizó un análisis para comprobar la calidad de la extracción y la concentración del ADN mediante Nanodrop.

A continuación, se construyeron genotecas a partir de productos de la PCR obtenidos de la región hipervariable V3-V4 (459 bp) de la subunidad 16S del ribosoma bacteriano (ARNr 16S) (Figura 10), con el objetivo de capturar el ADN bacteriano. Este procedimiento se realizó según el protocolo *16S rDNA gene Metagenomic Sequencing Library Preparation Illumina protocol* (Código 15044223 Revisión A), de la empresa Illumina (California, Estados Unidos)¹⁹⁹. La selección de los cebadores fue realizada tomando como referencia el estudio de Klindworth y colaboradores (Figura 11)²⁰⁰.

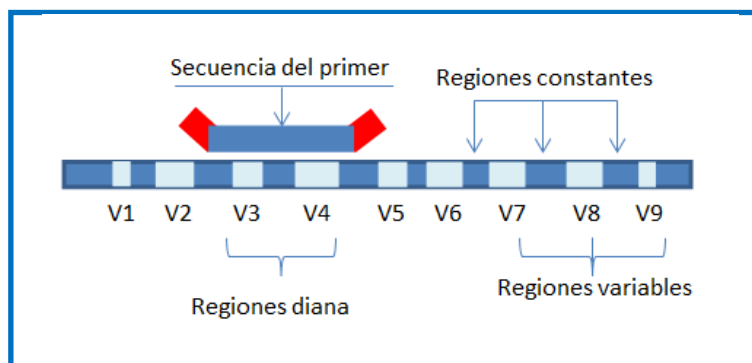


Figura 10. Región secuenciada dentro del gen 16S ARN ribosomal.

| | | | | | | |
|-------------------------------------------|-----------------|------------|----------------|---------------|----------|-----------|
| 16S | Amplicon | PCR | Forward | Primer | = | 5' |
| TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGG | | | | | | |
| NGGCWGCAG | | | | | | |
| 16S | Amplicon | PCR | Reverse | Primer | = | 5' |
| GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACH | | | | | | |
| VGGGTATCTAATCC | | | | | | |

Figura 11. Secuencias completas de los cebadores directo (forward) y reverso (reverse) utilizados según la Nomenclatura de nucleótidos estándar IUPAC empleada en la secuenciación del gen ARNr 16S bacteriano del protocolo Illumina^{199,200}.

El análisis de este gen se emplea habitualmente en la identificación y diferenciación taxonómica de especies bacterianas que se encuentran filogenéticamente cercanas entre sí. Cada genoteca fue marcada con una etiqueta de identificación molecular (MID) y secuenciada en el equipo secuenciador *MiSeq Sequencer* (Illumina). Este procedimiento se ejecutó en una combinación de 300PE (Paired End) para obtener un mínimo de 50.000 lecturas por muestra. La longitud promedio fue de 350-550 nucleótidos.

4.8.2 Análisis bioinformático

Tras la obtención de las secuencias, se llevó a cabo el análisis bioinformático inicial, que incluyó los pasos señalados a continuación.

4.8.2.1 Análisis primario

- ✓ Control de calidad de las secuencias y eliminación de los cebadores de secuenciación.

Para la anotación de las secuencias obtenidas en el proceso de secuenciación previamente se realizan una serie de pasos de control de calidad de las mismas:

El primer paso se centró en la limpieza de las secuencias. Debido a la forma de secuenciación, para cada una de las muestra se obtuvieron dos juegos de secuencias, un fichero con las secuencias en una dirección (R1), y otro fichero secuenciadas en la otra dirección (R2). Cada par de secuencias se somete a solapamiento entre ellas, para la obtención de una secuencia única y completa, usando el programa PEAR V.0.9.1 (<http://www.exelixislab.org/web/software/pear>) con los parámetros por defecto excepto el parámetro de solapamiento mínimo entre la secuencias de cada extremo que se fijó en 70nts, obteniendo al final un único fichero con el total de secuencias solapadas.

Una vez obtenidas las secuencias solapadas, se procedió al procesamiento por calidad de las mismas con el objetivo de eliminar aquellas secuencias de baja calidad. Para ello primero se eliminaron los extremos de secuencias que no llegan a la calidad de Q20. Una vez eliminados los extremos de mala calidad, se procedió a eliminar las secuencias cuyo valor de calidad medio fuera menor de Q20. Las secuencias restantes fueron utilizadas en los siguientes pasos.

Con las secuencias de calidad, se procedió a la eliminación de restos de cebadores de amplificación, con lo que se logró reducir el sesgo que se puede introducir en el proceso de anotación. Una vez los cebadores fueron eliminados, se seleccionaron secuencias de una longitud mayor a 200nts en las secuencias de 16S ya que las secuencias de menor tamaño tienen mayor probabilidad de asociarse erróneamente a grupos taxonómicos. Estos dos pasos se realizaron con el programa CUTADAPT versión 1.8.1.

El último paso del procesamiento por calidad fue la eliminación de secuencias quimeras resultantes de la amplificación. Este paso se realiza con una base de datos diseñada anteriormente y con el programa "Uchime". De esta forma obtenemos las secuencias que serán utilizadas para el proceso de anotación.

4.8.2.2 Análisis secundario

- ✓ Construcción de una base de datos no redundante para secuencias de ADNr 16S.
- ✓ Alineamiento local para la anotación de cada una de las lecturas.
- ✓ Asociación de cada lectura a la secuencia de la base de datos con la máxima similitud, a distintos niveles taxonómicos (phylum, familia, género y especie).
- ✓ Construcción de curva de rarefacción con el objetivo de asegurar que se ha alcanzado el plató de identificaciones taxonómicas.
- ✓ Listado de las bacterias presentes en cada grupo, a distintos niveles taxonómicos (phylum, familia, género y especie).
- ✓ Gráficos de columnas y circulares con los resultados obtenidos a distintos niveles taxonómicos (phylum, familia, género y especie).

Con el objetivo de reducir la complejidad del proceso de anotación, secuencias que comparten un 97% de similitud son agrupadas en una única secuencia usando el programa “cd-hit” para que solo aquellas secuencias que sean significativas sean anotadas y los resultados son aplicados al grupo de secuencias representado por el análisis.

A continuación, cada uno de los grupos de secuencias fue comparado contra una base de datos de ARNr usando la estrategia de *BLAST* de alineamiento local para asociar cada grupo con uno de los grupos taxonómicos de la base de datos²⁰¹.

Para la interpretación de los resultados es importante considerar los siguientes puntos:

- A. El alineamiento local básico (*BLAST*)²⁰¹ se realiza para poder asociar cada una de las lecturas obtenidas (después de la limpieza y filtrado) a un organismo. El paso crucial es trabajar con una base de datos bien curada, ya que aunque tengamos muchas secuencias depositadas en las bases de datos, la base de datos está incompleta y hay organismos que faltan, bien por qué no han sido secuenciados aun o bien por qué no se les ha podido

asignar a ningún grupo taxonómico. Además, puede ocurrir que una secuencia esté asociada a más de un hit con el mismo e-valor y la misma identidad. En este caso, se tendrá en cuenta el primer hit como el mejor hit. Por estas razones, debemos tener en cuenta que estas identificaciones taxonómicas son el mejor resultado en el alineamiento local, lo cual no asegura la presencia de este organismo en la muestra.

- B. La razón por la que las secuencias de longitud corta son eliminadas del análisis es debido a que cuanto menor sea el número de bases introducidas en el paso del alineamiento local, mayor es la probabilidad de que se parezca a alguna secuencia de la base de datos, y por ello mayor es la probabilidad de una mala asignación o de encontrar un falso positivo. También existen errores de secuenciación que pueden modificar la asignación a un organismo específico por modificación de la similitud entre secuencias, siendo esas secuencias también eliminadas del análisis.
- C. Para cada una de las secuencias se proporciona el porcentaje de identidad con el hit de la base de datos, el e-valor, el número absoluto de posiciones idénticas del alineamiento, el número relativo de identidades teniendo en cuenta el número total de bases del alineamiento, el número absoluto de gaps en el alineamiento y el número relativo de gaps teniendo en cuenta el número total de bases del alineamiento. Los datos pueden filtrarse dependiendo de los parámetros que se consideren oportunos.
- D. Una vez asociada cada lectura a un organismo, se realizaron distintos análisis y filtrados. Se agrupan las lecturas en base a phylum, familia, género y especie. Normalmente la asociación se realiza al nivel de phylum, familia o género, aunque también se proporciona a nivel de especie para ir un paso más allá.
- E. La base de datos se cura teniendo en cuenta los diferentes niveles taxonómicos conforme están descritos en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Algunos no han sido asociados al nivel de Familia o Género debido a que no se han

caracterizado, cultivado o son desconocidos, por lo que estos niveles se clasifican como null. Los distintos nulls obtenidos pueden diferenciarse entre sí observando el nivel superior, siempre que éste se encuentre descrito.

Para cada una de las muestras analizadas se realiza una *Curva de Rarefacción*. Esta curva es una comparativa entre las secuencias analizadas y el número de taxones detectados a distintos niveles, de forma que a mayor número de secuencias mayor número de organismos a detectar hasta que se llegue a una situación de saturación donde, en teoría, todos los organismos han sido detectados. Si esa curva llega a la saturación (plato) de la detección, todos los organismos han sido detectados. Si por el contrario estamos en una fase exponencial de la curva, es necesaria más cantidad de secuencia para poder detectar toda la variabilidad de la muestra.

4.8.2.3 Análisis terciario

Comparación de los resultados obtenidos en cada grupo y tiempo a distintos niveles taxonómicos (phylum, familia, género y especie), con el objetivo de detectar poblaciones bacterianas específicas. A partir de estos resultados se calculó la diversidad bacteriana utilizando en cada caso el índice de diversidad que mejor se ajustaba. Esta diversidad desciende cuando una población determinada presenta una elevada densidad y se convierte en la dominante en dicha microbiota.

4.8.2.3.1 Cuantificación del alfa-diversidad

La alfa diversidad estima el número de especies presentes en un grupo de sujetos, tomando en cuenta la riqueza y la abundancia relativa de cada una de ellas. Según Atlas RM²⁰², en el caso de existir una uniformidad idéntica, el valor de la alfa diversidad es superior cuanto mayor sea el número de especies diferentes presentes. Sin embargo, en el caso de igualdad de especies, el valor de la alfa diversidad es máximo cuando la totalidad de ellas se encuentran presentes en igual concentración.

En concreto, para la cuantificación del alfa-diversidad se emplearon los siguientes índices estadísticos:

- ✓ El *índice Shannon* estima la biodiversidad específica. Está basado en la abundancia relativa de sus respectivas OTUs (Unidad Taxonómica Operativa) y cómo se encuentran distribuidas. Se trata de un valor numérico positivo cuyo valor parte de 0 (una única especie) y aumenta según la diversidad es mayor. Cabe destacar que este índice puede aumentar con el incremento en la riqueza o en el caso en el que se genere un aumento en la equitatividad de la representación en la abundancia relativa de cada OTU.
- ✓ El *índice de Simpson inverso*, por el contrario, tiene su fundamento en la estructura de las comunidades bacterianas, siendo un parámetro que destaca a las especies predominantes, y en menor grado, las infrarepresentadas, según lo explica Hill MO²⁰³. Este índice manifiesta la probabilidad de que dos especies elegidas al azar de una población de N individuos deriven de distintas OTU. Un valor cercano a la unidad expresa que existe una mayor diversidad alfa. Sin embargo, un valor próximo a 0 indica una dominancia superior por parte de una OTU determinada y menor heterogeneidad de OTUs.
- ✓ El *valor Chao 1* es una estimación del número total de especies que pueden encontrarse en la muestra basándose en el número de las especies menos representadas en la muestra. Es un estimador de riqueza que emplea un modelo no paramétrico basado en el número de OTUs raras descrito por Chao A²⁰⁴. Nos indica si el proceso de muestreo ha sido adecuado, ya que si el valor CHAO1 es superior al total de observaciones, el muestreo habrá sido insuficiente.

En general, estos índices de diversidad y el análisis de diferencias entre los grupos a estudiar se suelen representar gráficamente con un diagrama de cajas. Para evidenciar la existencias de diferencias en los índices de alfa diversidad a

nivel de género o especie en ambas vertientes de tratamiento, se empleó el *test no paramétrico de Wilcoxon* tomando como umbral de significancia estadística un valor de $p < 0.05$.

4.8.2.3.2 Cuantificación de la beta-diversidad

La beta-diversidad estudia las discrepancias en la composición de la microbiota de dos muestras distintas. Para su cuantificación se puede emplear:

- ✓ La *distancia de Bray-Curtis*, la cual indica la similitud cualitativa hallada entre los integrantes de la microbiota de dos muestras. Un valor 0 indica que no existen elementos en común entre dos muestras, mientras que un valor de 1 refleja que todos sus elementos son compartidos de igual forma.
- ✓ Test de *Local Contribution to Beta Diversity (LCBD)* en el que se compara la contribución de cada muestra a la diversidad entre los grupos propuestos. Este análisis comprueba si hay alguna muestra que destaque sobre todas las demás, en cada uno de los niveles taxonómicos. Esto sirve para confirmar la ausencia de posibles outliers o valores atípicos que puedan alterar el resultado.
- ✓ Test de *Beta dispersión por parejas de variables* para ver si existe una variabilidad significativa entre ellas, donde el p-valor establecido para la significancia estadística es menor de 0.05. Si es mayor de esta cifra no se puede intuir una relación directa entre las variables propuestas y la población bacteriana en un nivel taxonómico determinado.

4.8.2.3.3 Análisis Principal de Componentes (PCoA)

El análisis principal de componentes o PCoA, se caracteriza por ser un procedimiento estadístico multivariante de reducción del número de variables. Este resume de forma bidimensional la varianza en un gráfico de puntos que representan las muestras obtenidas. De esta manera, refleja la asociación lineal entre las muestras y las abundancias relativas de los phylum, familias, géneros o

especies bacterianas obtenidas. Se emplean combinaciones lineales de las variables iniciales para conseguir los Componentes Principales o PCs en una representación bidimensional ilustrando la mayor variabilidad posible.

- ✓ El primer PC es aquel eje que transcurre por el centroide de la nube de puntos y minimiza la distancia de cada uno de los puntos a ese mismo eje, maximizando la variabilidad de la nube de puntos.
- ✓ El segundo PC es ortogonal y pasa igualmente por el centroide de la nube de puntos. Éste indica la mayor variabilidad no explicada por el primer PC.

Su representación se realiza en un biplot, donde los puntos (muestras) que se encuentren agrupados tendrán una asociación positiva, mientras que si se encuentran en zonas contrapuestas del gráfico tendrán una asociación negativa. Por último, cuando las muestras están localizadas en un ángulo recto entre sí, indica que no existe relación ninguna entre ellas.

4.8.2.3.4 Test PERMANOVA

El test de PERMANOVA es un test estadístico no paramétrico que permite comparar grupos de muestras sin una distribución normal y dictaminar si los centroides de los datos y su dispersión son iguales entre ellos (como sugiere la hipótesis nula) o distintos. Rechazar la hipótesis nula significa aceptar que los datos, en este caso las poblaciones bacterianas de las muestras, tienen un comportamiento distinto que responde a los grupos o tratamientos propuestos.

Esta técnica realiza distintas permutaciones para comparar la distancia entre los puntos de un mismo grupo respecto a los del otro grupo y obtiene un estadístico F de cada permutación, que compara contra un estadístico obtenido de una simulación de muestras realmente aleatorias. La significancia del test reside en obtener una F lo suficientemente distinta comparando la simulación aleatoria y el conjunto de muestras reales, con lo que se pueda rechazar la hipótesis nula. Por

tanto, obtener un p-valor por debajo del límite establecido del 0.05 sugiere que las muestras corresponden a distribuciones distintas basadas en el grupo estudiado.

4.8.2.3.5 Canonical Correlation Analysis (CCA)

El CCA se utiliza para identificar y medir las asociaciones entre dos o más variables. Esta técnica determina un set de variables canónicas, similares al PCA o PCoA, en las que se realizan distintas combinaciones lineales ortogonales de las bacterias que forman parte del estudio, de manera que se explique de la manera más ajustada posible la variabilidad que existe en y entre las variables del estudio. La principal diferencia con el PCA es que mientras este último maximiza la varianza entre las muestras, en el CCA se maximiza la correlación entre los grupos propuestos.

Todas las pruebas estadísticas se realizaron para nivel de phylum, familia, género y especie.

4.8.2.4 Análisis bioinformático de la evolución por grupos bacterianos específicos

4.8.2.4.1 Estudio de la evolución de *Lactobacillus* a lo largo del estudio en ambos grupos

Debido a que el probiótico de intervención pertenece al género *Lactobacillus*, el contenido de este género fue el primer punto a estudiar en ambos grupos, y en los distintos tiempos de análisis, obteniendo la evolución del mismo a lo largo del estudio. Para ello, se utilizó un tratamiento estadístico específico desarrollado para el seguimiento de la evolución de la especie en cuestión, basada en análisis no paramétricos mediante el paquete estadístico R en su última versión estable.

4.8.2.4.2 Estudio de la evolución de las especies patógenas vaginales a lo largo del estudio en ambos grupos

Aunque el uso y mejora en las herramientas de caracterización del microbioma están proporcionando cada vez una mayor información acerca del contenido de las comunidades bacterianas y del papel de determinadas bacterias en los procesos de patogénesis, existen una serie de grupos bacterianos definidos como patógenos vaginales.

En este estudio fijamos especial atención en la evolución de los grupos bacterianos patógenos *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Streptococcus agalactiae* y *Cutibacterium acnes* (anteriormente *Propionibacterium acnes*). Para todos ellos, se analizó su contenido en cada grupo a los distintos tiempos de toma de la muestra, con el fin de obtener la evolución diferencial para cada patógeno y grupo de estudio.

Del mismo modo que en el punto anterior, los resultados obtenidos se cruzaron con los datos clínicos, con el objetivo de determinar posibles marcadores patogénicos.

Estos estudios, se realizaron utilizando un tratamiento estadístico específico desarrollado para el análisis de la evolución de la especie/especies en cuestión basada en análisis no paramétricos mediante el paquete estadístico R en su última versión estable.

4.8.2.4.3 Análisis bioinformático de la evolución por vaginotipos

En este proyecto las distintas muestras fueron clasificadas en vaginotipos según Ravel J et al⁶ (ver apartado 2.2.4 Comunidades bacterianas o vaginotipos), y posteriormente, se analizaron los cambios en estas agrupaciones bacterianas para los distintos tiempos de muestreo en ambos grupos de tratamiento. Los resultados obtenidos se cruzaron con los datos clínicos, con el objetivo de determinar las relaciones entre el grupo de tratamiento asignado y los vaginotipos. Para ello, se empleó un tratamiento estadístico específicamente desarrollado para el análisis de la evolución de los vaginotipos a lo largo del tiempo y dependiendo del tratamiento, basándonos en análisis no paramétricos mediante el paquete estadístico R en su última versión estable.

4.9 Aspectos éticos

- ✓ Este protocolo del estudio fue revisado y aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica con medicamentos y productos sanitarios de los Hospitales Universitarios de Torrevieja y Vinalopó (CEIm) de los Hospitales Universitarios de Torrevieja y Vinalopó en septiembre del 2018, con número de referencia CEIm 2018/01 (Anexo 6).
- ✓ El estudio se desarrolló de acuerdo con la Declaración de Helsinki, modificada en la Asamblea General 64 WMA que tuvo lugar en Fortaleza, Brasil en octubre del 2013, y la legislación española en materia de Ensayos Clínicos en seres humanos.
- ✓ De acuerdo con la legislación española aplicable, el tratamiento del estudio se clasifica como un complemento alimenticio o suplemento dietético.
- ✓ El investigador explicó a cada participante la naturaleza del estudio, sus propósitos, procedimiento, duración prevista y los potenciales riesgos y beneficios relacionados con la participación en el estudio, así como cualquier inconveniente que este le pudiera suponer. Además se les proporcionó la Hoja de información al paciente (Anexo 1).
- ✓ Cada uno de las participantes fue advertida de que su participación en el estudio sería voluntaria y que podría abandonar el estudio en cualquier momento, sin que esto afectase a su tratamiento médico posterior ni a su relación con el médico que le trató.
- ✓ El CI fue proporcionado mediante un escrito estándar, en lenguaje fácilmente comprensible para el participante. El sujeto dispuso del tiempo suficiente para leer y entender las explicaciones antes de fechar y firmar el CI y recibió una copia del documento firmada (Anexo 2). Ningún sujeto fue incluido en el estudio sin haber otorgado previamente su consentimiento.

- ✓ La información fue recogida de forma codificada en el CRD (Anexo 4) y el programa informático de historias clínicas Florence siguiendo la Regulación de la Unión Europea de protección de datos 2016/679.

- ✓ El promotor del estudio contaba con una Póliza de Seguros de Responsabilidad Civil cubriendo los daños y perjuicios que como consecuencia del estudio clínico pudieran resultar para la persona en que hubiere de realizarse, así como la responsabilidad del promotor del estudio clínico, del investigador principal, sus colaboradores y del titular del centro en que se realizó el estudio clínico, en los términos establecidos en el Real Decreto 1090/2015 del 4 de diciembre. La póliza se ajustó en sus límites, garantías, cobertura, etc., a todo lo dispuesto en el citado Real Decreto 1090/2015 y la Ley 29/2006 de 26 de julio de garantías y uso racional de los medicamentos y a la normativa vigente en materia de seguros en España.

V- RESULTADOS

CAPÍTULO V - RESULTADOS

5.1 Resultados del desarrollo del estudio

Para obtener la muestra de pacientes deseada, se evaluaron 201 mujeres, 121 de las cuales fueron eliminadas porque no cumplían con los criterios de inclusión / exclusión. El reclutamiento finalizó cuando se alcanzó una muestra de 80 pacientes. Se contabilizó la adherencia al tratamiento mediante el conteo de las cápsulas sobrantes aportadas por cada paciente en la Visita 3. Hubo cinco pacientes que fueron retiradas del estudio: tres pacientes no asistieron a la Visita 3, una no se adhirió al tratamiento y otra paciente del Grupo 2 (placebo) se retiró debido a sensación de distensión abdominal y edema leve en las extremidades inferiores unos días después del inicio del tratamiento. No se encontraron otros eventos adversos. Finalmente, dos sujetos fueron excluidos en el análisis final de los datos debido a errores en el procesamiento de sus muestras. El tamaño final de la muestra de pacientes con muestras vaginales válidas al principio y al final del estudio fue de 73 pacientes (Grupo 1, n = 37; Grupo 2, n = 36). El diseño del estudio está esquematizado en la Figura 12.

Las muestras se analizaron utilizando técnicas de secuenciación masiva basados en la amplificación y posterior secuenciación del gen 16S rARN. En este apartado detallaremos todos los resultados obtenidos en ambos grupos de tratamiento en cada nivel taxonómico, así como los hallazgos en cuanto el estado basal de la microbiota vaginal de todas las pacientes analizadas en conjunto como un estudio longitudinal prospectivo.

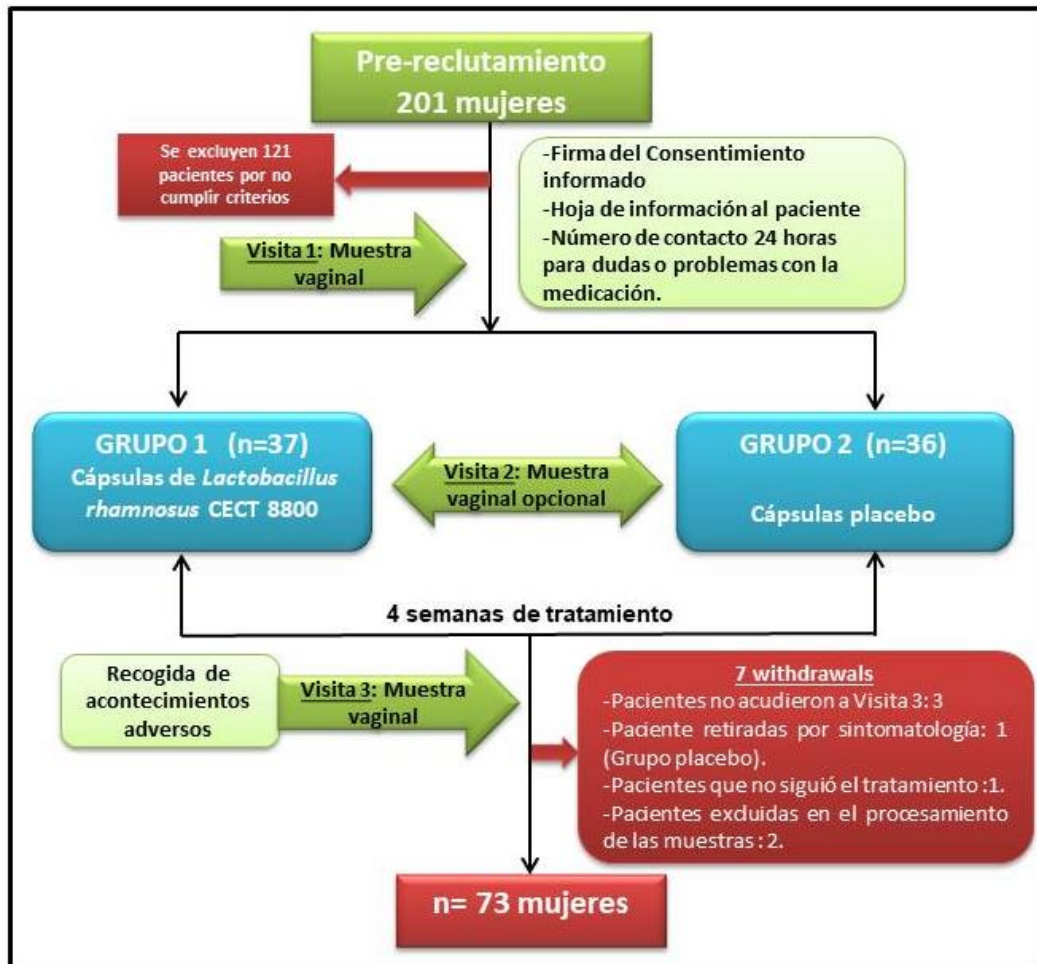


Figura 12. Esquema del diseño del estudio

5.2 Resultados del análisis bioinformático de la evolución por grupos bacterianos específicos

Tras finalizar el análisis bioinformático de las muestras se puede afirmar lo siguiente:

- ✓ El rendimiento de la amplificación de las librerías ha sido óptimo.
- ✓ Los perfiles se estudian a nivel de género como máximo, pero se aportan los datos a nivel de especie a modo informativo para poder comentar que

especies podrían estar implicadas, aunque el producto de la PCR al ser de alrededor de 400nts para bacterias, no permite asegurar la correcta identificación de especies.

- ✓ Con el número de secuencias inspeccionado para cada una de las muestras en el perfil de bacterias, podemos afirmar que estamos cerca de la zona de plato, con lo que el aumento de secuencias no nos daría un gran aumento en el número de géneros nuevos detectados. Esto lo podemos apreciar en las *Curvas de Rarefacción* (Figura 13). En esta figura se comprueba que se ha conseguido identificar la práctica totalidad de los géneros distintos presentes en las muestras, ya que todas ellas han conseguido una saturación completa en las curvas.

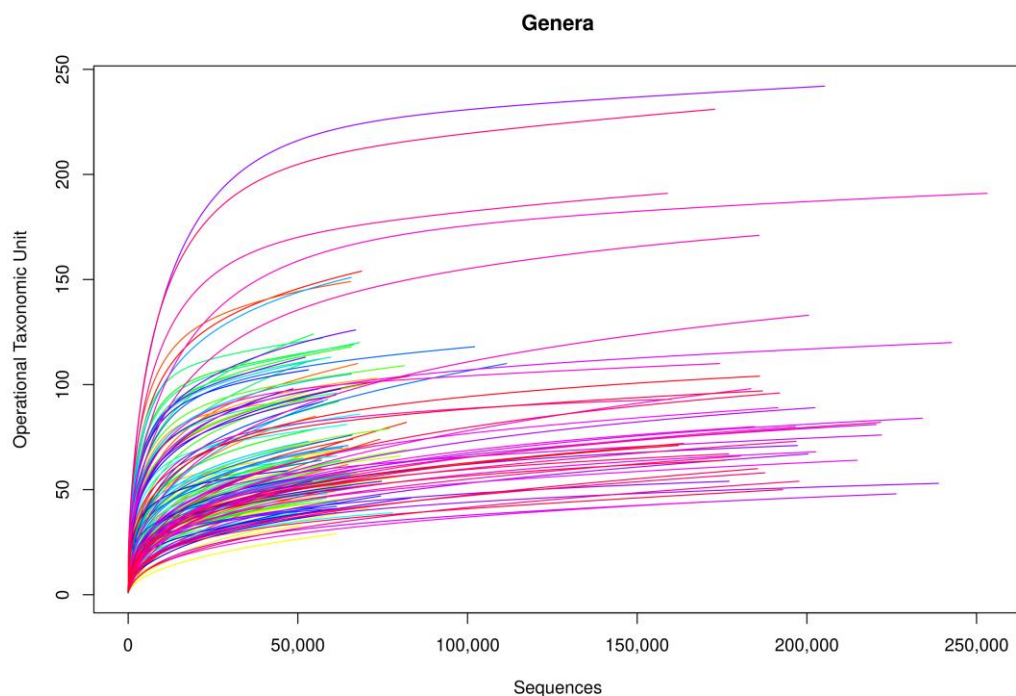


Figura 13. *Curvas de Rarefacción* de las muestras amplificadas para la detección de bacterias. A mayor número de secuencias se detectan nuevos géneros, hasta que llega un punto que por más secuencias que analicemos el número de géneros que se detectan no aumenta y en ese momento se llega al plato.

- ✓ Los resultados obtenidos en la secuenciación de las muestras de bacterias se encuentran ilustrados en la Figura 14. Estos resultados indican la proporción de cada género bacteriano encontrado en cada muestra.

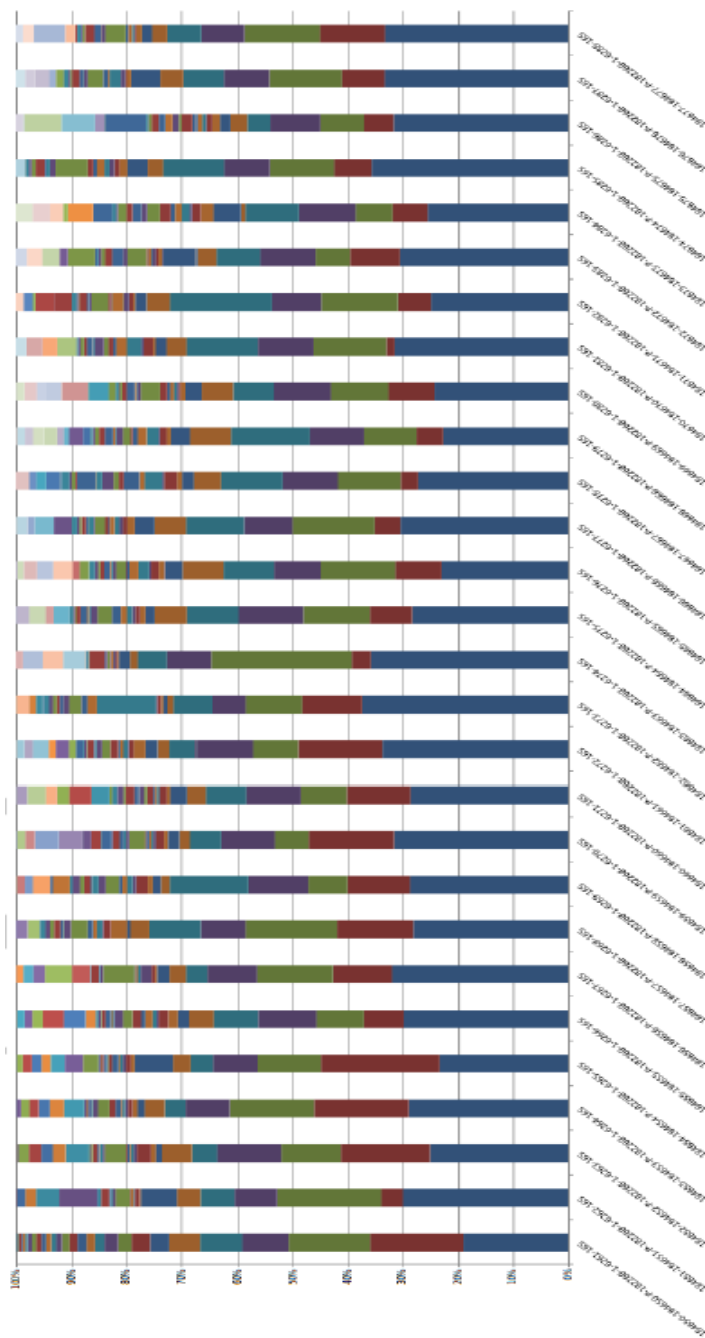


Figura 14. Gráfica de barras acumulativas comparando los principales géneros detectados en las muestras con los perfiles de bacterias basadas en el 16s rARN.

5.3. Resultados obtenidos tras comparar ambos grupos de tratamiento

5.3.1 Resultados de la evolución de *Lactobacillus* a lo largo del estudio.

Como primer punto del estudio se analizó la evolución del género *Lactobacillus* a lo largo del estudio. Las Figuras 15 y 16, así como la Tabla 12 ilustran la evolución del género *Lactobacillus* y la especie *L. rhamnosus*, empleando para ello el valor Delta (diferencia tiempo final vs tiempo inicial,) en los grupos probiótico (CECT 8800) y placebo. Como puede observarse, no se detectaron diferencias en la evolución del género *Lactobacillus* ni de la especie *L. rhamnosus* entre los grupos que tomaron CECT 8800 y placebo, aunque para nuestra especie se obtuvo un valor de p más reducido (p-value = 0,13, test de Wilcoxon).

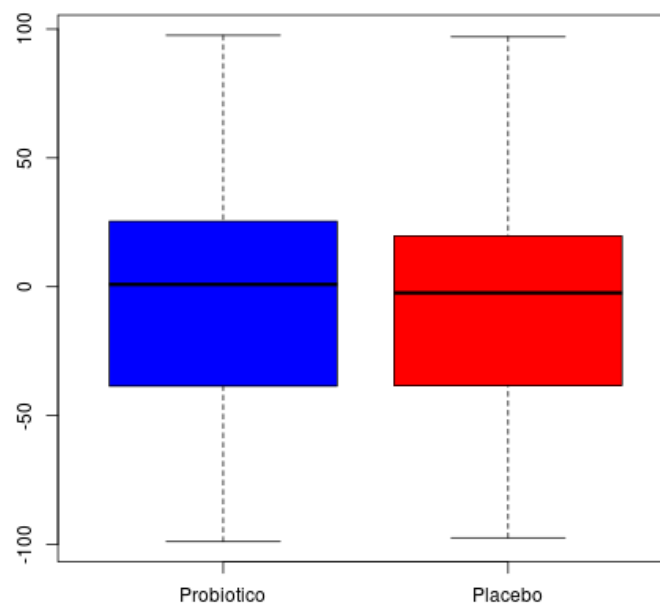


Figura 15. Valores Delta (% tiempo final vs % tiempo inicial) del género *Lactobacillus* en los dos grupos de estudio. Un valor delta positivo muestra un

incremento del grupo durante el estudio, mientras que un valor negativo muestra una disminución.

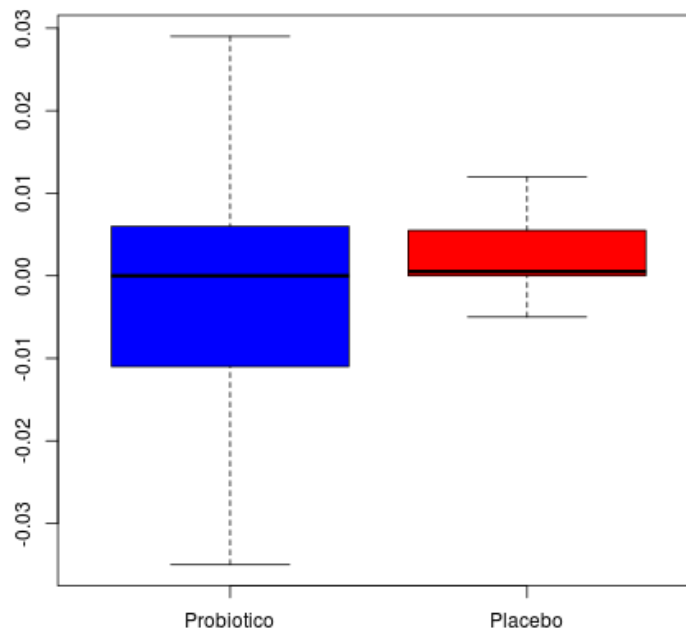


Figura 16. Valores Delta (% tiempo final vs % tiempo inicial) de la especie *L. rhamnosus* en los dos grupos de estudio. Un valor delta positivo muestra un incremento del grupo durante el estudio, mientras que un valor negativo muestra una disminución.

| Grupo | p-Valor (Wilcoxon Test) CECT 8800 vs placebo |
|----------------------|----------------------------------------------|
| <i>Lactobacillus</i> | W = 746, p-value = 0.7908 |
| <i>L. rhamnosus</i> | W = 575, p-value = 0.13 |

Tabla 12. P-valor de los estudios estadísticos de *Lactobacillus* y *L. rhamnosus*, entre los grupos de tratamiento probiótico vs placebo.

5.3.2 Resultados de la evolución de las especies patógenas vaginales a lo largo del estudio en ambos grupos.

Aunque el uso y mejora en las herramientas de caracterización del microbioma están proporcionando cada vez una mayor información acerca del contenido de las comunidades bacterianas y del papel de determinadas bacterias en los procesos de patogénesis, existen una serie de grupos bacterianos definidos como patógenos vaginales. En este estudio hemos centrado el análisis en la evolución de los grupos bacterianos patógenos *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Streptococcus agalactiae* y *Cutibacterium acnes* (anteriormente *Propionibacterium acnes*). Para cada uno de ellos se analizó su contenido en cada grupo de tratamiento a los distintos tiempos de toma de la muestra con el fin de obtener la evolución diferencial de cada patógeno y grupo de estudio (valor delta).

Las Figuras 17-19 y Tabla 13 muestran la evolución obtenida para cada uno de los grupos patógenos. En el caso de *P. acnes*, no se obtuvo cuantificación del grupo en las muestras analizadas. Igualmente, no se obtuvieron diferencias significativas en la evolución de los grupos patógenos analizados.

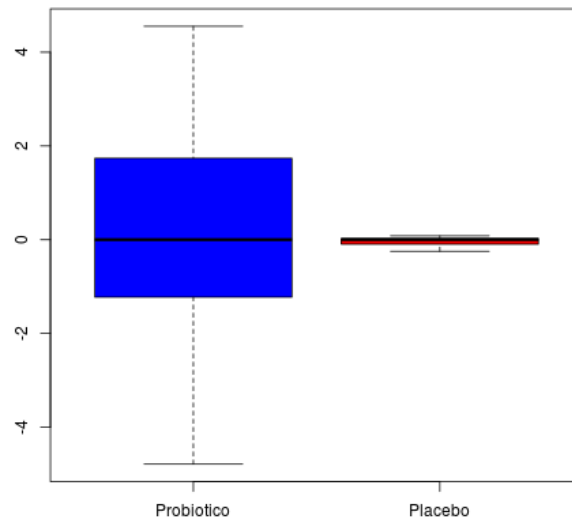


Figura 17. Valores Delta (% tiempo final vs % tiempo inicial) de la especie *A. vaginae* en los dos grupos de estudio. Un valor delta positivo muestra un incremento del grupo durante el estudio, mientras que un valor negativo muestra una disminución.

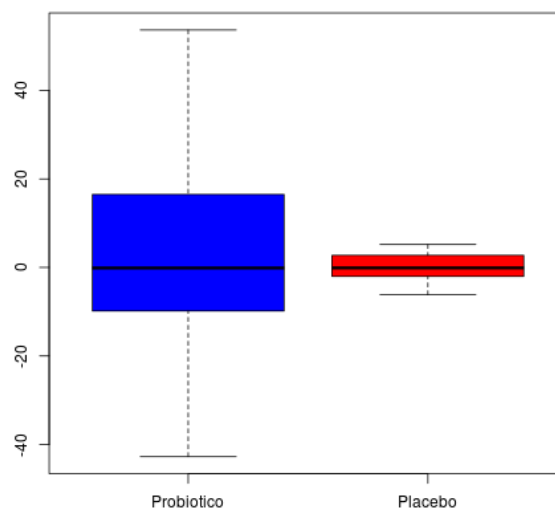


Figura 18. Valores Delta (% tiempo final vs % tiempo inicial) de la especie *G. vaginalis* en los dos grupos de estudio. Un valor delta positivo muestra un incremento del grupo durante el estudio, mientras que un valor negativo muestra una disminución.

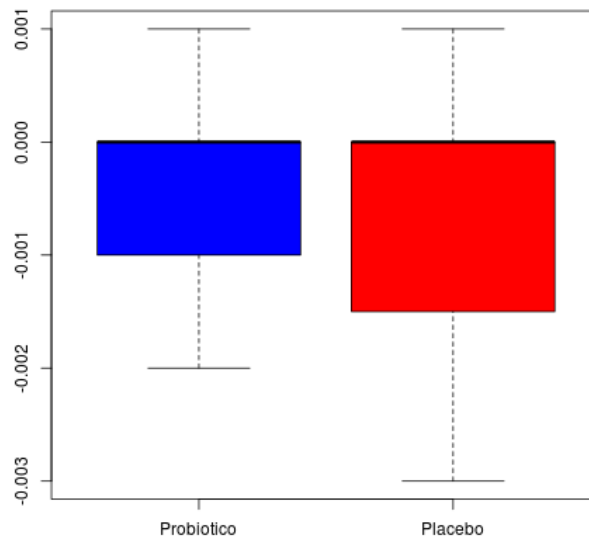


Figura 19. Valores Delta (% tiempo final vs % tiempo inicial) de la especie *S. agalactiae* en los dos grupos de estudio. Un valor delta positivo muestra un incremento del grupo durante el estudio, mientras que un valor negativo muestra una disminución.

| Grupo patógeno | p-Valor (Wilcoxon Test) CECT 8800 vs placebo |
|---------------------------------|----------------------------------------------|
| <i>Atopobium vaginae</i> | W = 730.5, p-value = 0.9171 |
| <i>Gardnerella vaginalis</i> | W = 665, p-value = 0.5728 |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | W = 706.5, p-value = 0.8862 |
| "Patógenos"* | W = 628, p-value = 0.3432 |

Tabla 13. P-valor de los estudios estadísticos de grupos patógenos, probiótico vs placebo. *Incluye a los grupos analizados previamente, identificados en el artículo de Ata et al (2019)²⁰⁵.

Posteriormente, se llevó a cabo un estudio de la evolución de los patógenos en general, es decir, se unificaron los distintos valores porcentuales obtenidos para cada uno de los patógenos identificados en las muestras y se analizó el valor delta a partir de esta suma. El resultado obtenido se muestra en la Figura 20. En este caso, sí que se observa una tendencia a un delta negativo en cuanto a evolución de “patógenos” en el grupo que consumió CECT 8800, pero no significativa. En el Anexo 5 está reflejada la presencia de *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800, así como patógenos hallados por paciente, grupo de tratamiento y visita.

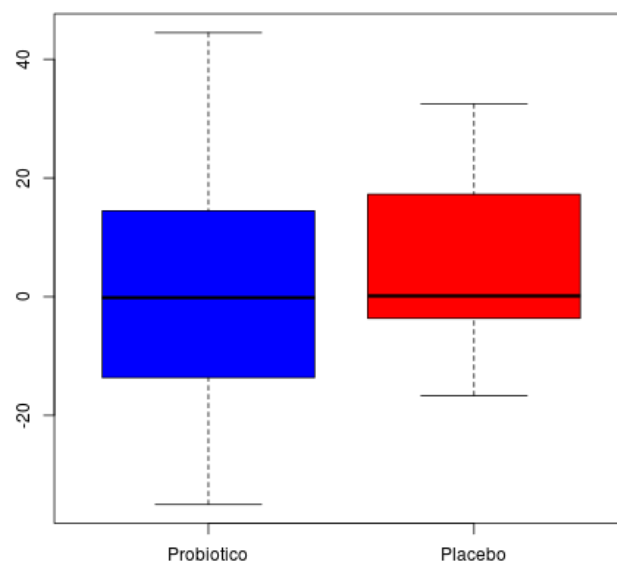


Figura 20. Valores Delta (% tiempo final vs % tiempo inicial) del grupo definido como “patógeno” en los dos grupos de estudio. Un valor delta positivo muestra un incremento del grupo durante el estudio, mientras que un valor negativo muestra una disminución.

Por último, se analizó si la ingesta del probiótico CECT 8800 tuvo un impacto diferencial en la diversidad encontrada en la microbiota bacteriana vaginal de las mujeres incluidas en el estudio. La Figura 21 y Tabla 14 resumen los resultados encontrados, referidos al valor delta. La evolución del *índice de Shannon* en ambos casos fue muy similar para ambos grupos, no encontrándose diferencias significativas en el impacto del tratamiento sobre la diversidad de la microbiota.

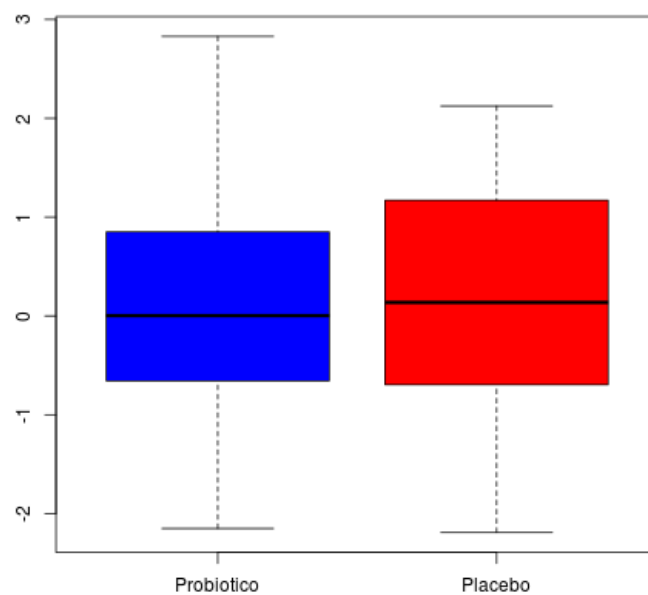


Figura 21. Valores Delta (% tiempo final vs % tiempo inicial) en cuanto a la alfa diversidad, referido al *índice de Shannon*, en los dos grupos de estudio. Un valor delta positivo muestra un incremento del índice durante el estudio, mientras que un valor negativo muestra una disminución.

| Índice de alfa-diversidad | p-Valor (Wilcoxon Test) CECT 8800 vs placebo |
|---------------------------|----------------------------------------------|
| <i>Índice de Shannon</i> | W = 686, p-value = 0.729 |

Tabla 14. P-valor de los estudios estadísticos de diversidad referida al *índice de Shannon*, probiótico vs placebo.

5.3.3 Resultados del análisis bioinformático de la evolución por vaginotipos.

Como ya hemos comentado en el apartado 2.2.4 Comunidades bacterianas o vaginotipos, Ravel J et al⁶ definieron cinco agrupaciones bacterianas con las cuales definir las variaciones en la composición de la microbiota vaginal de las pacientes. De éstos, cuatro vaginotipos son dominados por *Lactobacillus* (I,II,III,V), mientras que el tipo IV contiene proporciones más bajas de bacterias ácido lácticas y aumento de organismos anaerobios estrictos. En nuestro estudio, inicialmente se observó que el grupo asignado al tratamiento probiótico contenía un mayor número de mujeres con microbiota vaginal disbiótica (tipo IV) que las del grupo placebo. A continuación, la Figura 22 y 23 muestran la representación gráfica de la evolución de los vaginotipos en la Visita 1 y 3 en el grupo placebo y probiótico respectivamente. En el Anexo 5 se encuentran reflejados los vaginotipos hallados en cada paciente según grupo de tratamiento y visita.

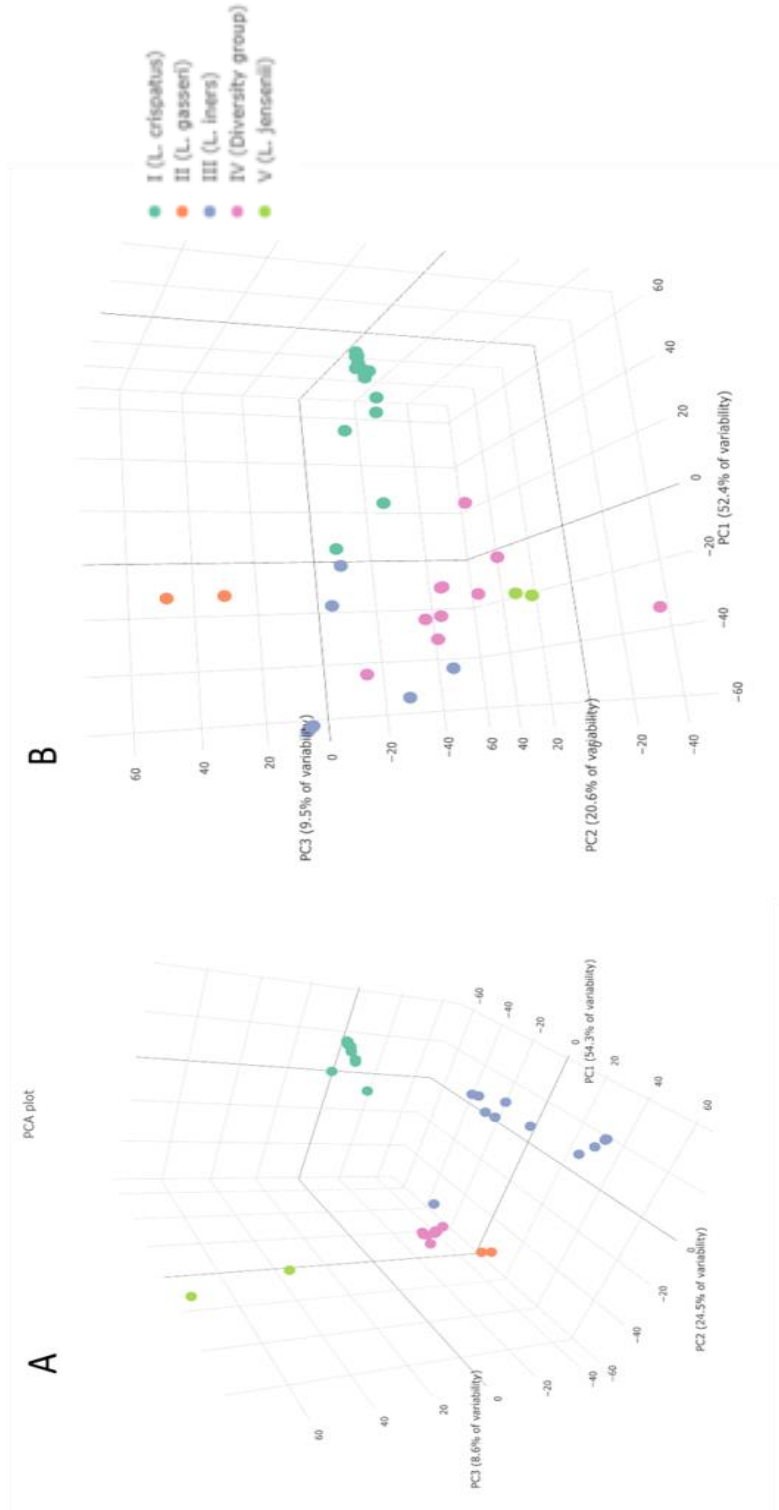


Figura 22. Representación de los vaginotipos encontrados en el grupo placebo, en la Visita 1 (A) y Visita 3 (B). Los grupos I, II, III y V son considerados como sanos, mientras que el vaginotipo IV se considera como disbiótico, según Ravel J et al⁶.

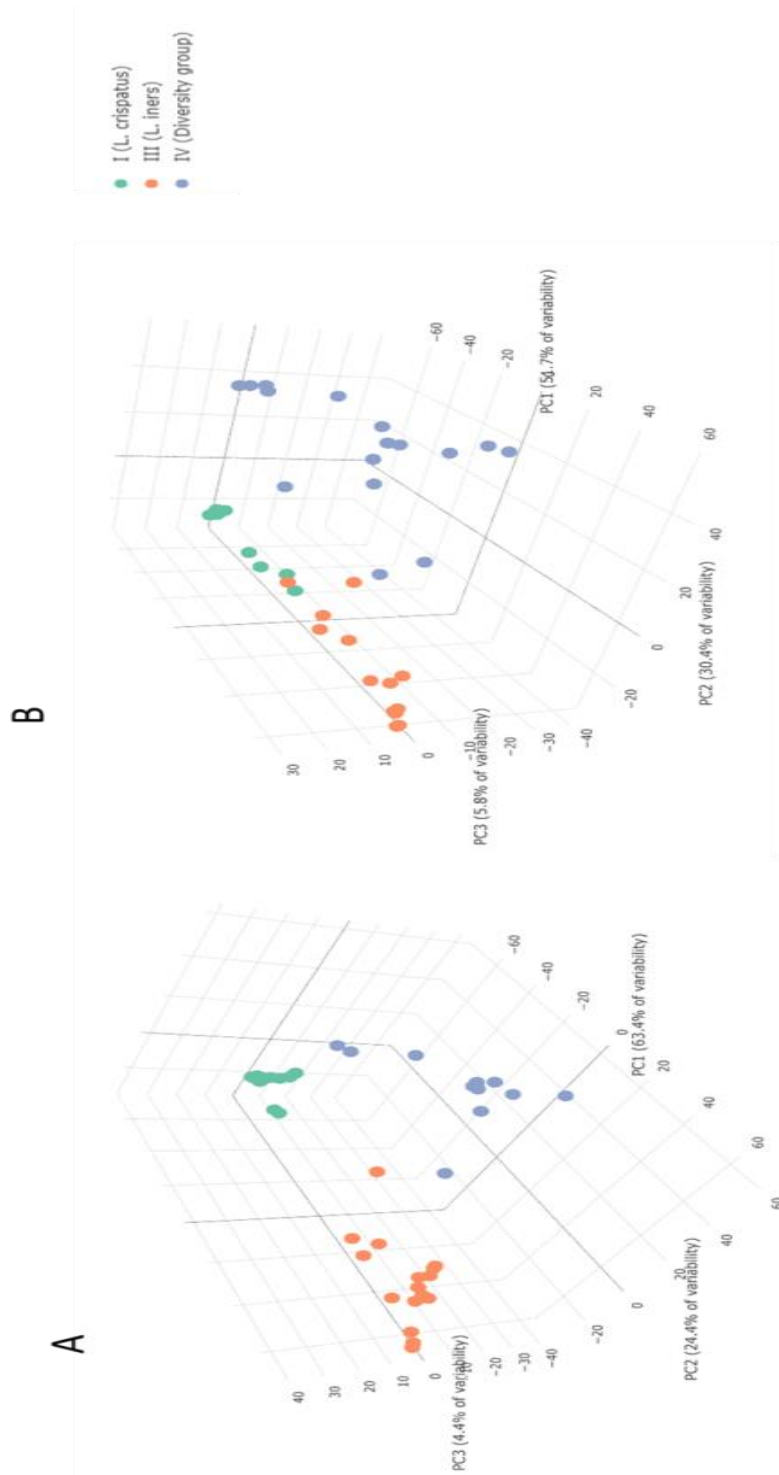


Figura 23. Representación de los vaginotipos encontrados en el grupo probiótico, en la Visita 1 (A) y Visita 3 (B). Los grupos I, II, III y V son considerados como sanos, mientras que el vaginotipo IV se considera como disbiótico, según Ravel J et al⁶.

5.4 Resultados del estudio longitudinal de la composición de la microbiota vaginal por grupos taxonómicos.

5.4.1 Resultados a nivel de género

5.4.1.1 Pruebas de dispersión a nivel de género

A nivel de género no existe una distinción significativa en cuanto a diversidad entre las muestras, tal y como se puede observar en las Figuras 24-26.

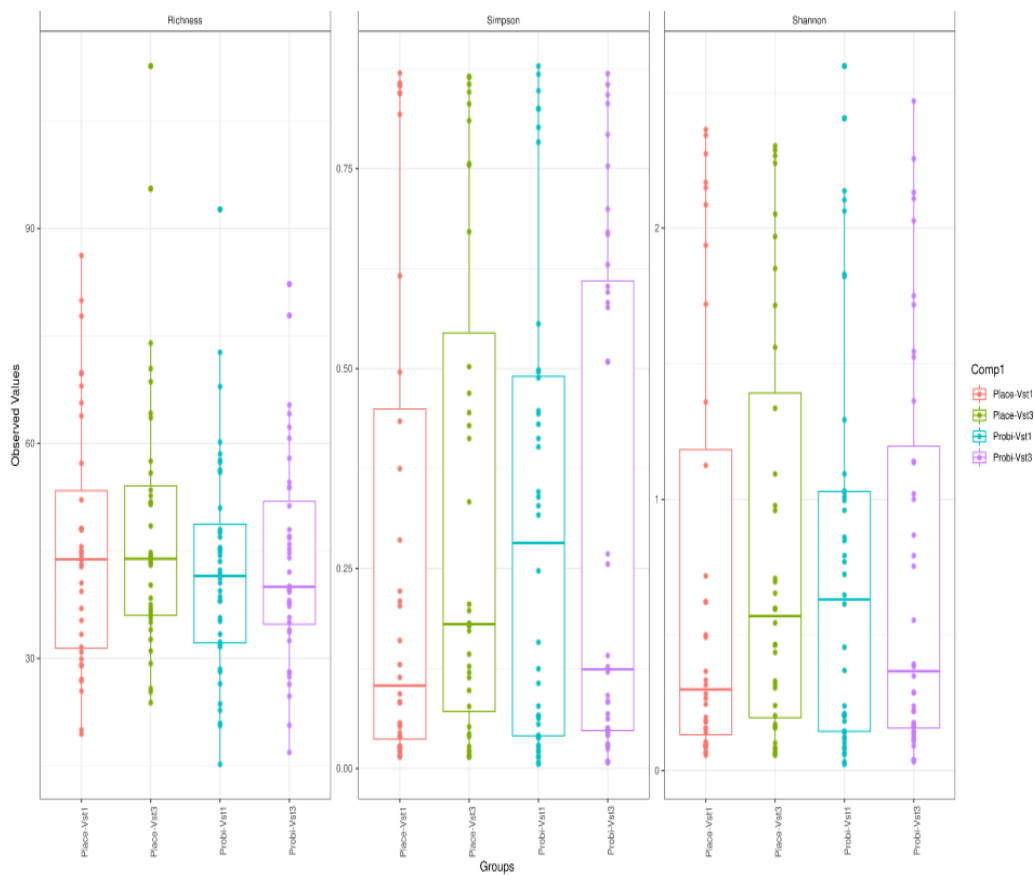


Figura 24. Figuras boxplot que representan la diversidad de las muestras según las variables estudiadas. Los índices de diversidad mostrados corresponden a la Riqueza de la muestra, *índice de diversidad de Shannon* y de *Simpson*.

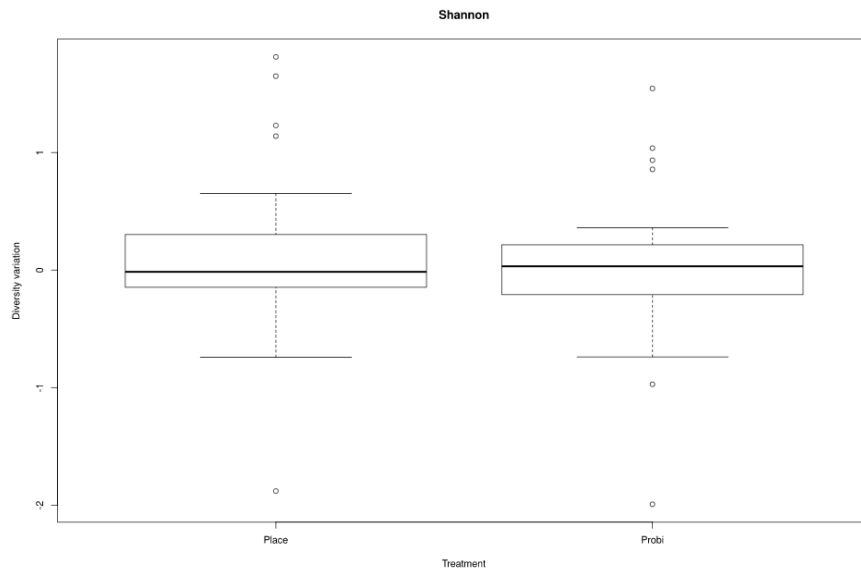


Figura 25. Diagrama de cajas (boxplot) del resultado de la aplicación del *índice de Shannon* en ambos grupos de tratamiento. Observamos que no existen diferencias significativas en cuanto a la diversidad de las muestras a nivel de género.

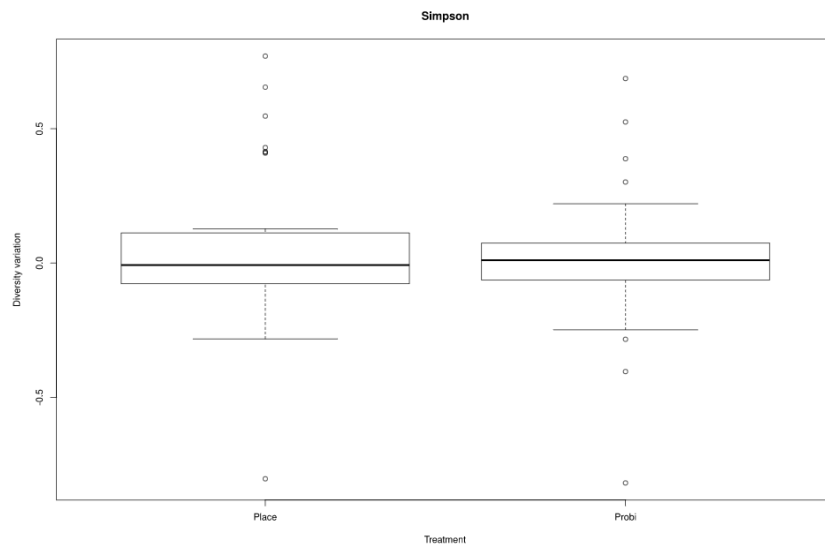


Figura 26. Diagrama de cajas (boxplot) del resultado de la aplicación del *índice de Simpson* en ambos grupos de tratamiento. Observamos que no existen diferencias significativas en cuanto a la diversidad de las muestras a nivel de género.

Además, hemos realizado el test denominado *Local Contribution to Beta Diversity* (Figura 27) en el que se puede comprobar que no hay ninguna muestra que destaque sobre todas las demás, tanto en el caso del estudio a nivel de género como en el estudio al resto de niveles taxonómicos, lo que indica que la contribución de todas las muestras a la diversidad es relativamente homogénea. Esto sirve para confirmar la ausencia de posibles outliers o valores atípicos que puedan alterar el resultado.



Figura 27. Gráfica de barras acumulativas comparando los géneros detectados en las muestras con los perfiles de bacterias basadas en el 16S rARN en ambos grupos de tratamiento en Visita 1 y 3.

5.4.1.2 Resultado del Análisis Principal de Componentes (PCoA) a nivel de género.

Al realizar una gráfica de coordenadas principales (PCoA) (Figura 28) se puede observar como no existe una tendencia a diferenciar las muestras entre las variables, teniendo en cuenta el nivel de género. Esto se puede comprobar por el análisis de PERMANOVA realizado sobre las variables en la PCoA, cuyo p-valor es mayor a 0.05. Además, se ha realizado un *test de beta dispersión por parejas de variables* para ver si existe una variabilidad significativa entre ellas, donde el p-valor obtenido ha sido mayor a 0.05 en todas las comparaciones (Figura 28), por lo que no se puede intuir una relación directa entre las variables propuestas y la población bacteriana a nivel de género.

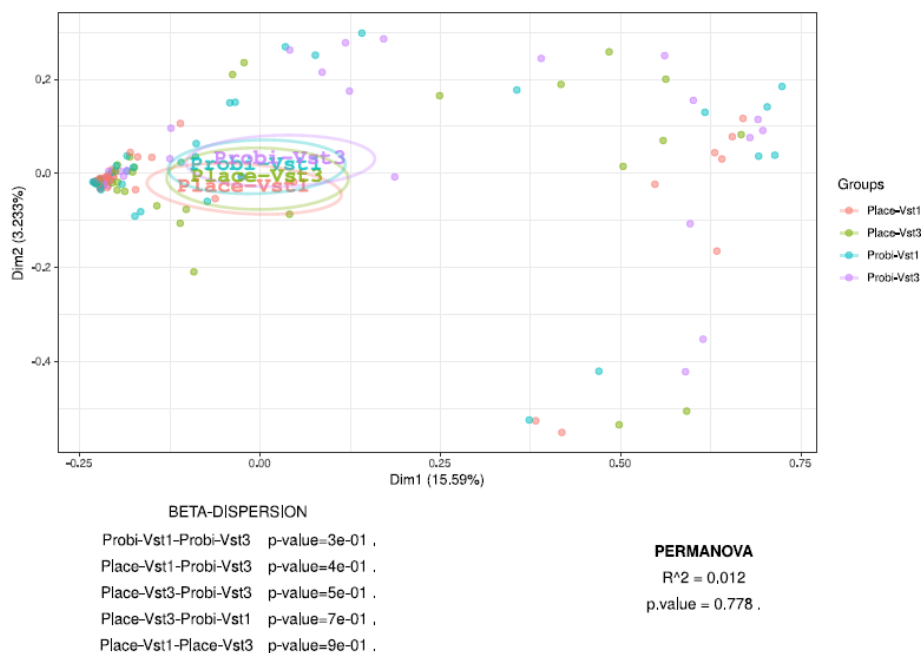


Figura 28. Gráfica de coordenadas principales en las que se muestra las diferencias entre las muestras y si se agrupan correctamente a nivel de género. El análisis PERMANOVA no ha detectado significancia estadística en cuanto a la separación entre grupos a nivel de género ($p > 0,05$).

5.4.1.3 Resultados del Canonical Correlation Analysis (CCA) a nivel de género

El análisis de CCA (Figura 29) logra diferenciar los grupos probiótico y placebo a nivel de género, ya que consigue separar con bastante precisión las muestras cuando intenta maximizar la correlación en dicha variable.

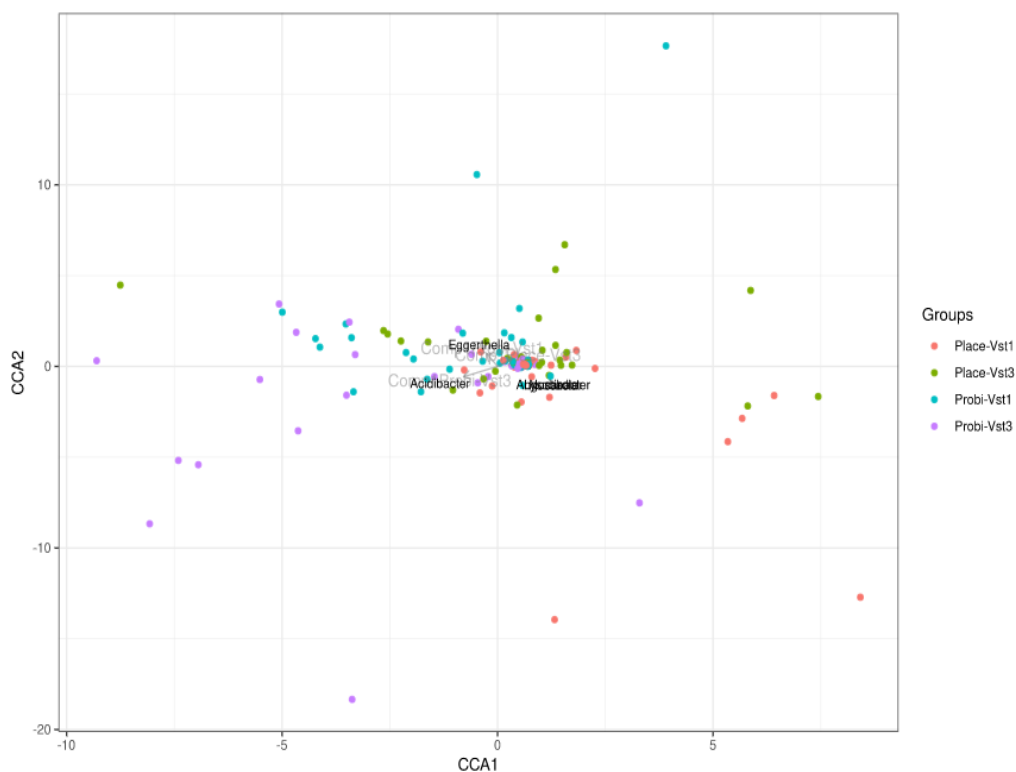


Figura 29. Gráfica que muestra el Canonical Correspondance Analysis a nivel de género. En esta gráfica se han maximizado las diferencias entre los grupos comprobando que existe cierta combinación de géneros que consigue definir las diferencias entre los grupos propuestos (probióticos vs placebo para cada visita).

5.4.1.4 Resultados del análisis con *DESeq2* a nivel de género

El análisis realizado con el programa *DESeq2* permite conocer los organismos que realmente están produciendo las diferencias entre las variables propuestas. En el caso del género, el resultado de aplicar el algoritmo de *DESeq2* a la variable Visita se encuentra en la Tabla 15. Para comprobar que organismos son

realmente relevantes en la comparación entre las dos visitas hay que tener en cuenta tres de las columnas: *baseMean*, *log2FoldChange* y *padj*:

- ✓ La columna *baseMean* indica la media de lecturas que se han encontrado de dicho organismo entre todas las muestras. A mayor valor, mayor relevancia entre el conjunto de datos al tratarse de una bacteria con una mayor presencia.
- ✓ La columna *log2FoldChange* es el logaritmo de base 2 de la variación de la bacteria en cuestión en la Visita 1 vs Visita 3. A mayor valor absoluto de *foldchange*, existe una mayor diferencia entre las poblaciones de dicha bacteria entre los grupos estudiados. Valores positivos indican que el primer grupo (Visita 1) estudiado presenta valores más elevados de la bacteria en cuestión y valores negativos indican el contrario.
- ✓ La columna *padj* contiene el p-valor ajustado para reducir el número de falsos positivos. P-valores pequeños indican una significancia aceptable de la bacteria indicada.

| Géneros | <i>baseMean</i> | <i>log2FoldChange</i> | <i>lfcSE</i> | <i>stat</i> | <i>pvalue</i> | <i>padj</i> |
|----------------------|-----------------|-----------------------|--------------|-------------|---------------|-------------|
| <i>Lactobacillus</i> | 31946,17 | 0,08 | 0,23 | 0,33 | 0,74 | 0,85 |
| <i>Gardnerella</i> | 3384,01 | -0,66 | 0,43 | -1,55 | 0,12 | 0,29 |
| <i>Prevotella</i> | 2317,66 | -0,20 | 0,44 | -0,46 | 0,64 | 0,80 |
| <i>Atopobium</i> | 1087,03 | -0,20 | 0,49 | -0,41 | 0,68 | 0,81 |
| <i>Streptococcus</i> | 348,41 | -0,05 | 0,50 | -0,09 | 0,93 | 0,97 |
| <i>Dialister</i> | 282,98 | 0,46 | 0,46 | 1,00 | 0,32 | 0,52 |
| <i>Ureaplasma</i> | 278,09 | -0,61 | 0,48 | -1,27 | 0,20 | 0,40 |

Tabla 15. Resultados del test de DESeq2 a nivel de género. Se muestran los principales géneros estudiados en la comparación de Visita 1 vs Visita 3.

Como se refleja en la tabla, al unir los datos obtenidos en todas las muestras, el género mayoritario entre los estudiados fue el *Lactobacillus* con gran diferencia aunque sin ser estadísticamente significativo (p-valor ajustado=0,85). Las siguientes posiciones las ocupan *Gardnerella* (p-valor ajustado=0,29), *Prevotella* (p-valor ajustado=0,80) y *Atopobium* (p-valor ajustado=0,81), siendo menos frecuentes *Streptococcus*, *Dialister* y *Ureaplasma*. Por otro lado, en la Visita 1 existió un número superior de los géneros *Lactobacillus* y *Dialister*, mientras que el resto

de géneros fueron inferiores en dicha visita al compararlo con la Visita 3. A pesar de que ninguno de estos valores fue estadísticamente significativo con $p > 0,05$, en la columna *p_{adj}* vemos valores de *p* reducidos principalmente en el género *Gardnerella*, sugiriendo que este microorganismo ha aumentado en la Visita 3 en comparación con la Visita 1 con una significancia aceptable.

Se han realizado algunas gráficas que permiten comprobar los organismos más importantes de cada estudio a la hora de diferenciar entre las Visitas 1 y 3. En concreto, las puntuaciones mostradas en las gráficas de la Figura 30 y 31 corresponden a los valores de importancia que se han obtenido tras aplicar el algoritmo de *RandomForest* a las muestras. Tras realizar diversas simulaciones aleatorias, este algoritmo resume los organismos más necesarios para diferenciar entre la Visita 1 y la 3, y le atribuye un score a cada uno de ellos. Como vemos, los dos géneros más importantes fueron *Cutibacterium* y *Rhodoluna*, mientras que *Lactobacillus* no aparece entre los 10 géneros más relevantes para diferenciar entre grupos.

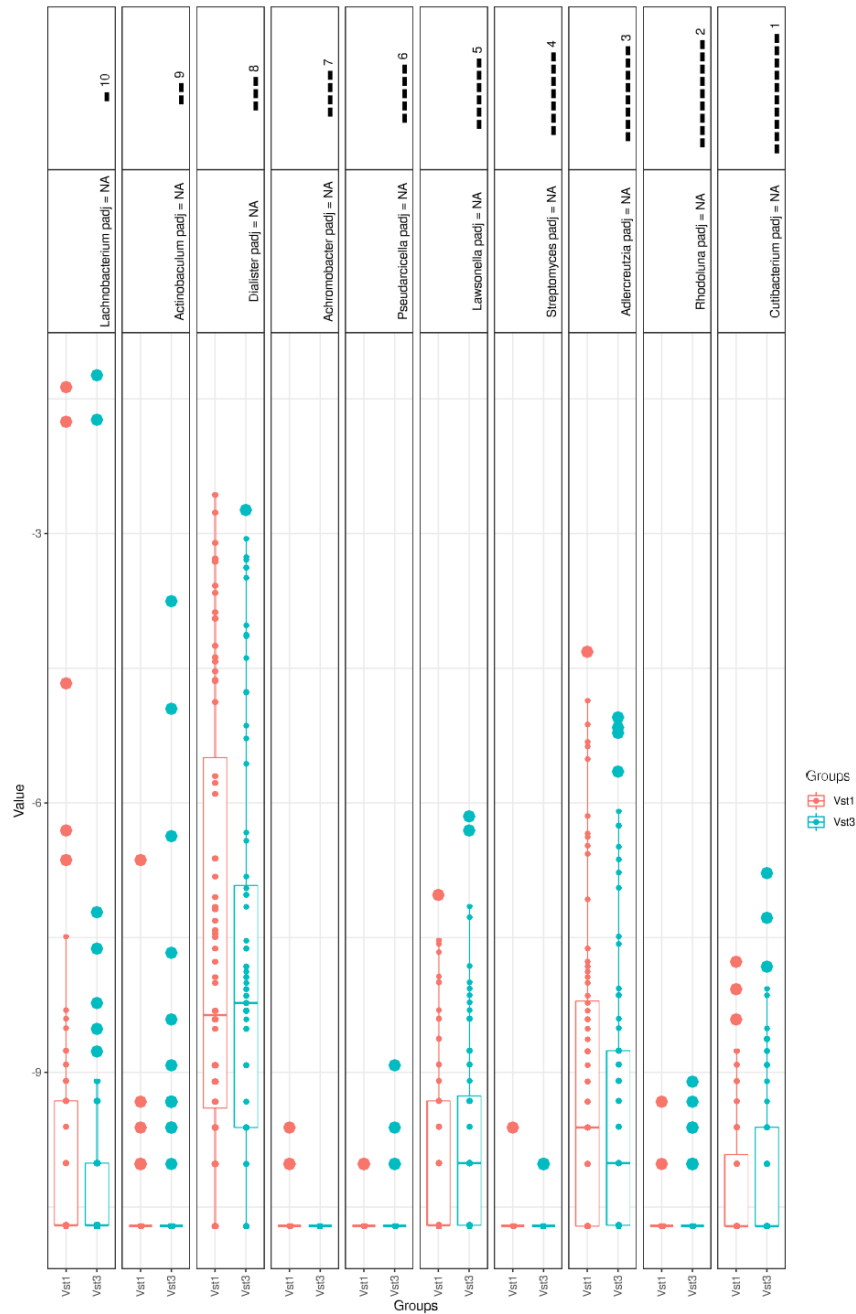


Figura 30. Géneros más importantes encontrados en la comparación según el resultado de *RandomForest*. La importancia viene delimitada por el orden de la parte superior de la gráfica (Del 1 al 10, siendo el 1 el más importante). Aparece un p-valor ajustado de la diferencia entre las poblaciones de cada género y un boxplot con la representación.

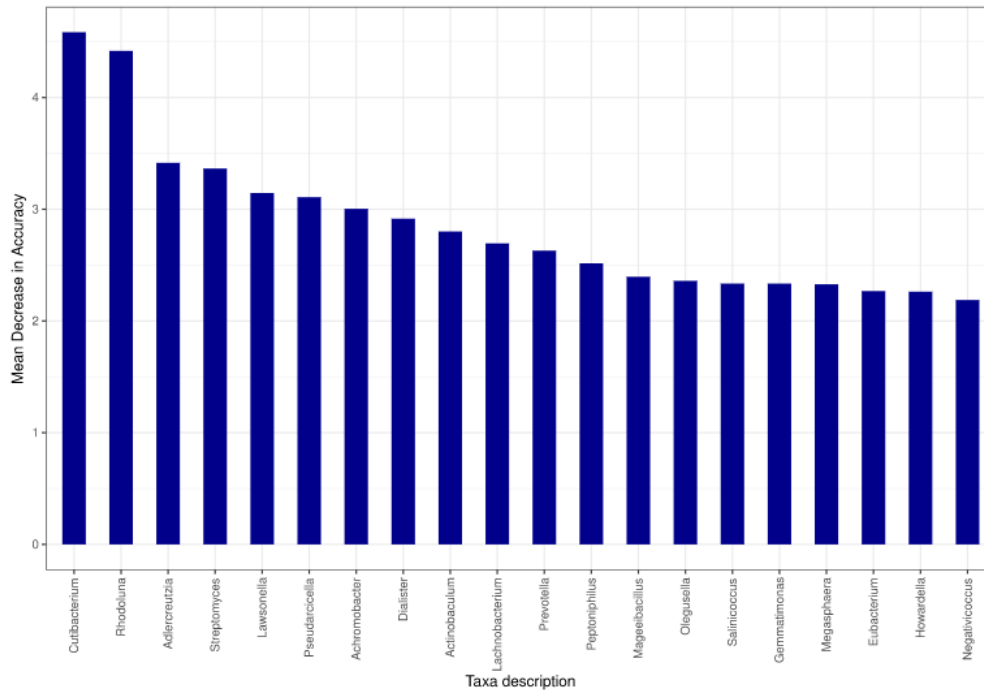


Figura 31. Gráfico de barras representando el valor obtenido mediante *RandomForest* que indica la magnitud de la importancia de cada género a la hora de diferenciar entre visitas.

Las Figura 32, 32.1 y 33 contienen información complementaria para comprender el significado de los resultados del *DESeq*. La Figura 32 y 32.1, refleja lo ya comentado en la Tabla 15 donde existe una reducción de los géneros *Lactobacillus* y *Dialister*, siendo la reducción de este último superior al primero a pesar de que el número absoluto de *Lactobacillus* sea mayor. Por tanto, los *Lactobacillus* no han sufrido grandes variaciones en comparación con los otros géneros entre ambas visitas.

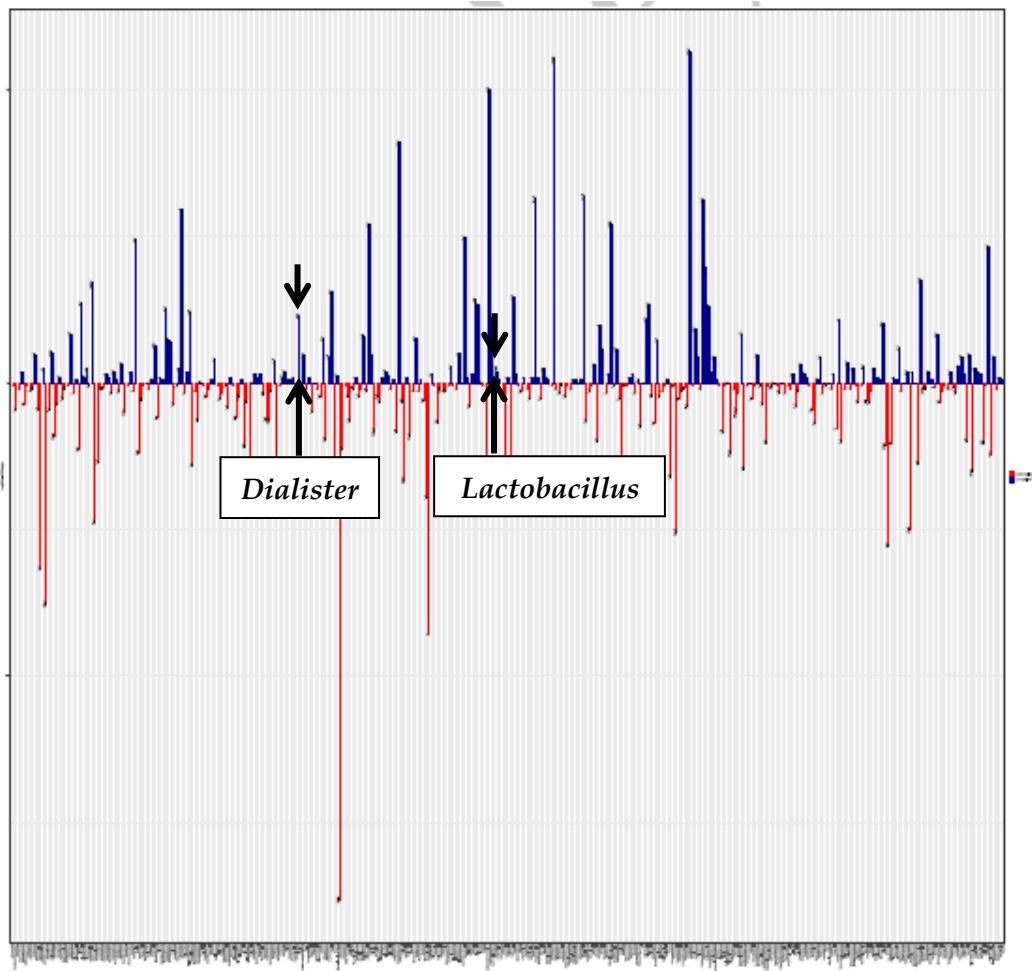


Figura 32. Representación de los valores de *FoldChange* obtenidos al comparar las poblaciones a nivel de género. Las barras azules representan los géneros cuyos valores disminuyen y las barras rojas los que aumentan en la Visita 3.

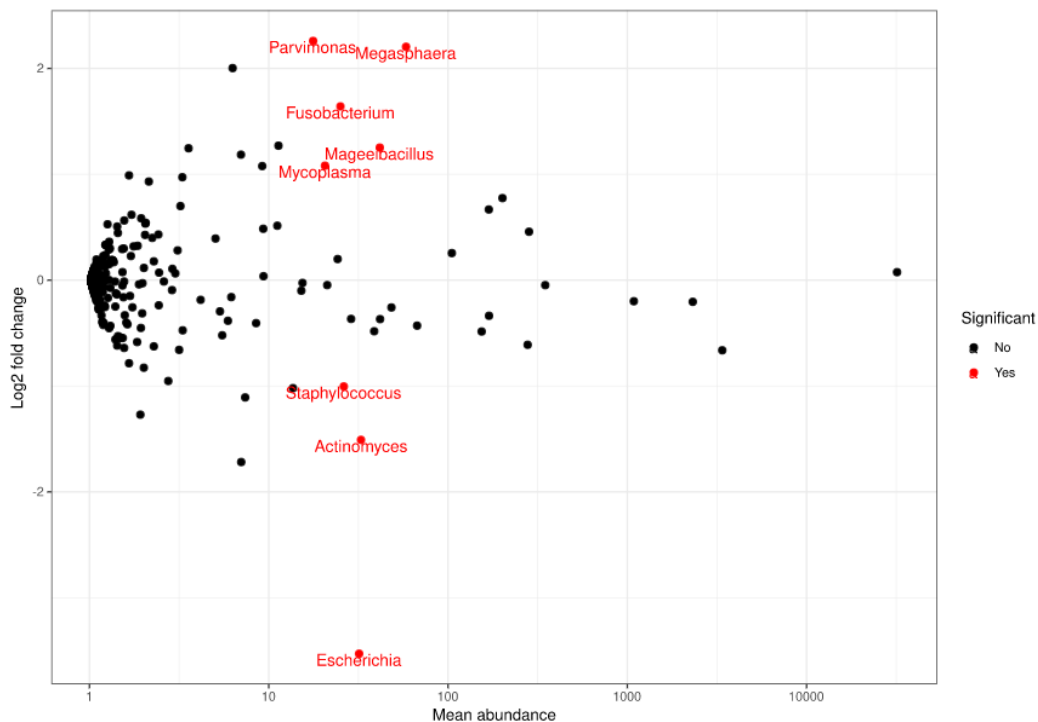


Figura 33. Representación de los valores de *FoldChange* y conteo de secuencias obtenidas al comparar las poblaciones a nivel de género. Los puntos rojos indican los géneros que han aumentado (extremo inferior de la gráfica) o disminuido (extremo superior de la gráfica) de forma significativa en la Visita 3 en la comparación realizada mediante *DESeq*.

5.4.1.5 Heatmap a nivel de género

Los heatmaps son una forma útil y rápida empleada en estudios de secuenciación masiva de microbiota que permite discernir cuales OTUs se encuentran presentes en las muestras y su abundancia relativa. A continuación mostraremos un heatmap para cada una de las unidades taxonómicas con una presencia mayor del 1%, ilustrado como un mapa de colores que va desde el rojo (mayor abundancia) al azul (menor abundancia), donde cada muestra es una columna y cada fila una OTU. Esta representación gráfica facilita la comparación de OTUs entre muestras distintas.

En el heatmap de la Figura 34, destaca el género *Lactobacillus* como microorganismo mayoritario. Otros géneros relevantes son *Gardnerella*, *Prevotella* y *Atopobium*.

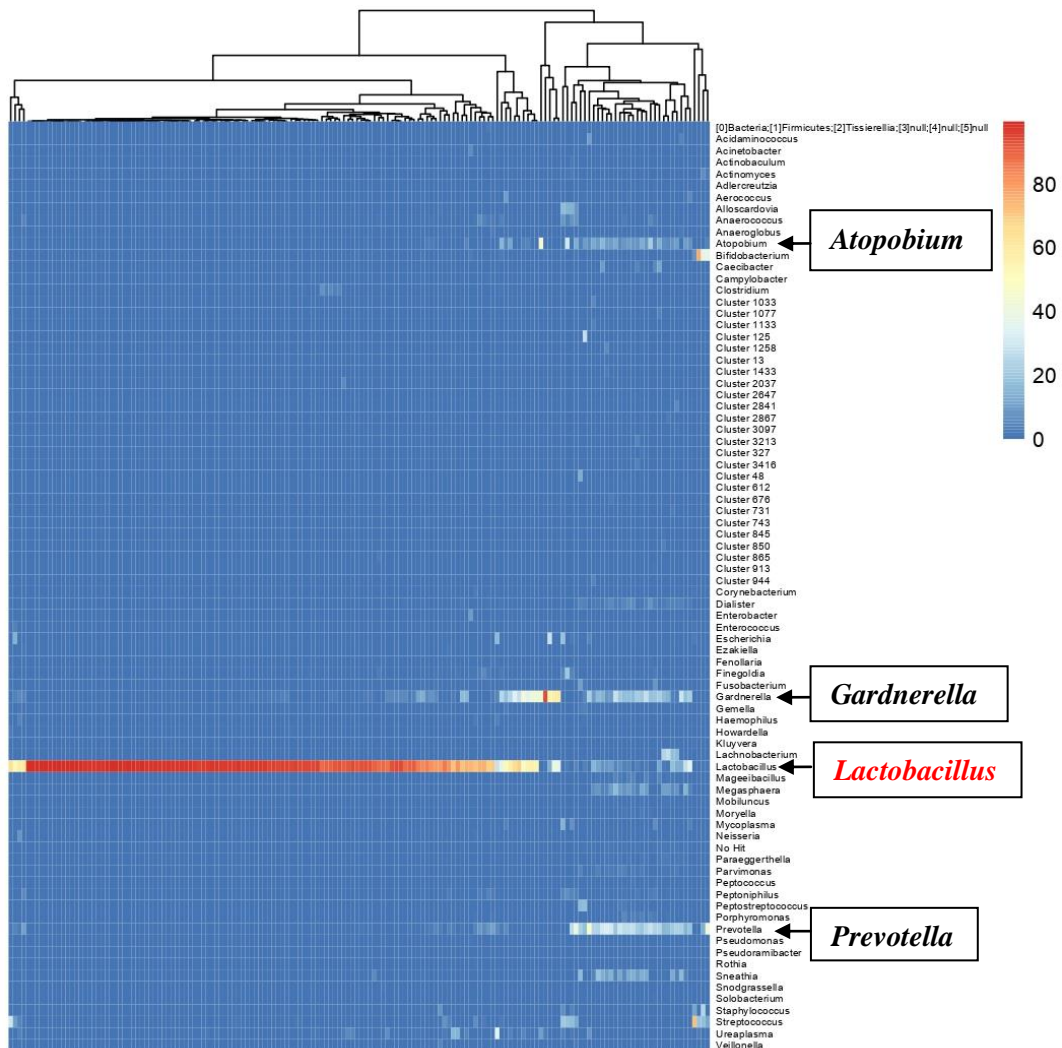


Figura 34. Heatmap a nivel de género. Mapa de colores que va desde el rojo (mayor abundancia) al azul (menor abundancia), donde cada muestra es una columna y cada fila una OTU.

5.4.2 Resultados a nivel de phylum

5.4.2.1 Pruebas de dispersión a nivel de phylum

A nivel de phylum no existe una distinción significativa en cuanto a diversidad entre las muestras, tal y como se puede observar en las Figuras 35-37.

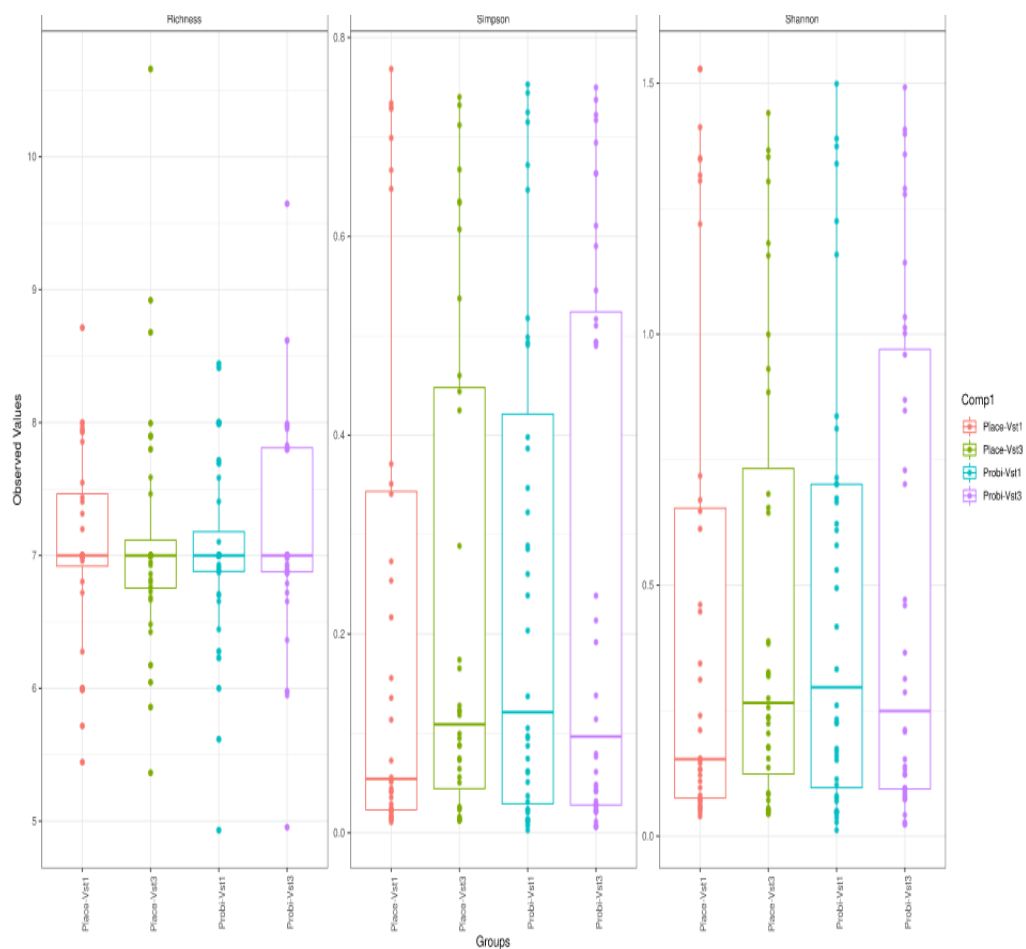


Figura 35. Figuras boxplot que representan la diversidad de las muestras según las variables estudiadas. Los índices de diversidad mostrados corresponden a la Riqueza de la muestra, *índice de diversidad de Shannon* y *Simpson*.

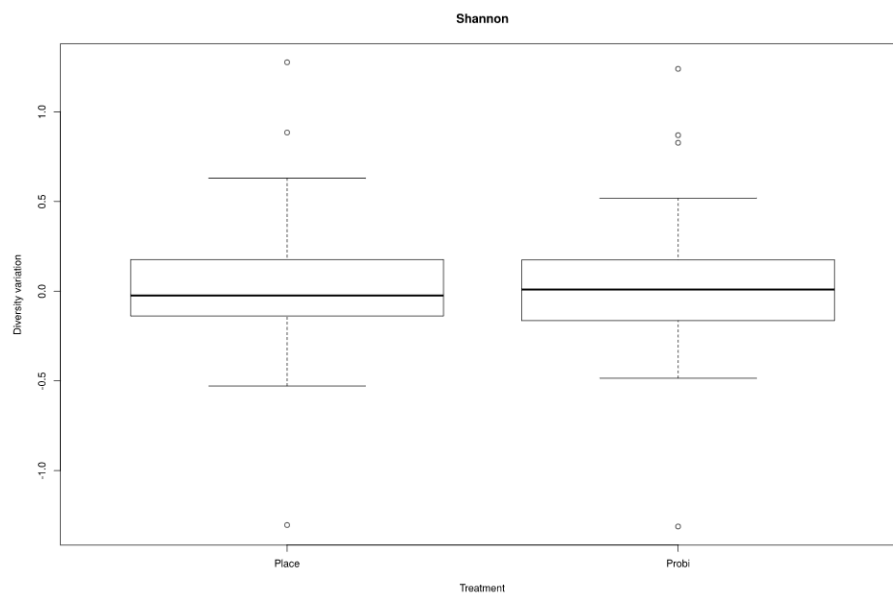


Figura 36. Diagrama de cajas (boxplot) del resultado de la aplicación del *índice de Shannon* en ambos grupos de tratamiento a nivel de phylum. Observamos que no existen diferencias significativas en cuanto a la diversidad de las muestras.

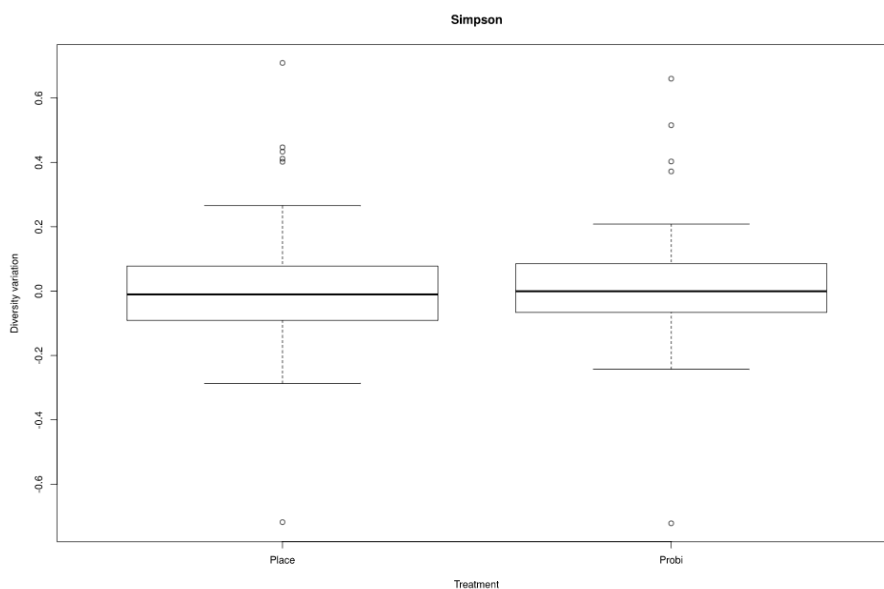


Figura 37. Diagrama de cajas (boxplot) del resultado de la aplicación del *índice de Simpson* en ambos grupos de tratamiento a nivel de phylum. Observamos que no existen diferencias significativas en cuanto a la diversidad de las muestras.

Además, hemos realizado el test denominado *Local Contribution to Beta Diversity* (Figura 38) en el que se puede comprobar que no hay ninguna muestra que destaque sobre todas las demás, a nivel de phylum como en el estudio al resto de niveles taxonómicos, lo que indica que la contribución de todas las muestras a la diversidad es relativamente homogénea. Esto sirve para confirmar la ausencia de posibles outliers o valores atípicos que puedan alterar el resultado.



Figura 38. Gráfica de barras acumulativas comparando los phylum detectados en las muestras con los perfiles de bacterias basadas en el 16S rARN.

5.4.2.2 Resultado del Análisis Principal de Componentes (PCoA) a nivel de phylum.

Al realizar una gráfica PCoA (Figura 39) se puede observar como no existe una tendencia a diferenciar las muestras entre las variables, teniendo en cuenta el nivel de phylum. Esto se puede comprobar por el análisis de PERMANOVA realizado sobre las variables en la PCoA, cuyo p-valor es mayor a 0.05. Además, se ha realizado un test de beta dispersión por parejas de variables para ver si existe una variabilidad significativa entre ellas, donde el p-valor obtenido ha sido mayor a 0.05 en todas las comparaciones (Figura 39), por lo que no se puede intuir una relación directa entre las variables propuestas y la población bacteriana a nivel de phylum.

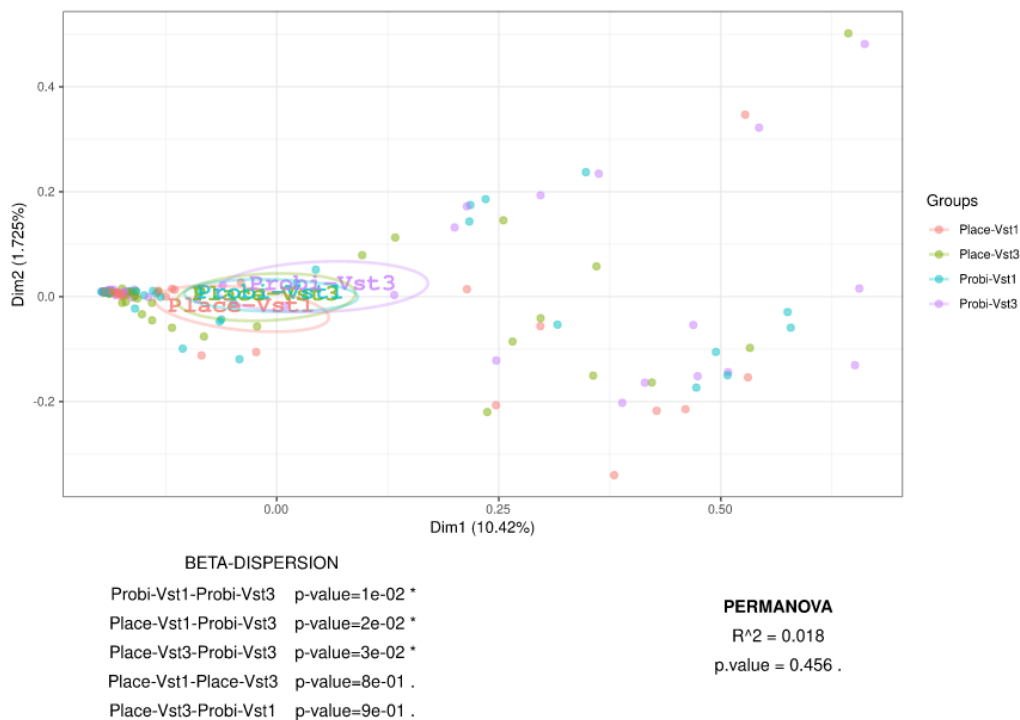


Figura 39. Gráfica de coordenadas principales en las que se muestra las diferencias entre las muestras y si se agrupan correctamente a nivel de phylum. El análisis PERMANOVA no ha detectado significancia estadística en cuanto a la separación entre grupos a nivel de phylum ($p > 0,05$).

5.4.2.3 Resultados del Canonical Correlation Analysis (CCA) a nivel de phylum

El análisis de CCA (Figura 40) corrobora el resultado de la PCoA de que no existe una diferencia real entre la población de las muestras teniendo en cuenta los dos grupos del tratamiento recibido y la visita a nivel de phylum, ya que no logra separar las muestras cuando intenta maximizar la correlación en dichas variables.

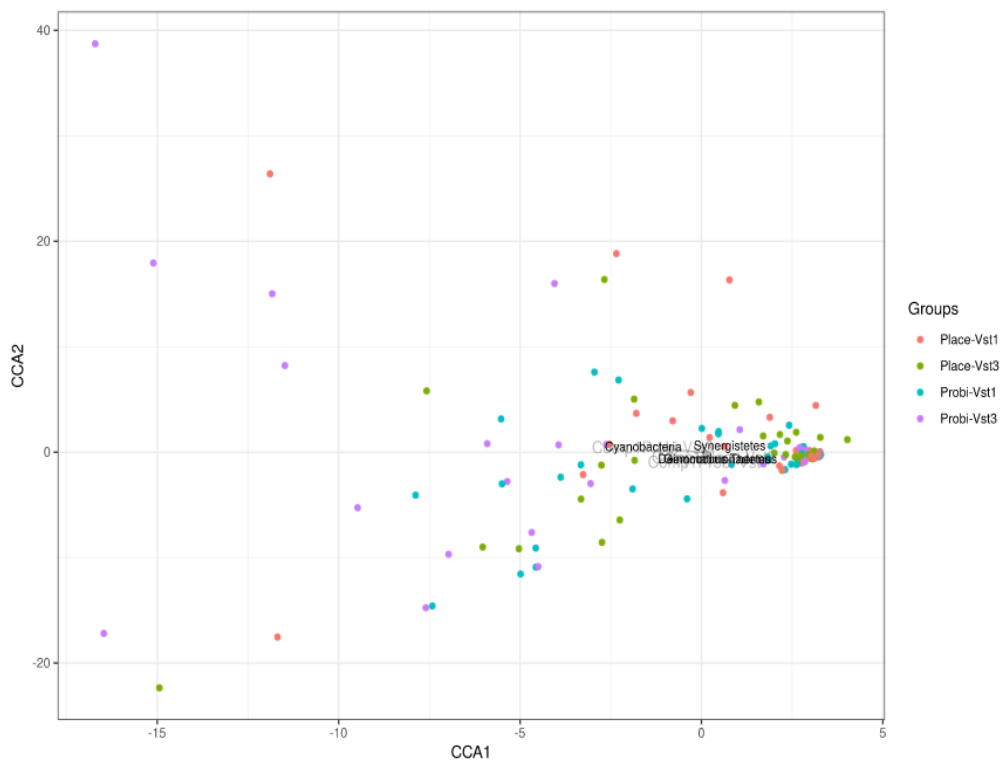


Figura 40. Gráfica que muestra el Canonical Correspondence Analysis a nivel de phylum. En esta gráfica se han maximizado las diferencias entre los grupos para comprobar si alguna combinación de los phylum que existen consigue definir las diferencias entre los grupos propuestos.

5.4.2.4 Resultados del análisis con *DESeq2* a nivel de phylum

A continuación mostramos las gráficas que representan los hallazgos en cuanto a los microorganismos más importantes a nivel de phylum presentes en las muestras. En concreto, las puntuaciones mostradas en las gráficas de la Figura 41 y 42 corresponden a los valores de importancia que se han obtenido tras aplicar el algoritmo de *RandomForest* a las muestras. Tras realizar diversas simulaciones aleatorias, este algoritmo resume los organismos que más veces han aparecido como relevantes a la hora de diferenciar entre visitas y le atribuye un score a cada uno de ellos. Como vemos, el phylum más importante fue *Tenericutes*, seguidos por *Proteobacteria* y *Fusobacteria*, mientras que *Firmicutes* se encuentra ocupando la posición número 13 entre los phylum más importantes.

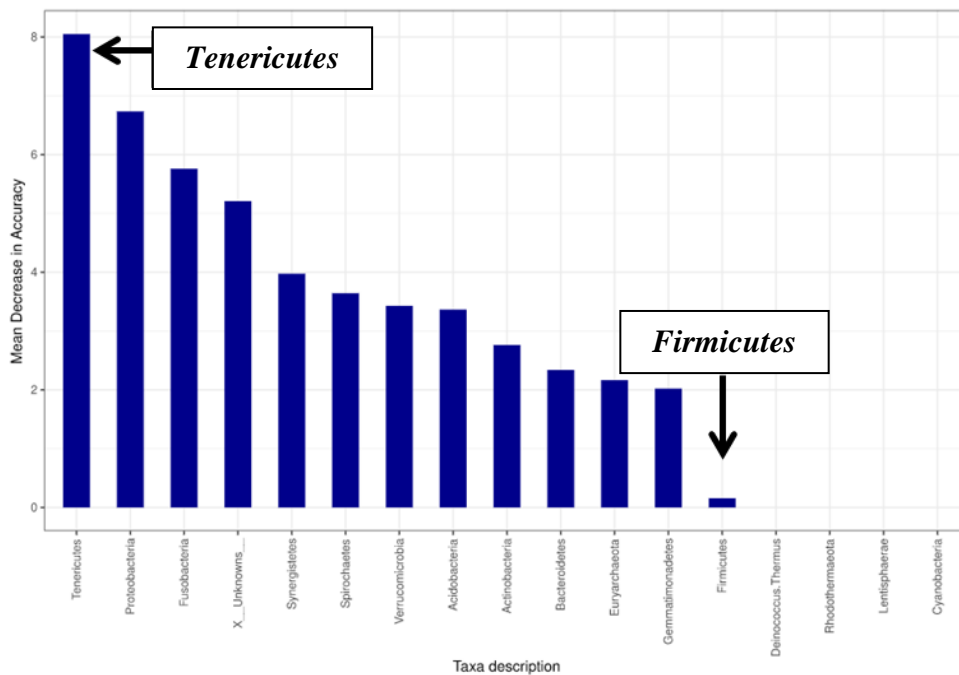


Figura 41. Representación gráfica del valor obtenido mediante *RandomForest* que indica la magnitud de la importancia de cada phylum.

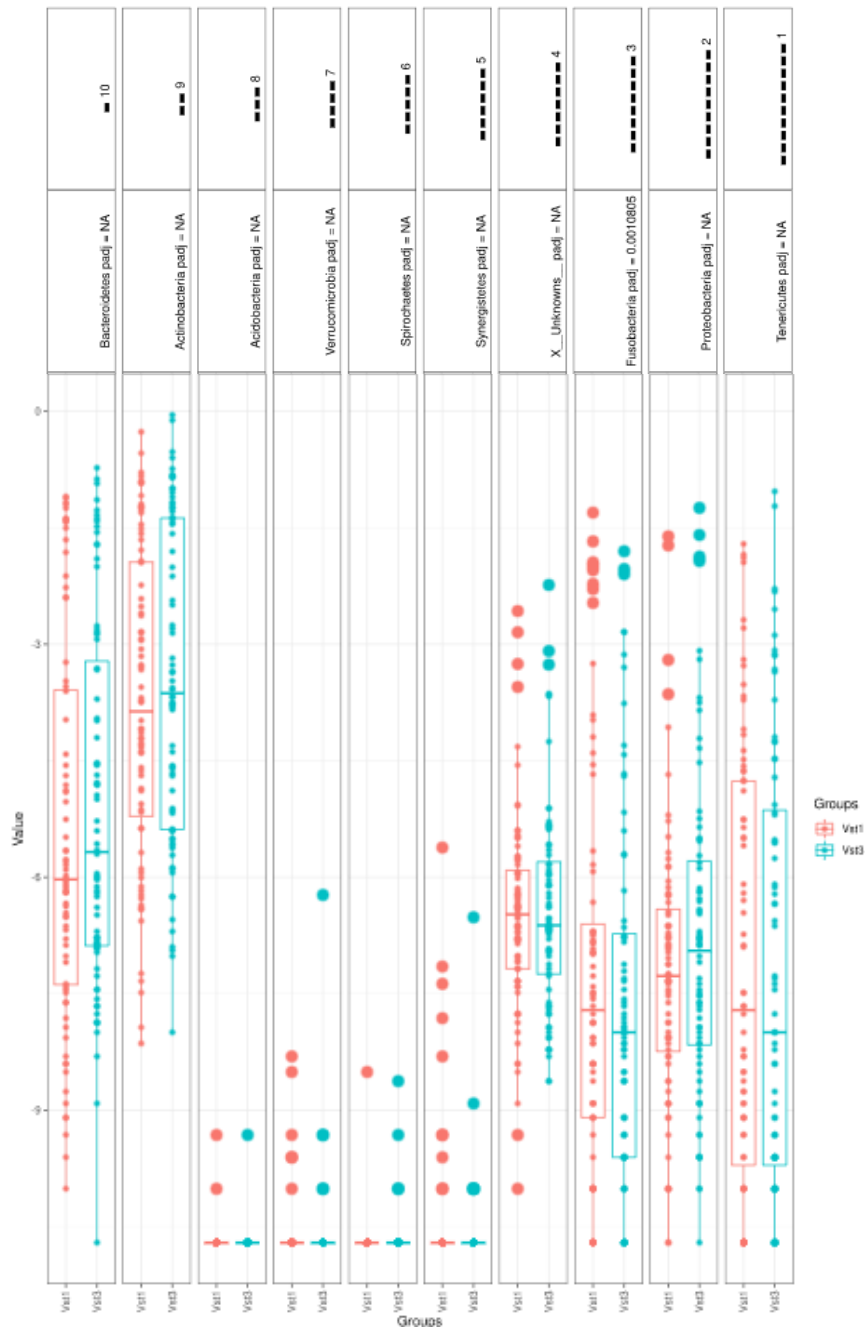


Figura 42. Phylums más importantes encontrados en la comparación. La importancia viene delimitada por el orden de la parte superior de la gráfica (Del 1 al 10, siendo el 1 el más impotante). Aparece un p-valor ajustado de la diferencia entre las poblaciones de cada phylum y un boxplot con la representación.

Las Figura 43 y 44 contienen información complementaria para comprender el significado de los resultados del *DESeq* a nivel de phylum. En ambas figuras se observa que el phylum *Fusobacteria* ha sido el único que ha reducido sus valores de forma significativa. *Firmicutes* también disminuye pero de forma muy discreta. *Proteobacteria* ha sido el phylum que más ha aumentado en comparación con el resto entre ambas visitas aunque sin alcanzar significancia estadística.

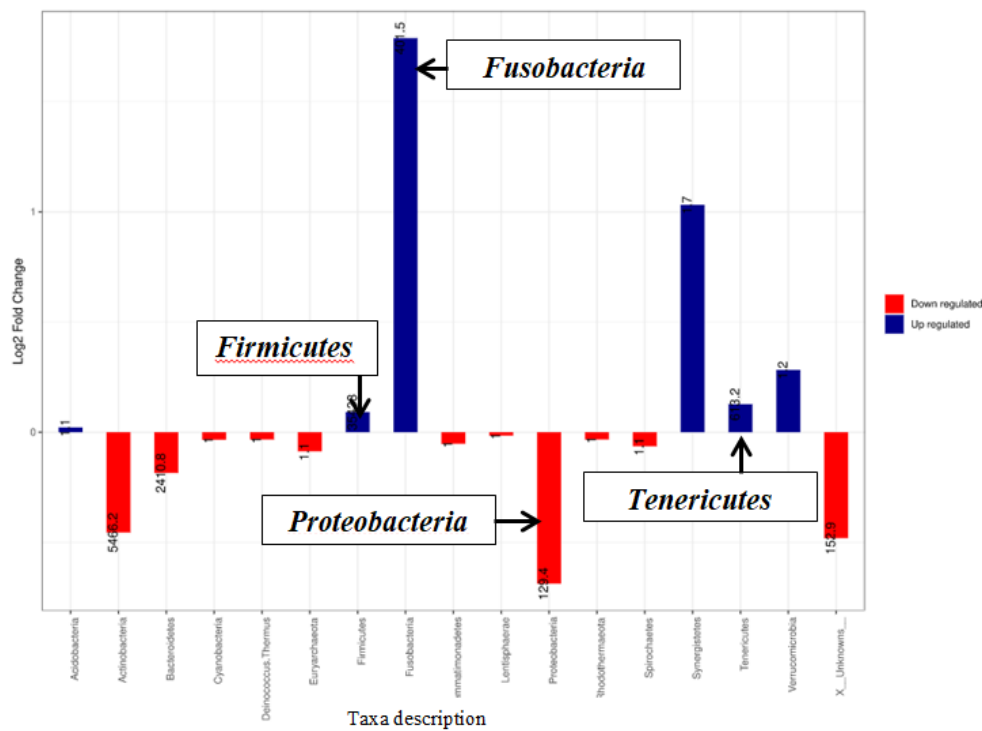


Figura 43. Representación de los valores de *FoldChange* obtenidos al comparar las poblaciones a nivel de phylum. Las barras rojas representan los phylum que han aumentado en la Visita 3 y las azules son las que han disminuido.

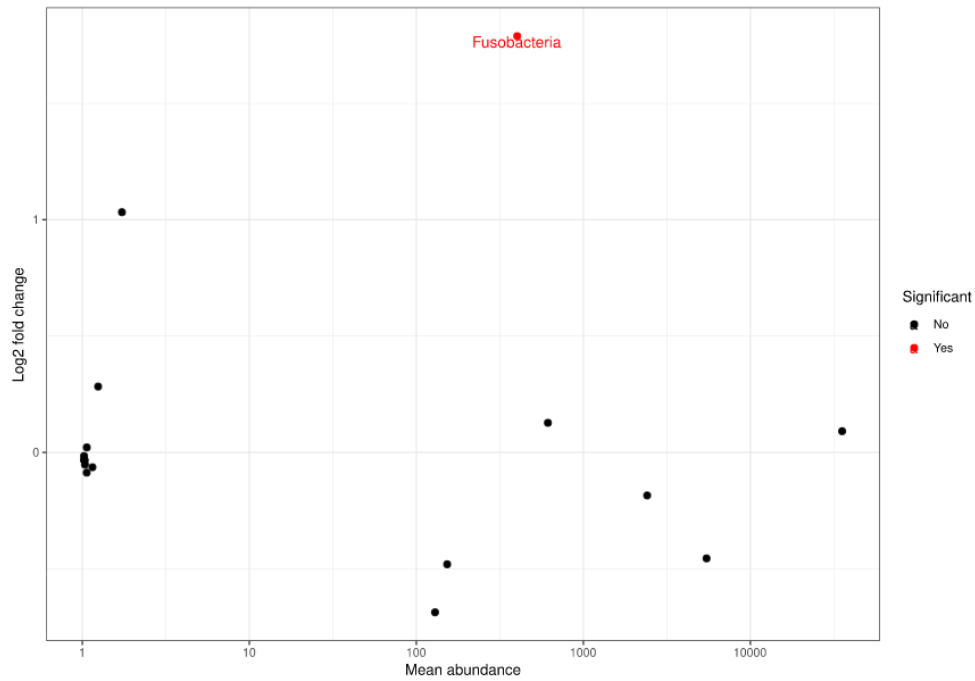


Figura 44. Representación de los valores de *FoldChange* y conteo de secuencias obtenidas al comparar las poblaciones a nivel de phylum. El punto rojo (*Fusobacteria*) indica el único phylum que ha disminuido de forma significativa en la comparación realizada mediante *DESeq*. No se ha observado ningún phylum que aumentara de forma significativa.

5.4.2.5 Heatmap a nivel de phylum

A continuación mostramos el heatmap a nivel de phylum (Figura 45). Destaca el phylum *Firmicutes* como microorganismo mayoritario. Otros phylums relevantes son *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* y *Tenericutes*.

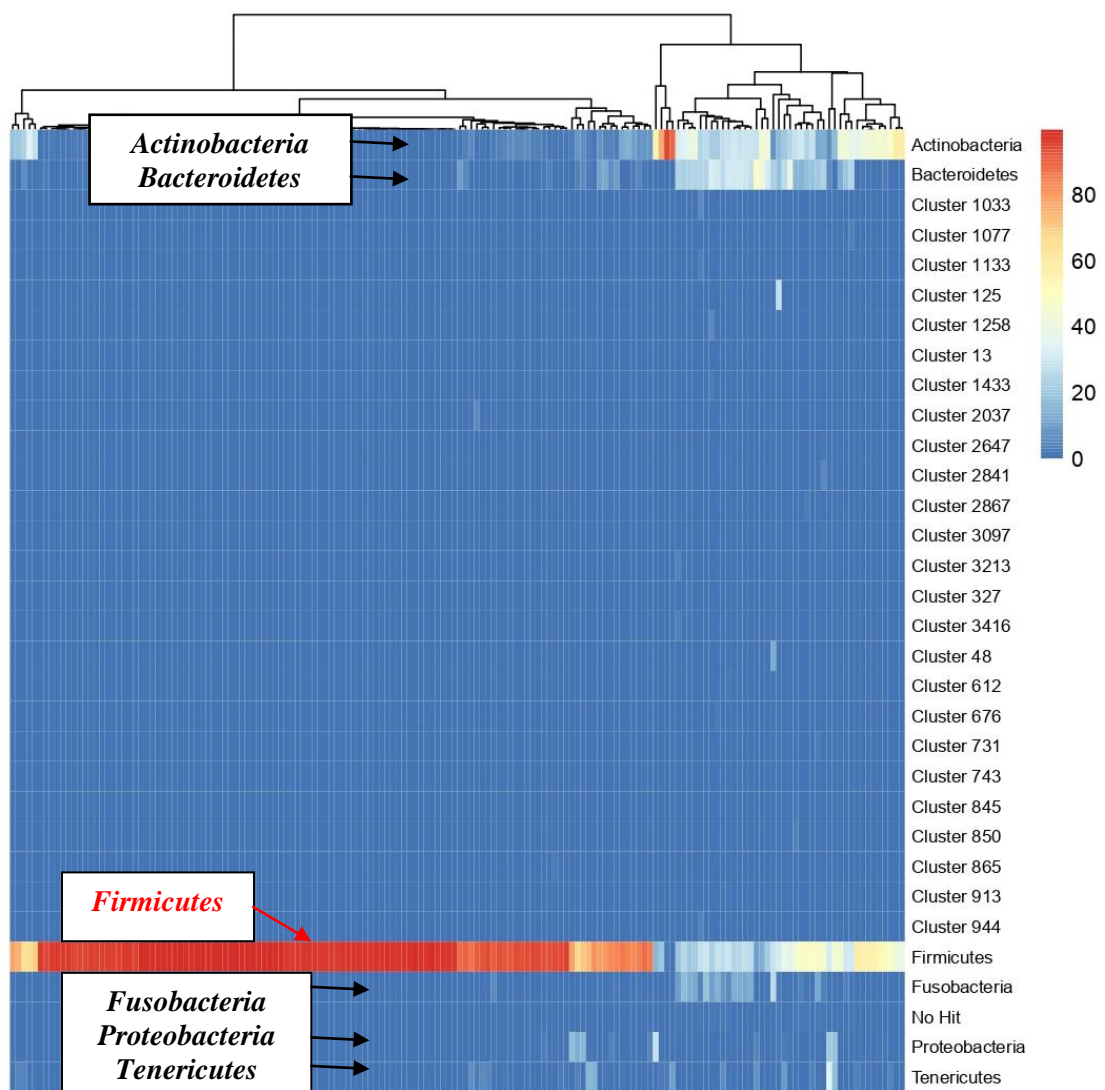


Figura 45. Heatmap a nivel de phylum. Mapa de colores que va desde el rojo (mayor abundancia) al azul (menor abundancia), donde cada muestra es una columna y cada fila una OTU.

5.4.3 Resultados a nivel de familia

5.4.3.1 Pruebas de dispersión a nivel de familia

A nivel de familia no existe una distinción significativa en cuanto a diversidad entre las muestras, tal y como se puede observar en las Figuras 46-48.

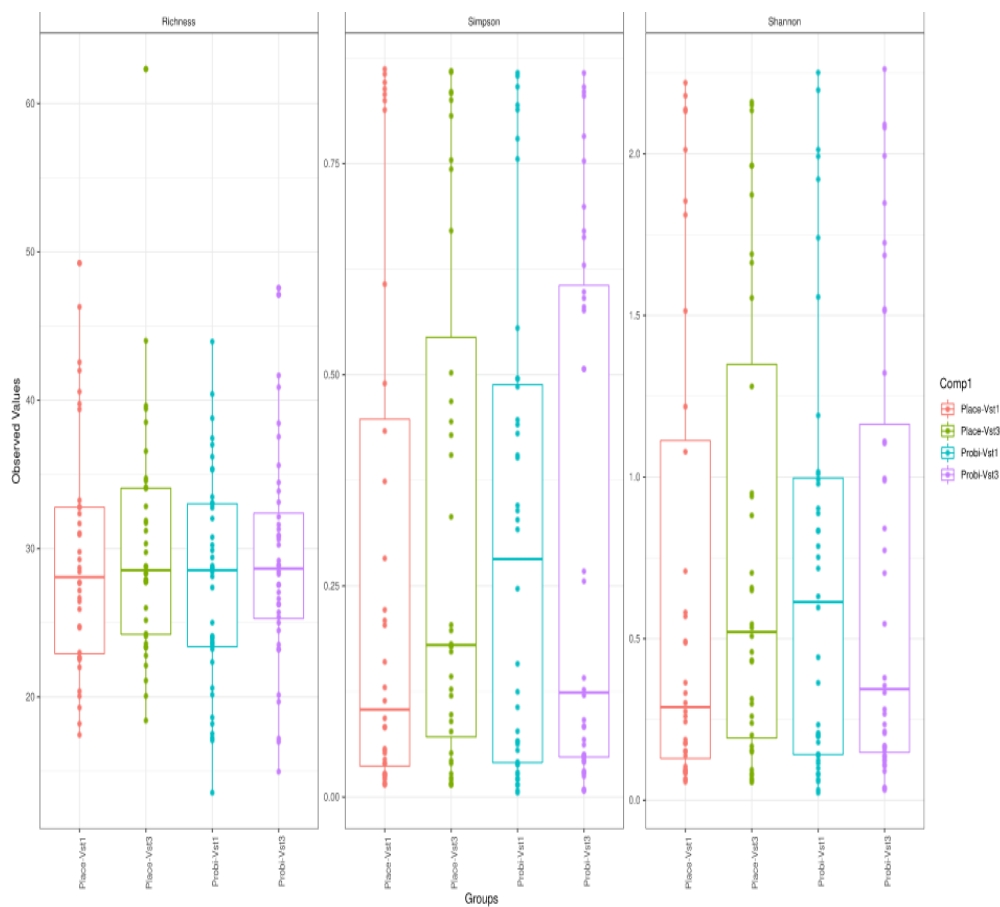


Figura 46. Figuras boxplot que representan la diversidad de las muestras según las variables estudiadas a nivel de familia. Los índices de diversidad mostrados corresponden a la Riqueza de la muestra, *índice de diversidad de Shannon y Simpson*.

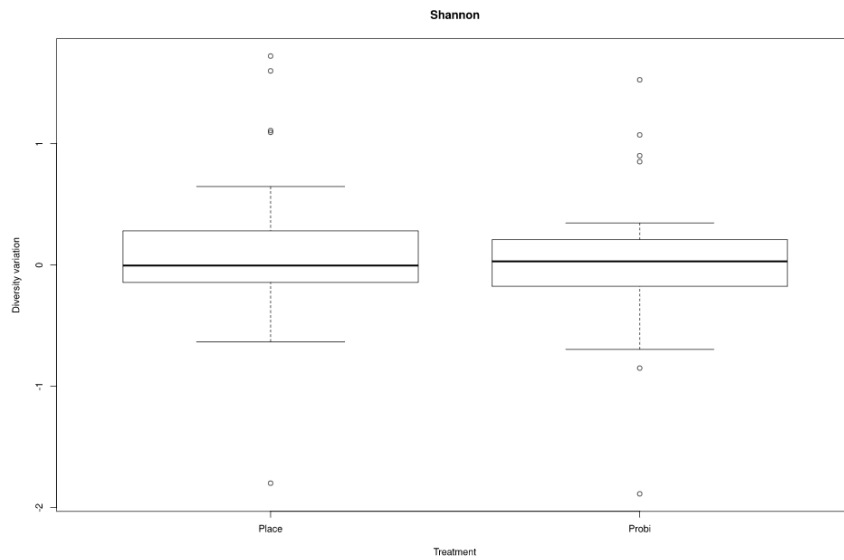


Figura 47. Diagrama de cajas (boxplot) del resultado de la aplicación del *índice de Shannon* en ambos grupos de tratamiento a nivel de familia. Observamos que no existen diferencias significativas en cuanto a la diversidad de las muestras.

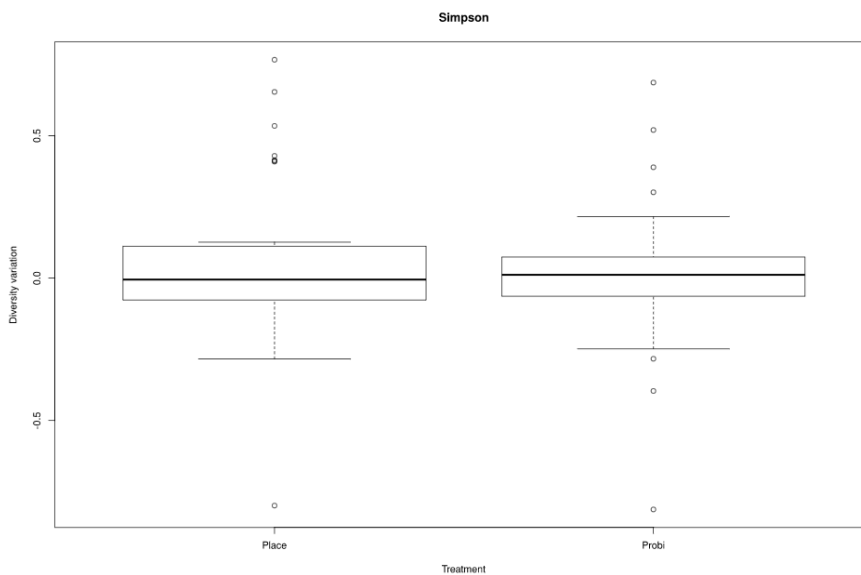


Figura 48. Diagrama de cajas (boxplot) del resultado de la aplicación del *índice de Simpson* en ambos grupos de tratamiento a nivel de familia. Observamos que no existen diferencias significativas en cuanto a la diversidad de las muestras.

Además, hemos realizado el test denominado *Local Contribution to Beta Diversity* (Figura 49) en el que se puede comprobar que no hay ninguna muestra que destaque sobre todas las demás, tanto en el caso del estudio a nivel de familia como en el estudio al resto de niveles taxonómicos, lo que indica que la contribución de todas las muestras a la diversidad es relativamente homogénea. Esto sirve para confirmar la ausencia de posibles outliers o valores atípicos que puedan alterar el resultado.

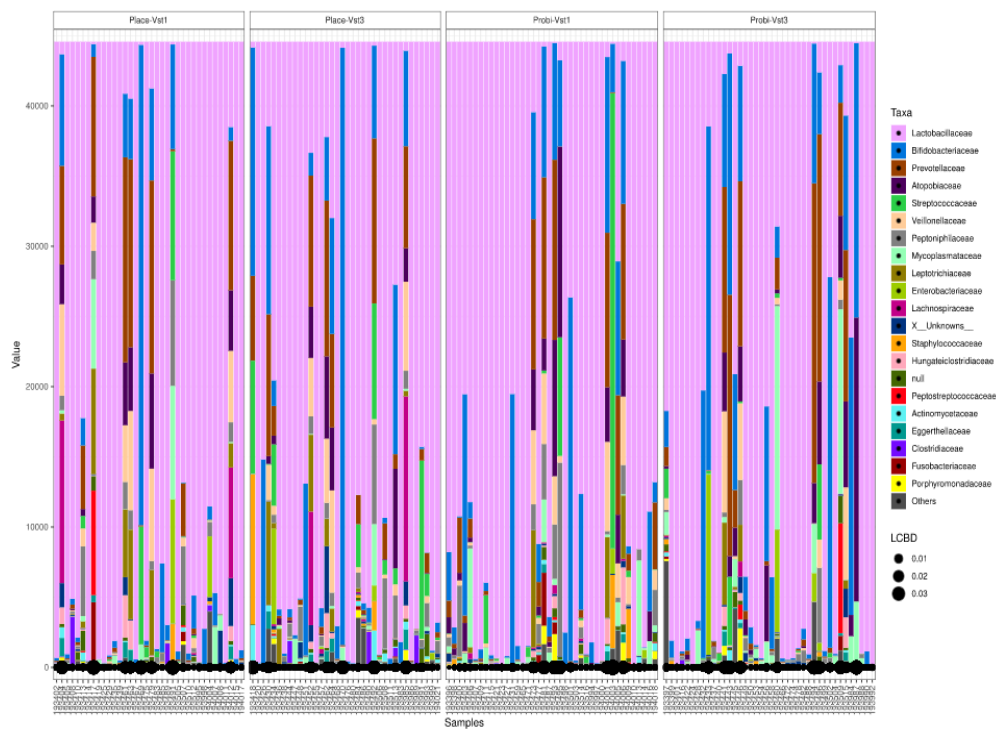


Figura 49. Gráfica de barras acumulativas comparando las familias detectadas en las muestras con los perfiles de bacterias basadas en el 16S rARN en ambos grupos de tratamiento en Visita 1 y 3.

5.4.3.2 Resultado del Análisis Principal de Componentes (PCoA) a nivel de familia.

Al realizar una gráfica PCoA (Figura 50) se puede observar como no existe una tendencia a diferenciar las muestras entre las variables, teniendo en cuenta el nivel de familia. Esto se puede comprobar por el análisis de PERMANOVA realizado sobre las variables en la PCoA, cuyo p-valor es mayor a 0.05. Además, se ha realizado un test de beta dispersión por parejas de variables para ver si existe una variabilidad significativa entre ellas, donde el p-valor obtenido ha sido mayor a 0.05 en todas las comparaciones (Figura 50), por lo que no se puede intuir una relación directa entre las variables propuestas y la población bacteriana a nivel de familia.

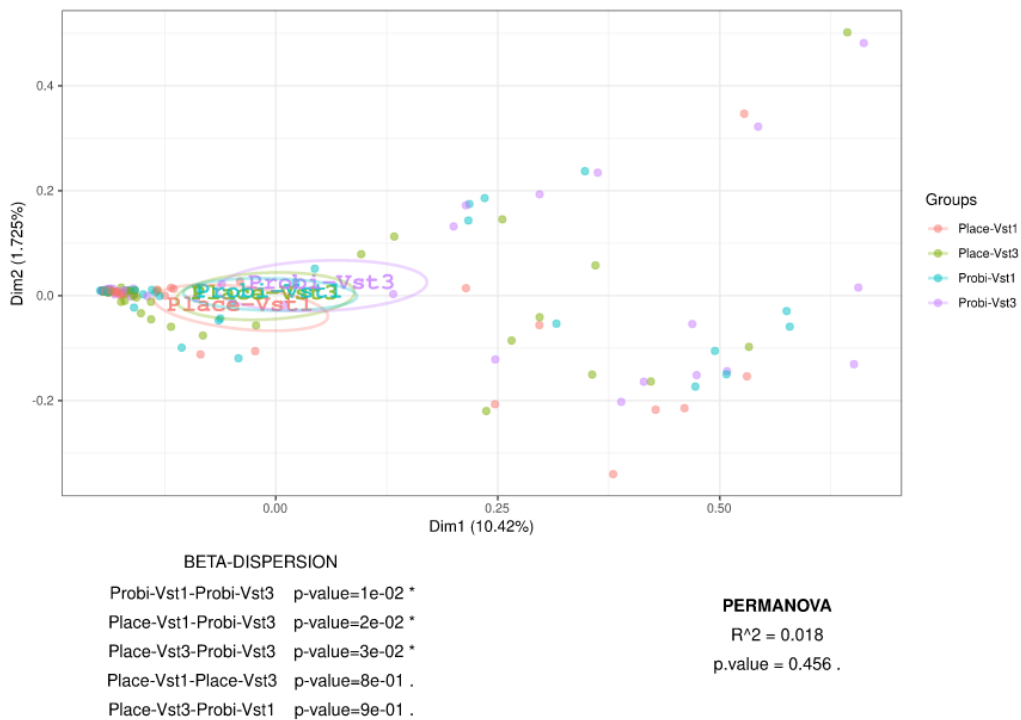


Figura 50. Gráfica de coordenadas principales en las que se muestra las diferencias entre las muestras y si se agrupan correctamente a nivel de familia. El análisis PERMANOVA no ha detectado significancia estadística en cuanto a la separación entre grupos a nivel de familia ($p > 0,05$).

5.4.3.3 Resultados del Canonical Correlation Analysis (CCA) a nivel de familia

El análisis de CCA (Figura 51) corrobora el resultado de la PCoA de que no existe una diferencia real entre la población de las muestras teniendo en cuenta los dos grupos del tratamiento recibido y la visita a nivel de familia, ya que no logra separar con bastante precisión las muestras cuando intenta maximizar la correlación en dicha variable.

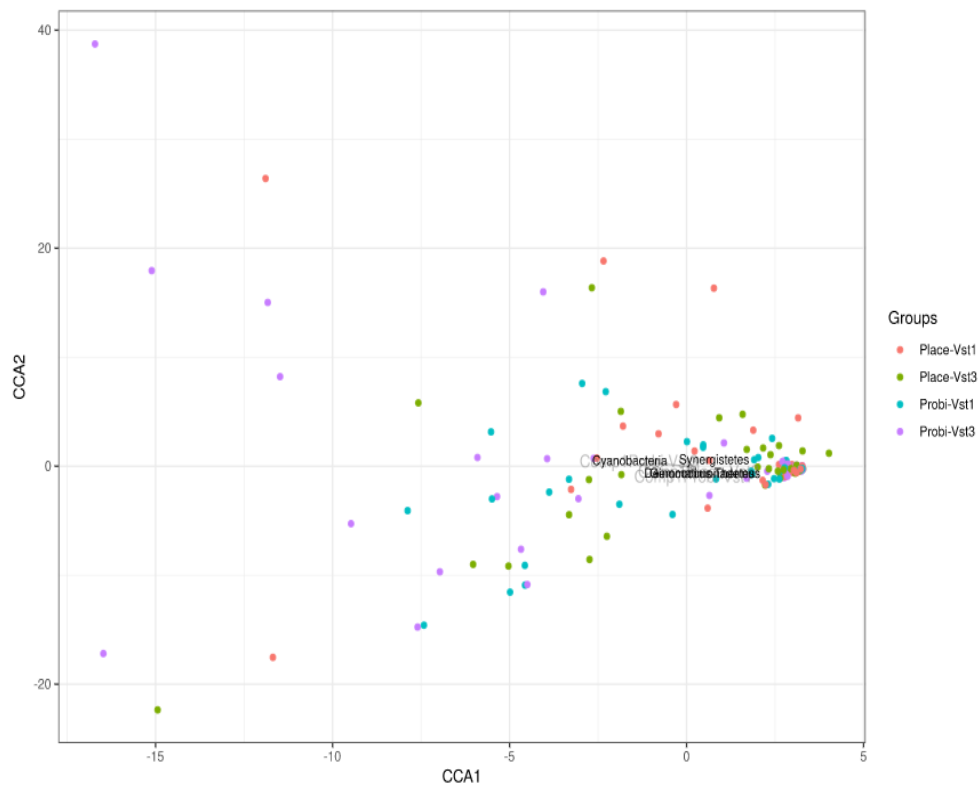


Figura 51. Gráfica que muestra el Canonical Correspondence Analysis a nivel de familia. En esta gráfica se han maximizado las diferencias entre los grupos para comprobar si alguna combinación de las familias que existen consigue definir las diferencias entre los grupos propuestos.

5.4.3.4 Resultados del análisis con *DESeq2* a nivel de familia

A continuación mostramos las gráficas que representan los hallazgos en cuanto a los microorganismos más importantes a nivel de familia presentes en las muestras. En concreto, las puntuaciones mostradas en las gráficas de la Figura 52 y 53 corresponden a los valores de importancia que se han obtenido tras aplicar el algoritmo de *RandomForest* a las muestras. Tras realizar diversas simulaciones aleatorias, este algoritmo resume los organismos que más veces han aparecido como relevantes en la comparación entre Visitas 1 y 3, y le atribuye un score a cada uno de ellos. Como vemos, la familia más importante con diferencia fue *Microbacteriaceae*, existiendo poca diferencia entre el resto de las familias, incluyendo los *Lactobacillaceae* que ocupan la posición número 8 entre las familias más importantes.

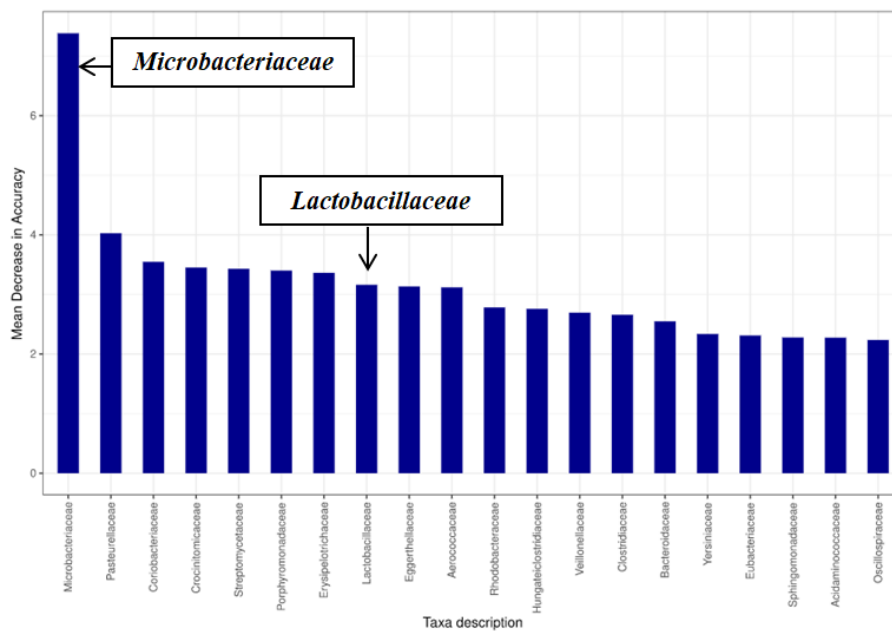


Figura 52. Representación gráfica del valor obtenido mediante *RandomForest* que indica la magnitud de la importancia de cada familia.

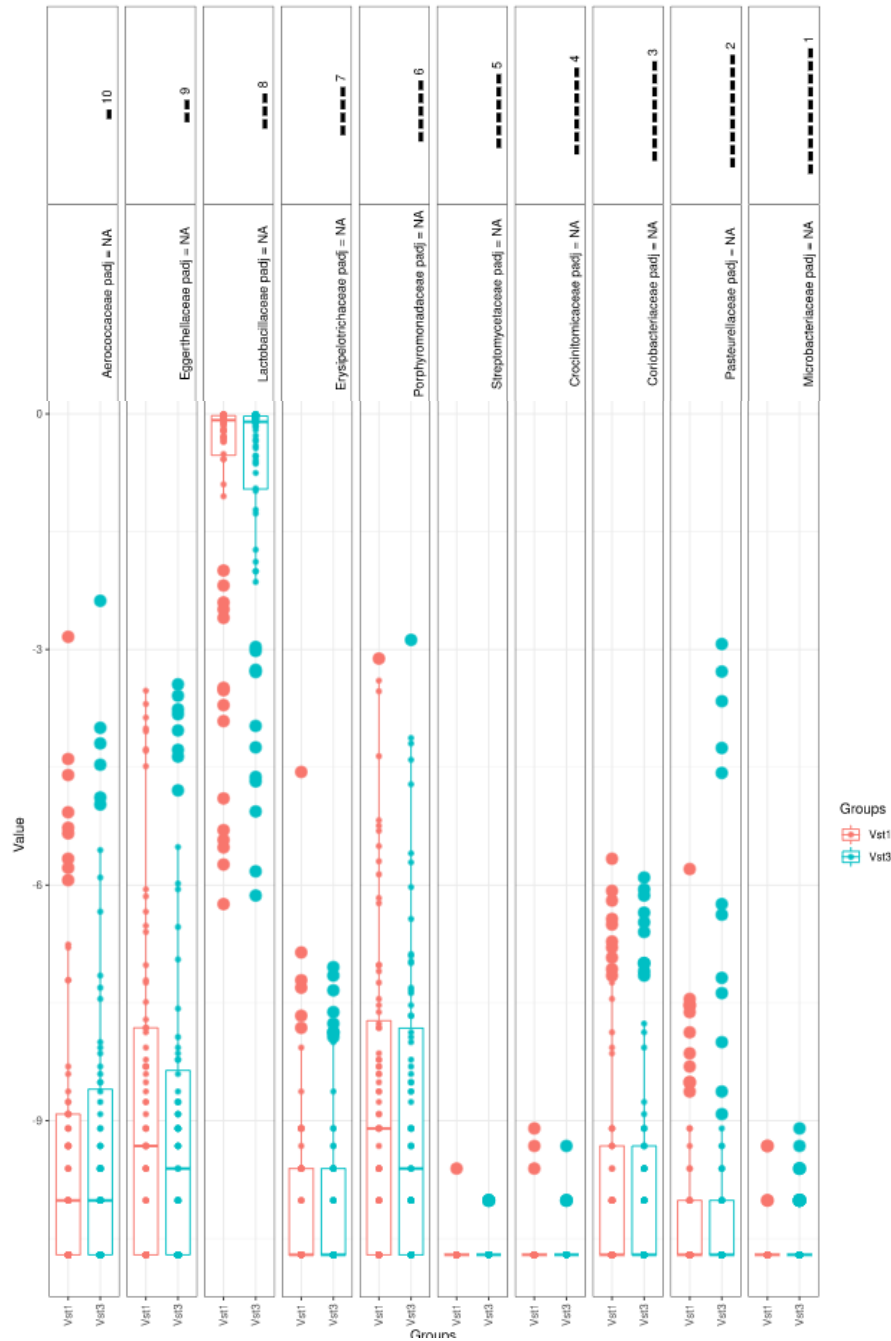


Figura 53. Familias más importantes encontradas en la comparación. La importancia viene delimitada por el orden de la parte superior de la gráfica (Del 1 al 10, siendo la 1 la más importante). Aparece un p-valor ajustado de la diferencia entre las poblaciones de cada familia y un boxplot con la representación.

Las Figura 54 y 55 contienen información complementaria para comprender el significado de los resultados del DESeq. Ambas reflejan un descenso en la familia *Fusobacteriaceae* de forma estadísticamente significativa. La familia *Lactobacillaceae* también se observó a la baja pero de manera muy discreta. Por otro lado, la familia *Enterobacteriaceae* aumentó de forma estadísticamente significativa.

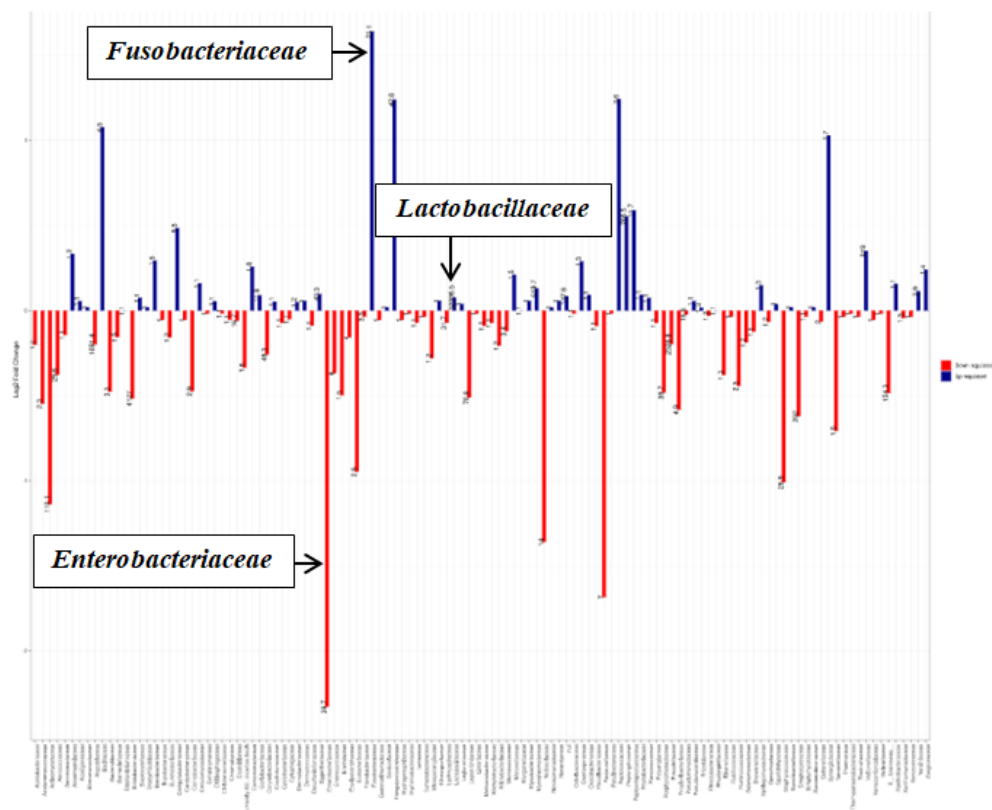


Figura 54. Representación de los valores de *FoldChange* obtenidos al comparar las poblaciones a nivel de familia. Las barras rojas representan las familias que han aumentado en la Visita 3 y las azules son las que han disminuido.

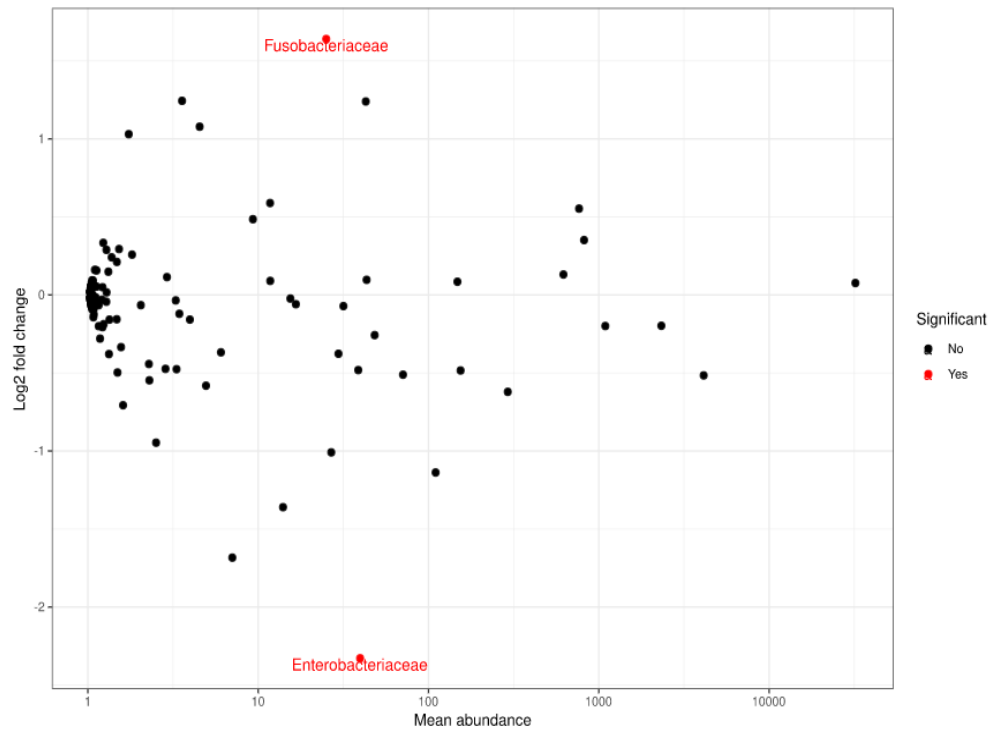


Figura 55. Representación de los valores de *FoldChange* y conteo de secuencias obtenidas al comparar las poblaciones a nivel de familia. Los puntos rojos indican las familias que han aumentado (extremo inferior de la gráfica) o disminuido (extremo superior de la gráfica) de forma significativa en la Visita 3 en la comparación realizada mediante *DESeq*.

5.4.3.5 Heatmap a nivel de familia

A continuación mostramos el heatmap a nivel de familia (Figura 56). Destaca la familia *Lactobacillaceae* como microorganismo mayoritario. Otros géneros relevantes son *Bifidobacteriaceae*, *Prevotellaceae* y *Atopobiaceae*.

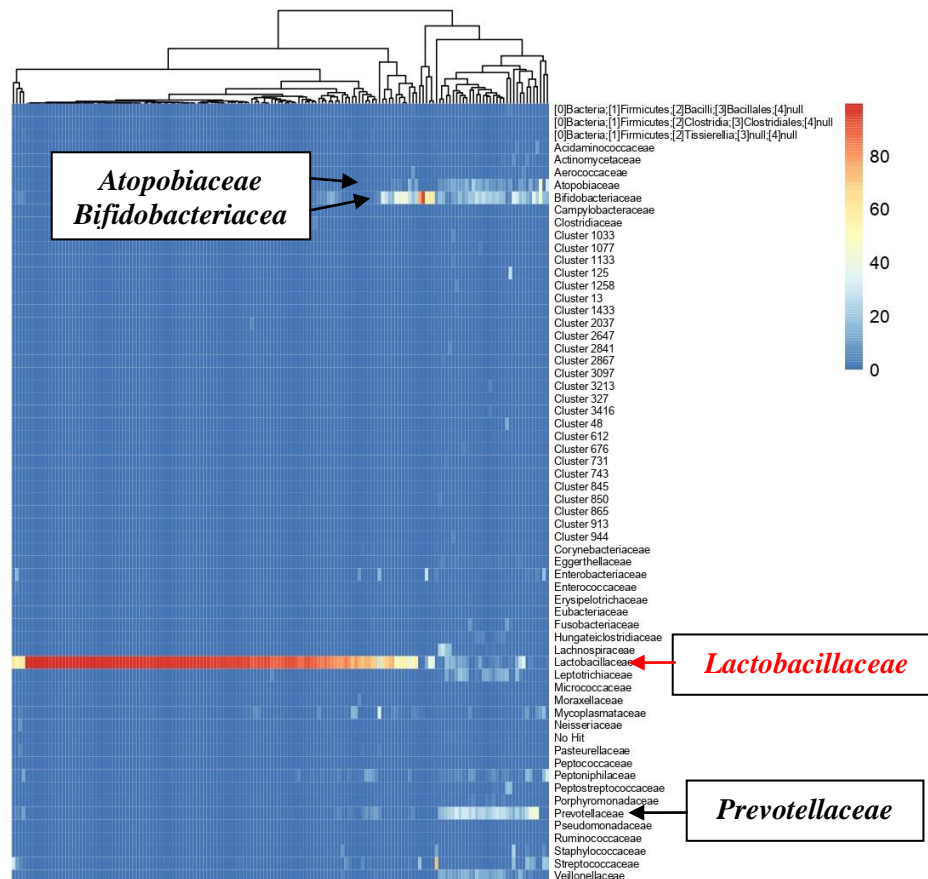


Figura 56. Heatmap a nivel de familia. Mapa de colores que va desde el rojo (mayor abundancia) al azul (menor abundancia), donde cada muestra es una columna y cada fila una OTU.

5.4.4 Resultados a nivel de especie

5.4.4.1 Pruebas de dispersión a nivel de especie

A nivel de especie no existe una distinción significativa en cuanto a diversidad entre las muestras, tal y como se puede observar en las Figuras 57-59.

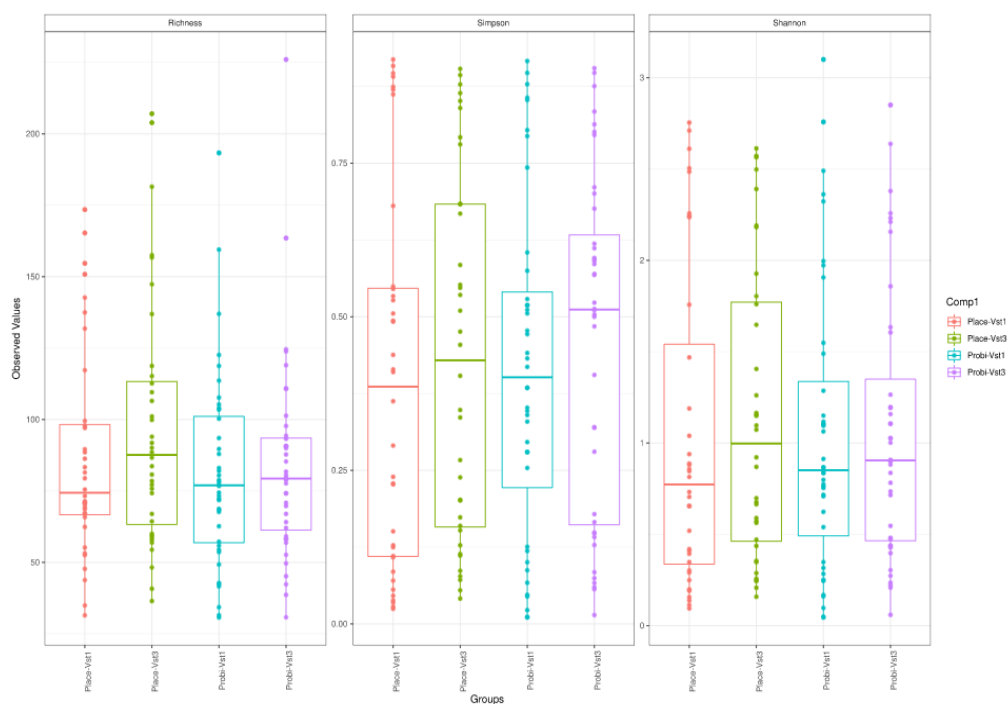


Figura 57. Figuras boxplot que representan la diversidad de las muestras según las variables estudiadas a nivel de especie. Los índices de diversidad mostrados corresponden a la Riqueza de la muestra, *índice de diversidad de Shannon* y *Simpson*.

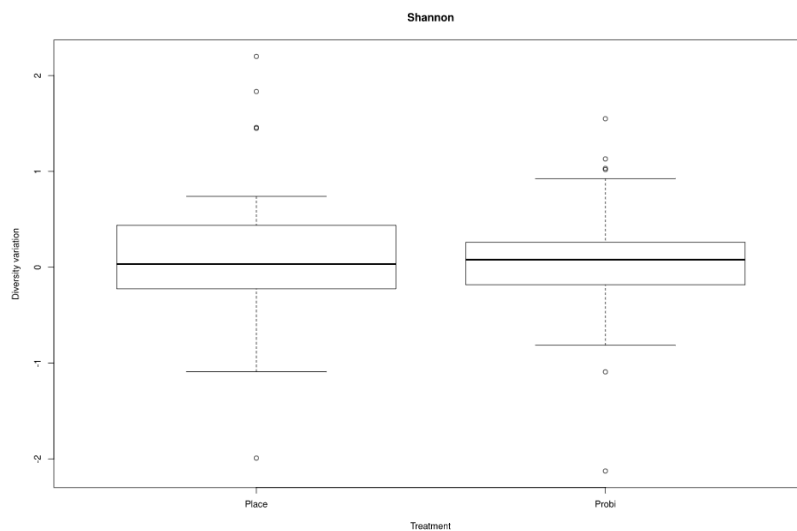


Figura 58. Diagrama de cajas (boxplot) del resultado de la aplicación del *índice de Shannon* en ambos grupos de tratamiento a nivel de especie. Observamos que no existen diferencias significativas en cuanto a la diversidad de las muestras.

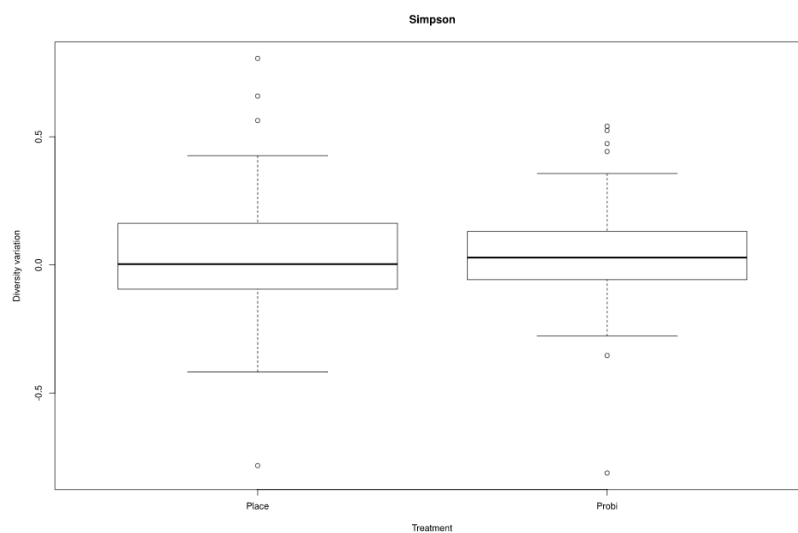


Figura 59. Diagrama de cajas (boxplot) del resultado de la aplicación del *índice de Simpson* en ambos grupos de tratamiento a nivel de especie. Observamos que no existen diferencias significativas en cuanto a la diversidad de las muestras.

Además, hemos realizado el test denominado *Local Contribution to Beta Diversity* (Figura 60) en el que se puede comprobar que no hay ninguna muestra que destaque sobre todas las demás, a nivel de especie como en el estudio al resto de niveles taxonómicos, lo que indica que la contribución de todas las muestras a la diversidad es relativamente homogénea. Esto sirve para confirmar la ausencia de posibles outliers o valores atípicos que puedan alterar el resultado.

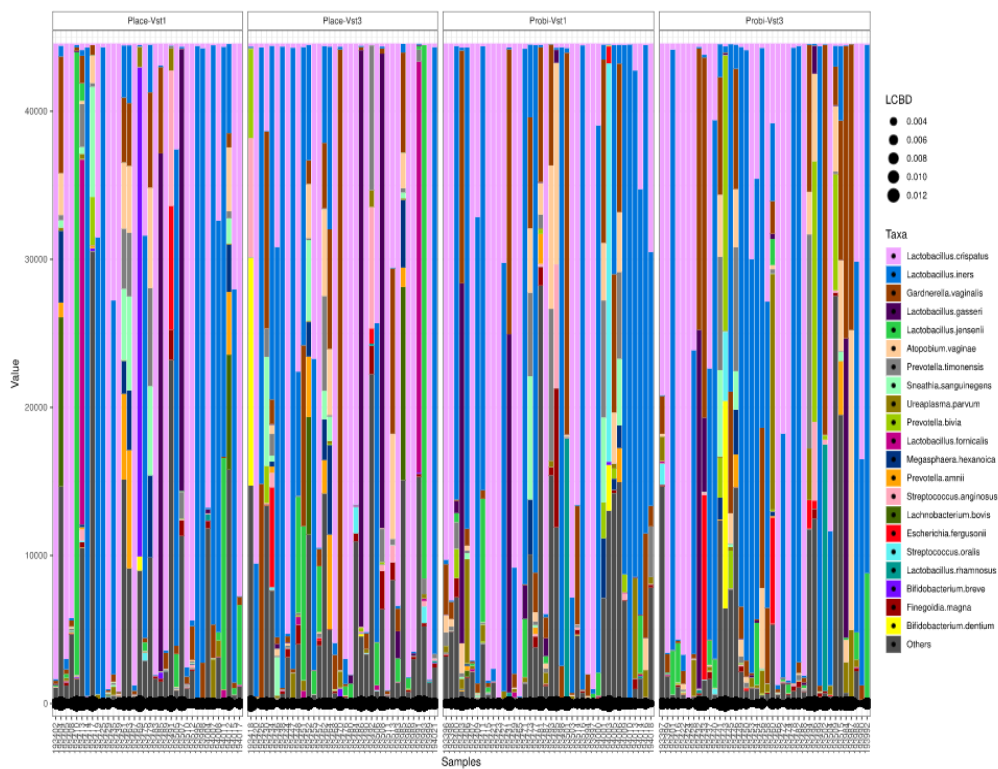


Figura 60. Gráfica de barras acumulativas comparando las especies detectadas en las muestras con los perfiles de bacterias basadas en el 16S rARN.

5.4.4.2 Resultado del Análisis Principal de Componentes (PCoA) a nivel de especie.

Al realizar una gráfica PCoA (Figura 61) se puede observar como no existe una tendencia a diferenciar las muestras entre las variables, teniendo en cuenta el nivel de especie. Esto se puede comprobar por el análisis de PERMANOVA realizado sobre las variables en la PCoA, cuyo p-valor es mayor a 0.05. Además, se ha realizado un test de beta dispersión por parejas de variables para ver si existe una variabilidad significativa entre ellas, donde el p-valor obtenido ha sido mayor a 0.05 en todas las comparaciones (Figura 61), por lo que no se puede intuir una relación directa entre las variables propuestas y la población bacteriana a nivel de especie.

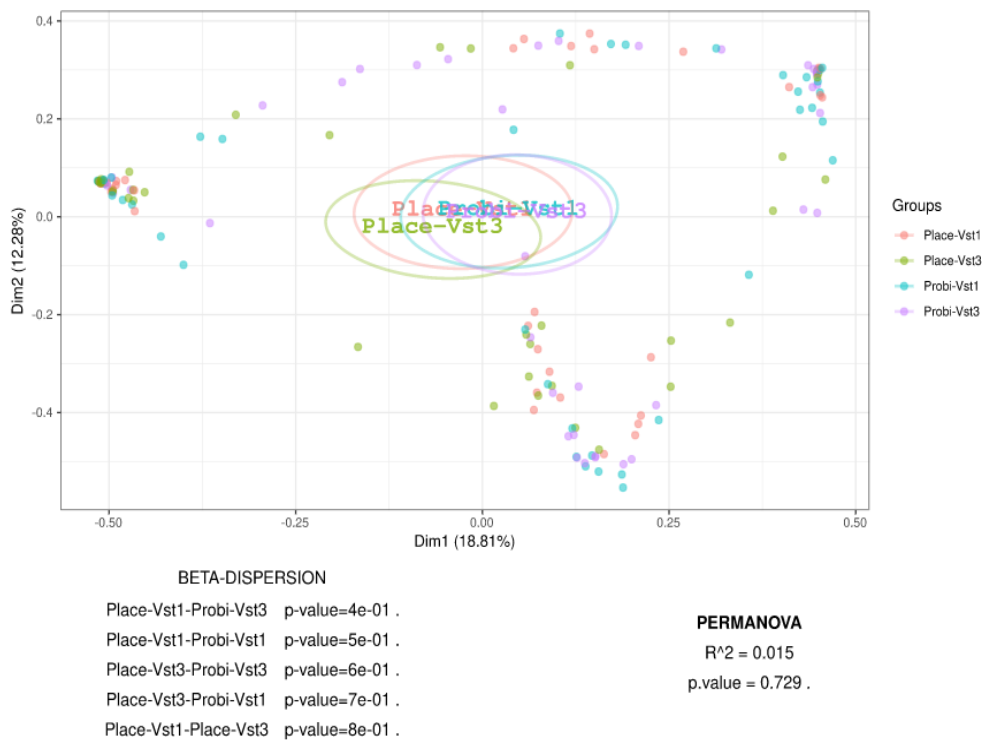


Figura 61. Gráfica de coordenadas principales en las que se muestra las diferencias entre las muestras y si se agrupan correctamente a nivel de especie. El análisis PERMANOVA no ha detectado significancia estadística en cuanto a la separación entre grupos a nivel de especie ($p > 0,05$).

5.4.4.3 Resultados del Canonical Correlation Analysis (CCA) a nivel de especie

El análisis de CCA (Figura 62) logra diferenciar las muestras según los grupos de tratamiento y la visita a nivel de especie, ya que consigue separar con bastante precisión las muestras cuando intenta maximizar la correlación en dichas variables



Figura 62. Gráfica que muestra el Canonical Correspondence Analysis a nivel de especie. En esta gráfica se han maximizado las diferencias entre los grupos para comprobar si alguna combinación de las especies que existen consigue definir las diferencias entre los grupos propuestos.

5.4.4.4 Resultados del análisis con *DESeq2* a nivel de especie

A continuación mostramos las gráficas que representan los hallazgos en cuanto a los microorganismos más importantes a nivel de especie presentes en las muestras. En concreto, las puntuaciones mostradas en las gráficas de la Figura 63 y 64 corresponden a los valores de importancia que se han obtenido tras aplicar el algoritmo de *RandomForest* a las muestras. Tras realizar diversas simulaciones aleatorias, este algoritmo resume los organismos que más veces han aparecido como relevantes en la comparación entre visitas, y le atribuye un score a cada uno de ellos. Como vemos, la especie más importante fue *Prevotella bivia* seguido de forma estrecha por *P. disiens*, existiendo poca diferencia entre el resto de especies. Las especies *Bifidobacterium dentium* y *Lactobacillus psittaci* no destacan entre el resto de especies.

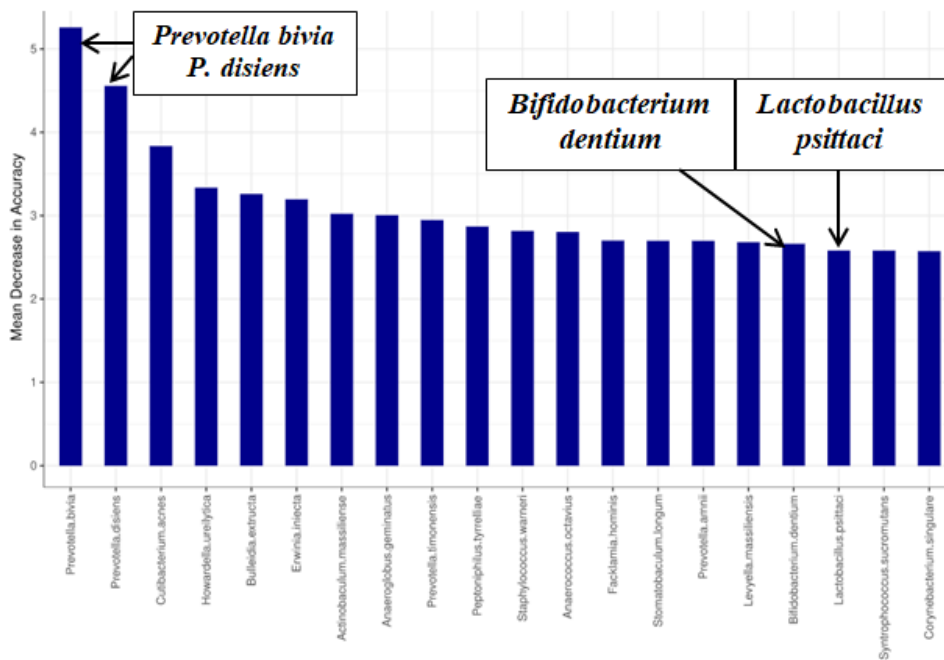


Figura 63. Representación gráfica del valor obtenido mediante *RandomForest* que indica la magnitud de la importancia de cada especie.

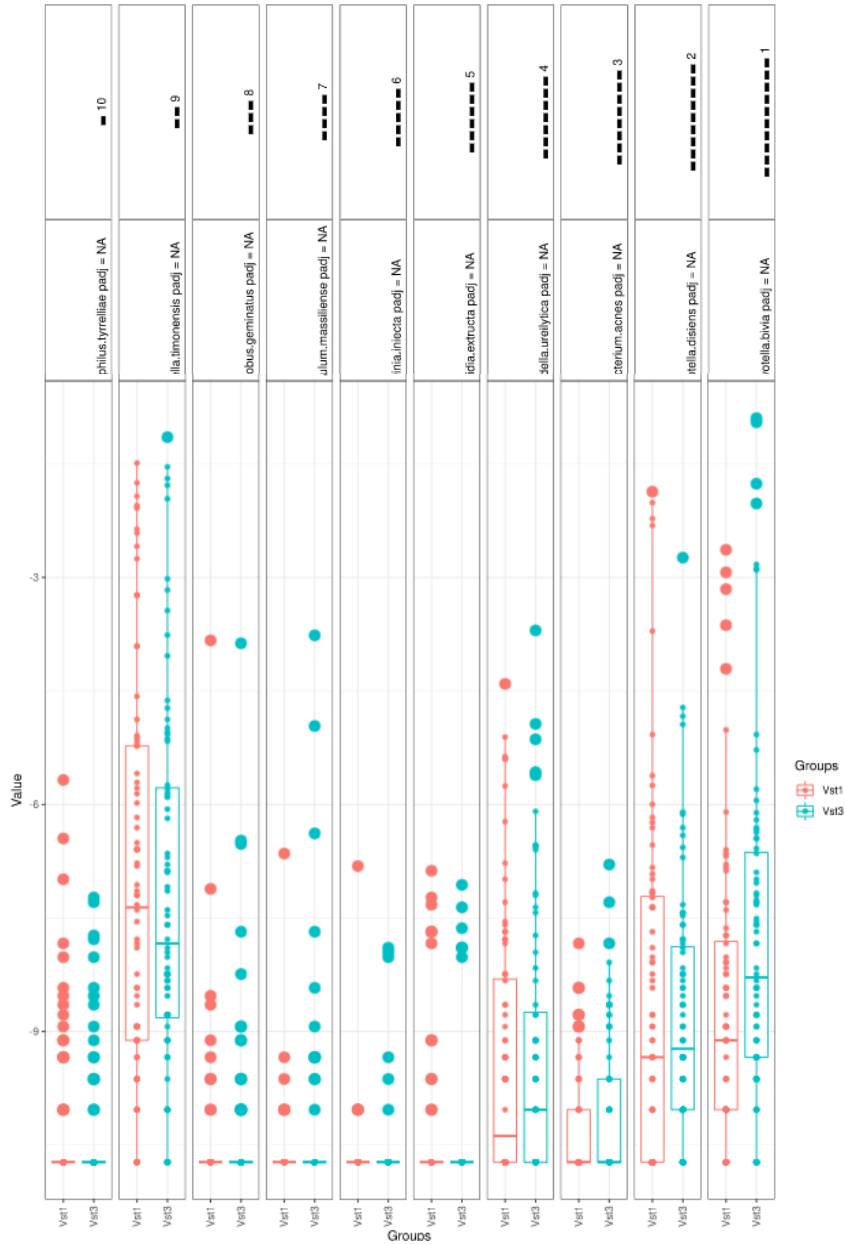


Figura 64. Especies más importantes encontradas en la comparación. La importancia viene delimitada por el orden de la parte superior de la gráfica (Del 1 al 10, siendo la 1 la más importante). Aparece un p-valor ajustado de la diferencia entre las poblaciones de cada especie y un boxplot con la representación.

Las Figura 65 y 66 contienen información complementaria para comprender el significado de los resultados del *DESeq*. Ambas reflejan un descenso en la especie *Parvimonas micra* de forma estadísticamente significativa y por encima del resto de microorganismos, seguido por *Peptoniphilus lacrimalis*, *Peptoniphilus coxis* y *Mageeibacillus indolicus*. Por otro lado, se observó un aumento más pronunciado de *Escherichia fergusonii*, seguido de *Prevotella bivia*, *Actinomyces neuii*, *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus psittaci*, todas ellas de forma estadísticamente significativa. El probiótico *Lactobacillus rhamnosus* no presentó cambios significativos en la comparativa con un p-valor ajustado de 0,48.

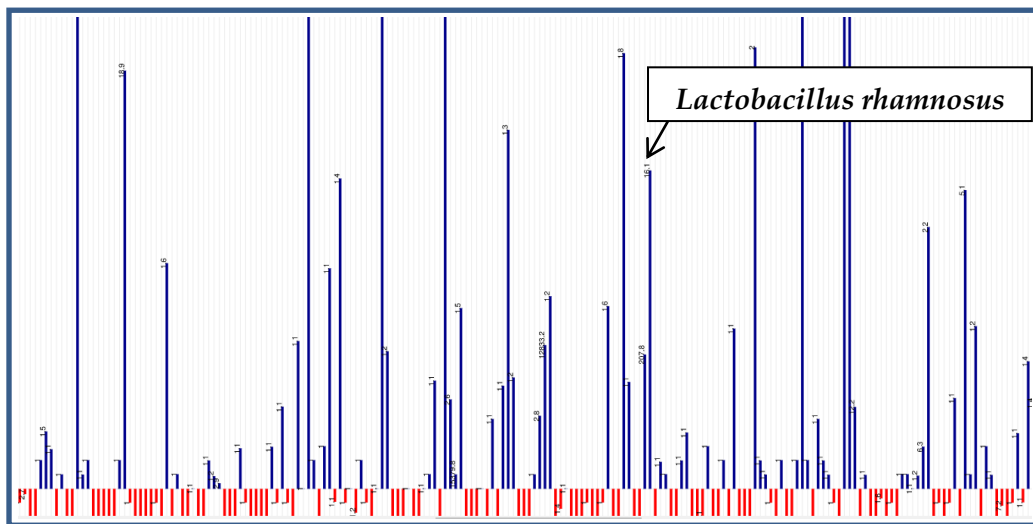


Figura 65. Representación de los valores de *FoldChange* obtenidos al comparar las poblaciones a nivel de especie. Solo se muestra una fracción de la gráfica ya que debido a sus dimensiones no es posible mostrarla íntegramente. Las barras rojas representan las especies que han aumentado en la Visita 3 y las azules son las que han disminuido. Se observa un descenso aunque no significativo de *Lactobacillus rhamnosus*.

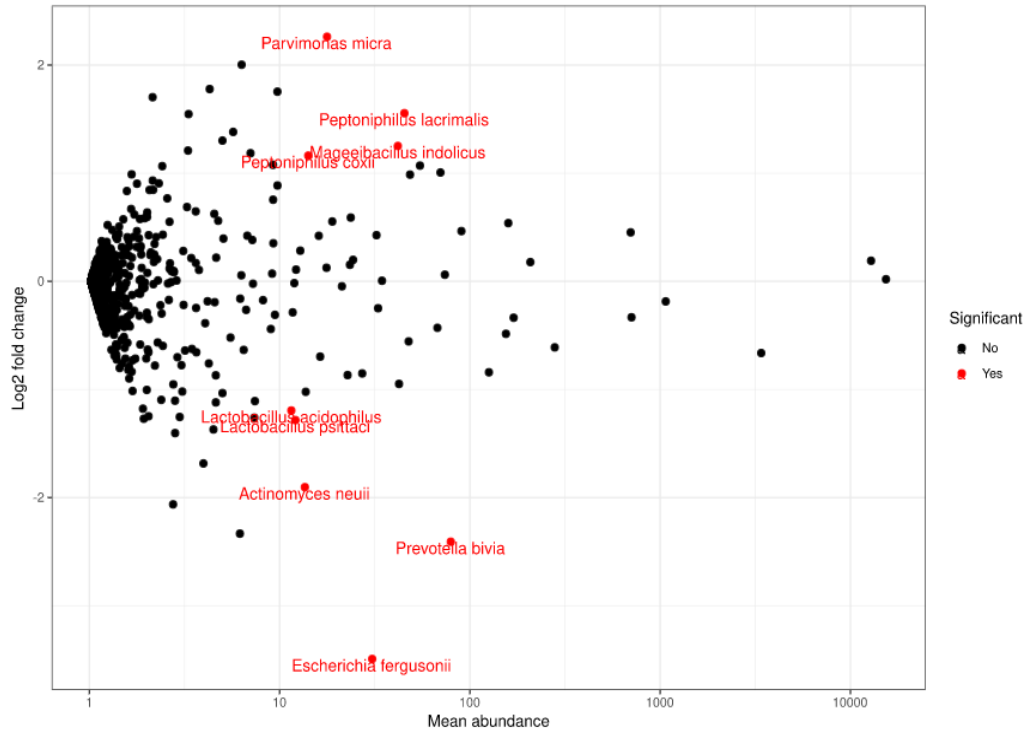


Figura 66. Representación de los valores de *FoldChange* y conteo de secuencias obtenidos al comparar las poblaciones a nivel de especie. Los puntos rojos indican las especies que han aumentado (extremo inferior de la gráfica) o disminuido (extremo superior de la gráfica) de forma significativa en la Visita 3 en la comparación realizada mediante *DESeq*.

5.4.4.5 Heatmap a nivel de especie

A continuación mostramos el heatmap a nivel de especie (Figura 67). Destacan las especies *Lactobacillus crispatus* y *L. iners* como microorganismos mayoritarios. Existe presencia de *L. jensenii* y *gasseri* pero de forma más reducida. Otras especies relevantes son *Atopobium vaginae*, *Gardenerella vaginalis*, *Prevotella amni* entre otras de su especie y *Sneathia sanguinens*.

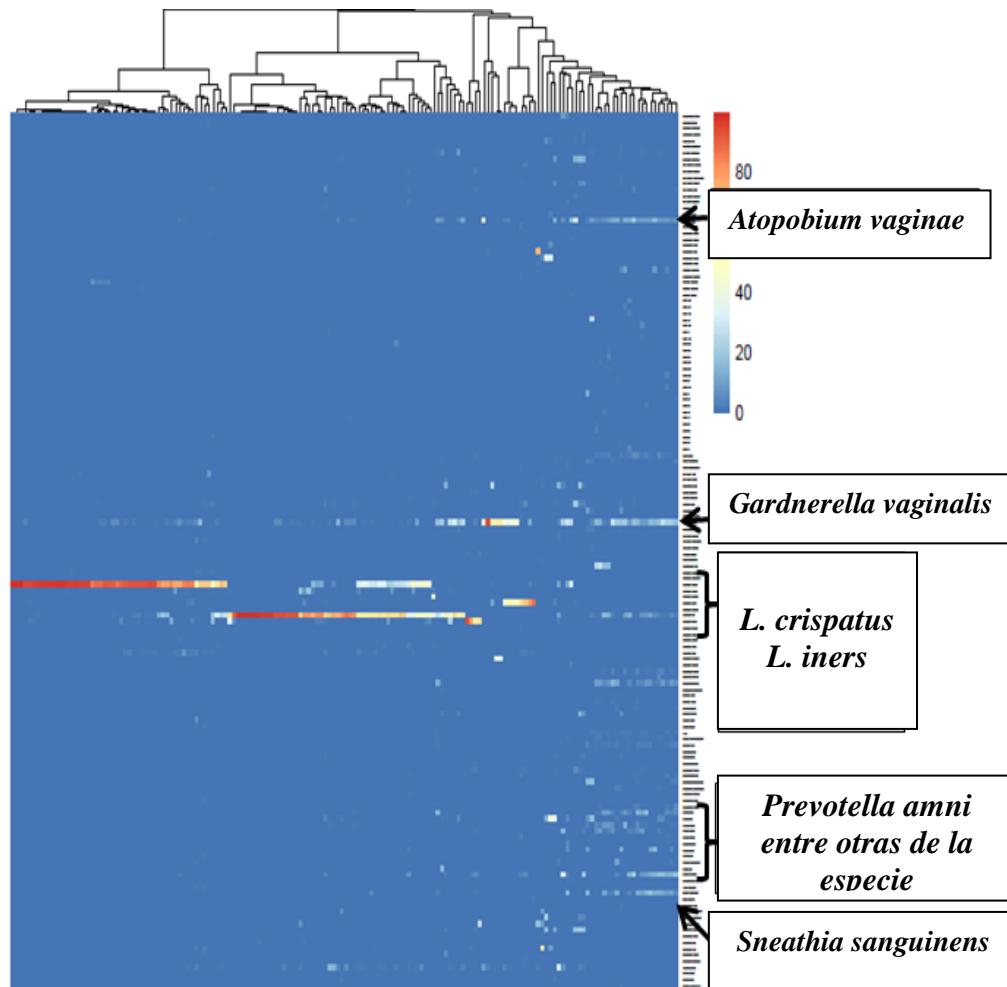


Figura 67. Heatmap a nivel de especie. Mapa de colores que va desde el rojo (mayor abundancia) al azul (menor abundancia), donde cada muestra es una columna y cada fila una OTU.

5.4.5 Evolución de los vaginotipos como estudio longitudinal del conjunto de todas las muestras.

Realizando una comparación general de las pacientes de ambos grupos de tratamiento de nuestro estudio de forma conjunta, se han incluido 3 pacientes eliminadas por mal cumplimiento del tratamiento, mala tolerancia al tratamiento

y por error en el procesamiento de alguna de sus muestras. Los vaginotipos más prevalentes en cada una de las visitas se encuentran reflejados en la Tabla 16. En general, los vaginotipos más frecuentes tomando en cuenta ambas visitas fueron el I y el III con 53 y 50 muestras pertenecientes a estas comunidades en cada caso. El segundo lugar lo ocupa la microbiota tipo IV con 39 muestras a su favor.

| Vaginotipos Visita 1 | Vaginotipos Visita 3 |
|----------------------|----------------------|
| I = 25 (32,89) | I = 28 (36,84) |
| II = 4 (5,26) | II = 4 (5,26) |
| III = 28 (36,84) | III = 22 (28,95) |
| IV = 18 (23,68) | IV = 21 (27,63) |
| V = 1 (1,32) | V = 1 (1,32) |
| Total = 76 | Total = 76 |

Tabla 16. Recuento total de vaginotipos encontrados en la Visita 1 (primera columna) y en la Visita 3 (segunda columna) de nuestro estudio. La primera cifra corresponde al número absoluto y la segunda al porcentaje que representa del total de los vaginotipos encontrados en la Visita 1 y 3 respectivamente.

La Tabla 17 muestra la transición de vaginotipos encontrada tras el análisis de la base de datos obtenida. El 75% de las pacientes mantuvo su vaginotipo inicial durante el periodo de seguimiento, mientras que solo un 25% (19 pacientes) cambiaron su tipo de microbiota. La comunidad tipo I persiste en un 76% de las que se hallaron inicialmente, la tipo III en el 71,43% y la tipo IV en el 77,78% de los casos. El número de pacientes con vaginotipo II y V fue muy limitado.

| Transición de vaginotipos | I | II | III | IV | V |
|---------------------------|-----------|---------|------------|------------|----------|
| I | 19 (76) | 0 | 1 (4) | 5 (20) | 0 |
| II | 0 | 4 (100) | 0 | 0 | 0 |
| III | 7 (25) | 0 | 20 (71,43) | 1 (3,57) | 0 |
| IV | 2 (11,11) | 0 | 1 (5,56) | 14 (77,78) | 1 (5,56) |
| V | 0 | 0 | 0 | 1 (100) | 0 |

Tabla 17. Transición de los vaginotipos desde la Visita 1 (columna morada) a la Visita 3 (columnas azules) de nuestro estudio. La primera cifra corresponde al número absoluto y la segunda al porcentaje que representa del total de los vaginotipos encontrados en la Visita 1.

A continuación, en la Tabla 18 se muestran las comunidades bacterianas encontradas según la fase del ciclo en la que fue tomada la muestra de la Visita 1. Como vemos, el vaginotipo III fue el más prevalente en la fase folicular (57% del total de ese vaginotipo). En la fase periovulatoria la comunidad tipo I y III fueron las más frecuentes (24% y 14% respectivamente del total de cada vaginotipo). Por último, el vaginotipo I y el IV fueron los más encontrados en las muestras tomadas en la fase lútea (36% y 44% del total de casos respectivamente).

| Fase del ciclo | I | II | III | IV | V |
|--------------------------|--------|--------|------------|-----------|---------|
| Folicular | 7 (28) | 1 (25) | 16 (57,14) | 7 (38,89) | 0 |
| Periovulatoria | 6 (24) | 0 | 4 (14,29) | 2 (11,11) | 0 |
| Lútea | 9 (36) | 1 (25) | 3 (10,71) | 8 (44,44) | 0 |
| Desconocida | 3 (12) | 2 (50) | 5 (17,86) | 1 (5,56) | 1 (100) |
| Total vaginotipos | 25 | 4 | 28 | 18 | 1 |

Tabla 18. Total de vaginotipos encontrados en la Visita 1 según la fase del ciclo en la que fue tomada la muestra. La primera cifra corresponde al número absoluto y la segunda al porcentaje que representa del total de los vaginotipos encontrados en dicha visita.

A continuación, se muestra la distribución gráfica del conjunto de los vaginotipos encontrados en las muestras tomadas (Figura 68). Como vemos, existen tres vaginotipos principales en nuestro estudio: I, III y IV con características muy definidas y algunas muestras localizadas a medio camino entre estos vaginotipos. Los vaginotipos II y V, se encuentran en muy escaso número en nuestra población.

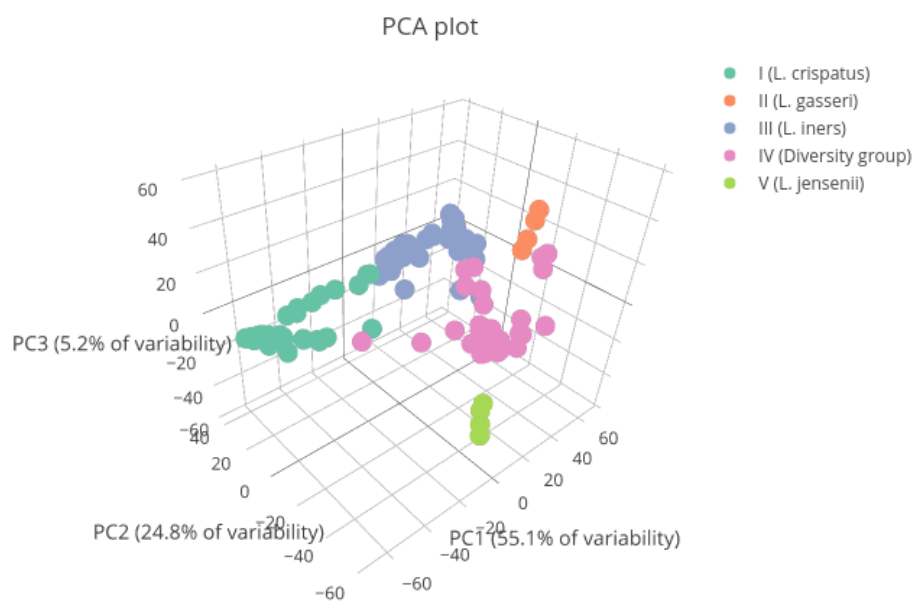


Figura 68. Vaginotipos encontrados en el conjunto de pacientes representado por colores. El vaginotipo II y V se encuentran infrarepresentados en la población estudiada. PC1 = Componente Principal 1. PC2 = Componente Principal 2.

VI - DISCUSIÓN

CAPÍTULO VI - DISCUSIÓN

6.1 Microbiota vaginal y factores influyentes

La microbiota vaginal es un ecosistema complejo que puede presentar una gran variabilidad inter e intraindividual a lo largo de la vida. Esta puede verse alterada por diferentes factores intrínsecos como la edad, raza, genética y fluctuaciones hormonales, así como por factores extrínsecos como ingesta de antibióticos o anticonceptivos orales, prácticas sexuales, lavados vaginales, entre otros. Para conseguir nuevamente un estado de homeostasis vaginal, en ocasiones se precisa del aporte exógeno de *Lactobacillus* mediante el empleo de probióticos.

Según la Organización Mundial de la Salud, los probióticos son "microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio para la salud del huésped". Como se ha reflejado en la revisión bibliográfica, actualmente existen diversos estudios que muestran los beneficios de esta terapia en distintos aparatos y sistemas.

6.2 Prevención y tratamiento de las disbiosis vaginales mediante el empleo de probióticos

En cuanto a la prevención de las disbiosis vaginales, la mayoría de los estudios avalan su empleo adyuvante tras los antimicrobianos para prevenir recurrencias. Por otro lado, uno de los pocos ensayos que administran probióticos de manera conjunta con los antimicrobianos es el de Sgibnev A et al (Grupo 1, metronidazol oral + *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35 vía vaginal vs Grupo 2, metronidazol + placebo)⁵². Se demuestra que a pesar de que no se alcanza una curación total en el Grupo 1, los probióticos potencian el efecto de los antimicrobianos duplicando su tasa de éxito⁵². Estos hallazgos validan el efecto que tienen los *Lactobacillus* y sus productos antimicrobianos como "ayudante de los antibióticos", sensibilizando a los microorganismos patógenos ante estos

agentes⁴⁸. Sin embargo, no se deben extrapolar estos resultados a todas las cepas probióticas ni la combinación con cualquier antimicrobiano es válida. Para ello, es preciso de estudios *in vitro* e *in vivo* con cepas de colonización vaginal demostrada que presenten resistencia al agente antimicrobiano coadministrado, y que a su vez, potencien su efecto para la resolución de procesos infecciosos de forma más eficaz como es el caso del *L. rhamnosus* Lcr35⁴⁸.

Hasta el momento, solo se han realizado tres estudios en los que se administran únicamente probióticos para el tratamiento de infecciones. Anukan KC et al en 2006⁵⁶, realizan un estudio en pacientes con VB a las que se les pauta un tratamiento vía vaginal con metronidazol vs cápsulas de *L. rhamnosus* GR-1 + *L. reuteri* RC-14, ambos por 5 días. Las muestras vaginales estudiadas muestran un 90% de curación en el grupo de probióticos vs 55% en el grupo de metronidazol el día 30 de seguimiento⁵⁶. Vujic et al⁷⁴, presentaron un estudio en el que administraron el probiótico vía oral *L. rhamnosus* GR-1 + *L. reuteri* RC-14 por 6 semanas vs placebo para el tratamiento de VB, VC y tricomoniasis en 544 mujeres. Al finalizar el tratamiento, se encontró una normalización de la microbiota vaginal en el doble de pacientes del grupo probiótico, efecto que se mantuvo estable en la semana 12 de seguimiento en dicho grupo vs solo en 1/5 de las pacientes del grupo placebo. Por último, Arroyo R et al¹⁵⁸ realizaron un ensayo en mujeres con mastitis puerperal a las que trataron durante 21 días empleando la siguiente pauta: Grupo A, *L. fermentum* CECT5716; Grupo B, *L. salivarius* CECT5713; Grupo C, antibioterapia. La cantidad de bacterias presentes en la leche materna y la escala del dolor al finalizar el tratamiento, así como el porcentaje de recurrencias a los 3 meses fue inferior en los grupos probióticos en comparación con el grupo antibiótico¹⁵⁸. Por tanto, la administración de probióticos resulta una medida eficaz para el tratamiento de procesos infecciosos y futuros estudios dictaminarán si es posible su empleo como alternativa a los antimicrobianos en la práctica clínica habitual. De esta manera, se evitarían tratamientos prolongados preventivos con antimicrobianos con aumento de sus efectos adversos, resistencias bacterianas, problemas de alergias medicamentosas, así como el impacto importante que estos representan sobre la homeostasis de la microbiota del huésped.

En general, la formulación probiótica más ampliamente estudiada tanto vía oral como vaginal para el tratamiento de distintas afecciones vaginales es *L. rhamnosus* GR-1 + *L. reuteri* RC-14, aunque muchos de estos ensayos fueron realizados por el mismo grupo de investigación. Esto no implica que sea la formulación probiótica más adecuada en todos los casos ni que se puedan generalizar sus propiedades farmacológicas a todas las cepas de la misma especie ya que estas presentan una gran variabilidad fenotípica con distintos mecanismos de adhesión, producción de sustancias antimicrobianas, antagonismo contra diferentes patógenos, entre otros. Sin embargo, cuenta con estudios que respaldan su eficacia vía vaginal a diferencia de muchos de los productos disponibles actualmente.

Se precisa de la realización de estudios de eficacia in vivo previo a la comercialización de cada cepa probiótica a pesar de que se cataloguen como alimentos probióticos y no estén sujetos a regulación por la FDA. De esta manera se garantiza a los consumidores la eficacia del tratamiento probiótico que adquieren para un fin determinado. Además, en futuros estudios, es recomendable el análisis de las muestras mediante técnicas de secuenciación masiva en grupos grandes de pacientes y concretar las cepas lactobacilares y dosis más idóneas para cada afección vaginal.

6.3 Análisis de los resultados del estudio

El objetivo del presente estudio fue analizar la microbiota vaginal de una población de mujeres fértiles y el impacto que ejerce sobre esta la ingesta durante 4 semanas de la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800 mediante un estudio de intervención, controlado con placebo, aleatorizado, doble-ciego. Después del análisis de los datos obtenidos, se demuestra que *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800 no coloniza la microbiota vaginal tras su administración vía oral. En consecuencia, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre la microbiota vaginal encontrada en las Visitas 1 y 3 al compararla con el grupo placebo en relación con el género *Lactobacillus* ($p = 0.7908$) ni en la presencia de *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800 aunque para esta cepa se obtuvo un valor de p más reducido ($p = 0,13$, test de Wilcoxon). Tampoco se observaron cambios en

cuanto a la prevalencia de las especies patógenas estudiadas: *Gardnerella vaginalis* ($p = 0.5728$), *Atopobium vaginae* ($p = 0.9171$) y *Streptococcus agalactiae* ($p = 0.8862$). En cuanto a *Propionibacterium acnes* (actualmente *Cutibacterium acnes*), no se obtuvo cuantificación de esta especie en las muestras analizadas. Al unificar todos los patógenos y compararlos con los valores iniciales en ambos grupos, se encontró una tendencia a un delta negativo, es decir, una disminución de microorganismos “patógenos” en el grupo que consumió CECT 8800, pero sin significancia estadística ($p = 0.3432$). Por último, se analizó si la ingesta del probiótico CECT 8800 tuvo un impacto diferencial en la biodiversidad encontrada en la microbiota vaginal de las mujeres incluidas en el estudio. La evolución del *índice de Shannon* (analiza la heterogeneidad de la muestra, tomando en cuenta el número de especies presentes y su abundancia relativa) en ambos casos fue muy similar para ambos grupos, no encontrándose diferencias significativas en el impacto sobre la diversidad ($p = 0.729$).

En relación a los vaginotipos encontrados en nuestro estudio, inicialmente se observó que el grupo asignado al tratamiento probiótico contenía un mayor número de mujeres con microbiota vaginal disbiótica (tipo IV) que las del grupo placebo. Este parámetro resulta muy complicado de estratificar o de tener en cuenta de manera previa al estudio, ya que un perfil disbiótico puede presentarse en mujeres asintomáticas como ya hemos comentado. Además, estas pueden encontrarse en tres escenarios:

- a) En un estado intermedio de su microbiota hacia una disbiosis mayor en la que se presentarán los síntomas.
- b) En proceso de normalización de sus poblaciones bacterianas.
- c) En un estado disbiótico crónico, que implicara molestias a lo largo de su vida, aunque en el momento del estudio no las presentara.

6.4 Análisis de los posibles factores intercurrentes en los resultados obtenidos

Después de realizar una revisión exhaustiva de la metodología y el diseño empleado en el estudio, se detallan a continuación una serie de factores que pueden haber influido en los resultados del estudio.

6.4.1 Cepa probiótica a estudio

El *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800 proviene de muestras vaginales de mujeres sanas seleccionado de entre otras 44 cepas vaginales por su facultad para disminuir el pH del medio y la síntesis de ácidos orgánicos¹⁶². Esta forma de selección de probióticos destinados a la optimización de la microbiota vaginal representa una mejor opción que las cepas de origen animal o lácteo debido a la mayor afinidad de las primeras para la colonización de este epitelio, así como una mayor habilidad para inhibir a los patógenos locales¹¹.

En el experimento in vitro con muestras de epitelio endometrial de Chenoll E et al¹⁶², se demostró la utilidad de CECT 8800 en la prevención de infecciones endometriales mediante la acidificación del medio en presencia de diversos patógenos así como depleción de especies como de *Propionibacterium acnes* y *Streptococcus agalactiae*¹⁶². Además, se comprueba que CECT 8800 a 1×10^6 UFC/ml produce ácido láctico, fomenta la reducción de moléculas proinflamatorias IL-6, IL-8, MCP-1 y su seguridad está comprobada en un modelo animal¹⁶².

García-Velasco JA²⁰⁶, realizó un estudio in vivo con *L. rhamnosus* CECT 8800 vs placebo vía vaginal en pacientes en tratamiento de fertilidad desde el día 4-6 de la estimulación ovárica hasta 3-5 días de la punción folicular. Tras finalizar la estimulación ovárica, se encontró una mayor concentración lactobacilar en el grupo probiótico de forma estadísticamente significativa ($p < 0,04$)²⁰⁶. También se encontró un aumento de vaginotipos I (*L. crispatus*), III (*L. iners*) y V (*L. jensenii*), así como disminución del número de pacientes que presentaban un vaginotipo IV (grupo de diversidad bacteriana y depleción lactobacilar) en el grupo probiótico²⁰⁶. Además, se demuestra la presencia de *L. rhamnosus* CECT 8800 durante su administración vía vaginal mediante la secuenciación del gen 16 rARN aunque sus valores descienden tras el cese del tratamiento²⁰⁶. En la muestra tomada al finalizar el tratamiento, la población lactobacilar había disminuido, lo que fue atribuido a la administración de azitromicina el día de la extracción ovocitaria²⁰⁶. Sin embargo, también puede indicar su baja capacidad de

permanencia en el entorno vaginal tras el cese de su administración local. No se observaron efectos adversos asociados al empleo del probiótico en humanos²⁰⁶. A pesar de todo esto y aunque la cepa CECT 8800 es de procedencia vaginal, esta no se encuentra entre las más prevalentes de esta microbiota, lo que puede haber influido a la hora de su colonización vaginal⁶¹.

6.4.2 Evidencia a favor de las cepas de la especie *Lactobacillus rhamnosus*

Existen diversas cepas de *L. rhamnosus* que han mostrado propiedades beneficiosas para el entorno vaginal:

- ✓ Las cepas de *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35³⁸ y GR-1³⁹ han demostrado su adherencia al epitelio cervicovaginal de forma específica lo que representa un punto clave en la colonización del entorno vaginal y el bloqueo del asentamiento de patógenos¹¹⁹. Petrova MI et al³⁹, demostraron la unión de esta última cepa a través de la proteína 1 lectin-like con más afinidad por el epitelio vaginal que por el intestinal, promoviendo su paso del tracto gastrointestinal a la vagina después de su administración oral. Esta proteína puede representar una herramienta clave para la colonización del entorno vaginal por parte de GR-1. Futuros estudios determinaran si estas moléculas son la causa de que cepas de la misma especie tengan diferente impacto en la microbiota del huésped tras su administración.
- ✓ En cuanto al poder antagónico contra patógenos de la especie *L. rhamnosus*, las cepas Lcr35³⁸ y HN001²⁰⁷ han demostrado la inhibición de microorganismos nocivos in vitro. El primero, a pesar de ser de procedencia intestinal, ha demostrado mejorar la microbiota vaginal⁷⁹ y ser efectivo contra *Prevotella bivia*, *Gardnerella vaginalis* y *Candida albicans*³⁸, mientras que el segundo es útil contra *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*²⁰⁷. Además, GR-1 evitó la unión de *E. coli* in vitro y la generación de biopelículas, paso fundamental para evitar las resistencias bacterianas a los antimicrobianos, permitiendo que estos penetren más fácilmente y demostrando nuevamente su potencial empleo como ayudante de los antibióticos. Por otro lado, las

sustancias inhibidoras bacteriocin-like de *L. rhamnosus* L60 mostraron su poder de inhibición contra el *Streptococcus del grupo B*²⁰⁸.

- ✓ Existen estudios que respaldan su efectividad contra el VPH. *L. rhamnosus* BMX 54 (10⁴) administrado por 6 meses vía vaginal, ha demostrado ayudar a la eliminación del VPH y las lesiones intraepiteliales cervicales de bajo grado. Futuros estudios determinarían cuál es la cepa más idónea para este fin, pero abre la puerta a una nueva herramienta terapéutica para la erradicación de un virus tan prevalente como este.
- ✓ Optimización de la microbiota presente en neovaginas/vaginas tras la administración vía oral por 7 días de *L. rhamnosus* LbV96 junto con otras especies⁵⁸.
- ✓ Se ha comprobado la detección vaginal tras la administración vía oral de las siguientes cepas: *L. rhamnosus* HN001 (5x10⁹ UFC/12h/14 días)²⁰⁹, *L. rhamnosus* PBS070 (5x10⁹ UFC/12h/14 días)⁷⁵ y *L. rhamnosus* GR-1 (1x10⁹/24h/28 días) (GR-1 mejora la microbiota vaginal, aunque no se han empleado técnicas específicas para su detección^{55,73}).
- ✓ Se ha comprobado la detección vaginal tras la administración tópica de las siguientes cepas: *L. casei* subespecie *rhamnosus* LN113 (10⁸-10¹⁰ UFC/12h/5 días) se detecta en vagina hasta 6 meses⁷⁷ y *L. rhamnosus* GR-1 (1x10⁹ cada uno/12h/5 días) se aísla hasta 1 mes después⁵⁶. En el estudio de García-Velasco JA²⁰⁶, se demuestra presencia de *L. rhamnosus* CECT 8800 durante su administración vía vaginal aunque desciende tras el cese del tratamiento.

Finalmente, aunque algunos miembros de la misma especie pueden tener propiedades similares, su efectividad puede variar ampliamente. Por tanto, es un error inferir que todas las cepas de la misma especie son útiles como probióticos y se pueden destinar para el mismo fin⁹.

6.4.3 Probióticos multiespecie

EL probiótico empleado en el presente estudio cuenta con una sola especie a alta concentración. Sin embargo, existen muchos estudios que apoyan la noción de la administración de probióticos multiespecie ya que algunas cepas precisan de otras para mejorar su colonización vaginal y pueden complementar su efecto antagónico contra microorganismos nocivos. Entre estos estudios se encuentran los siguientes:

- ✓ Bertuccini L et al, observó *in vitro* el efecto beneficioso de la combinación de *Lactobacillus rhamnosus* HN001 y *Lactobacillus acidophilus* GLA-14 (1×10^8 y 1×10^7 UFC / ml) debido a sus diferentes propiedades contra patógenos como *Gardenerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*²⁰⁷.
- ✓ Ruiz FO et al, demostraron el efecto beneficioso *in vitro* de la administración conjunta de sustancias inhibidoras similares a las bacteriocinas de *Lactobacillus rhamnosus* L60 y *Lactobacillus fermentum* L23 sobre cepas de *Streptococcus agalactie Grupo B* obtenidas de muestras de gestantes²⁰⁸. El 91% de las cepas patógenas se mostraron sensibles a estas sustancias por si solas, pero aún más cuando se añadían conjuntamente, ralentizando el crecimiento del *Streptococcus agalactie Grupo B* ($p < 0,05$)²⁰⁸. Debido al aumento de las resistencias a antimicrobianos debido a su fácil accesibilidad, automedicación y mal empleo, la administración de probióticos como tratamiento profiláctico de la infección *Streptococcus Grupo B* en mujeres embarazadas cobra cada día un papel más importante para disminuir la morbilidad en el recién nacido. Sin embargo, para su validación en la práctica clínica se precisa de un ensayo *in vivo* con la coadministración de L60 y L23.
- ✓ Reid G et al⁷², administraron *L. rhamnosus* GR-1 y *L. fermentum* RC-14 (renombrada *Lactobacillus reuteri* RC-14) por vía oral durante dos semanas en pacientes con infecciones urogenitales recurrentes. Después de una semana, observaron que en algunas mujeres la primera cepa se recuperó

por vía vaginal y la segunda en otras, destacando el beneficio de la administración de probióticos multiorganismo debido a la combinación de los mecanismos de defensa y la diferente capacidad de colonización de los *Lactobacillus* que varía entre cepas⁷².

- ✓ Mezzasalma V et al⁷⁵, utilizaron con éxito las siguientes combinaciones probióticas vía oral: Grupo A, *L. acidophilus* PBS066 y *L. reuteri* PBS072 (5x10⁹ UFC /día de cada cepa); Grupo B, *L. rhamnosus* PBS070, *L. plantarum* PBS067 y *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis* PBS075 (5x10⁹ UFC / día de cada cepa). Tras 7 días de tratamiento, se aislaron en vagina las cepas administradas vía oral del Grupo A y B, excepto la cepa PBS067 que necesitó 14 días de administración para su detección vaginal⁷⁵. También demostraron el efecto antagonista del sobrenadante de estas cepas contra *Escherichia coli* pero no contra *Candida albicans* in vitro en 24 horas. Esto puede deberse a que algunos productos antimicrobianos como las bacteriocinas solo son activas a determinados pHs y *Candida* no suele ser susceptible al entorno ácido generado por los *Lactobacillus*⁷⁵. Sin embargo, el Grupo A y B demostraron inhibir de forma moderada y fuerte a ambos patógenos respectivamente en cultivo vivo de *Lactobacillus*⁷⁵.
- ✓ En un meta-análisis reciente presentado por Vrese M et al²¹⁰, seleccionaron tres ensayos clínicos aleatorizados donde se analizó el impacto en la microbiota vaginal-neovaginal después de la administración oral de la siguiente formulación probiótica: *L. rhamnosus* LbV96, *L. crispatus* LbV 88, *L. gasseri* LbV150N y *L. jensenii* LbV116. Se observó una mejoría en la puntuación Nugent en comparación con el grupo placebo (p<0,004).
- ✓ Ehrström S et al⁷⁷ llevaron a cabo un estudio donde tras el tratamiento con los antimicrobianos habituales empleados en VC y VB, se administró vía vaginal *Lactobacillus gasseri* LN40, *L. fermentum* LN99, *L. casei* subespecie *rhamnosus* LN113 y *Pedococcus acidilactici* LN23 por 5 días. Se encontró que al menos una de estas cepas probióticas fue aislada en vagina en más de la mitad de los casos al mes de seguimiento y en 9% tras 6 meses⁷⁷. Además, la adición de *Pedococcus acidilactici* LN23 representó una ventaja para las

otras cepas principalmente por su capacidad de acidificar el pH rápidamente y, permitir así, la proliferación de los *Lactobacillus*, desapareciendo LN23 posteriormente⁷⁷.

Existe algún estudio donde se emplea una sola cepa que ha demostrado su validez, como el de Bodhot JM et al, donde se administró vía oral *L. rhamnosus* Lcr35 2×10^8 por 4 semanas mejorando la microbiota vaginal según la escala Nugent⁷⁹. Sin embargo, tres estudios en los que se administró otra cepa, *L. rhamnosus* GG de forma única, vía oral^{73,211} o vaginal²¹² a alta concentración (entre 2×10^9 - 1×10^{10}) tuvieron resultados desalentadores. Probablemente, esto se deba a que GG carece de proteínas de adhesión específicas al epitelio vaginal y que eviten la unión de patógenos como el biosurfactante 29 kDa²¹¹. Además, presenta una baja producción de peróxido de hidrógeno²¹¹. Sin embargo, la cepa GG si muestra utilidad para su empleo a nivel gastrointestinal en el estudio de Colodner R et al. Los autores administraron *L. rhamnosus* GG en una bebida de yogurt ($1-2 \times 10^9$) por un mes, observando una colonización rectal de la cepa en el 78% de las pacientes, mientras que solo se aisló en 9% de las muestras vaginales²¹¹. Por tanto, a pesar de que este probiótico aún se comercializa para la mejora de la microbiota vaginal, no se recomienda su empleo para este fin debido a la carencia de estudios que respalden su eficacia, pero se puede valorar su empleo para la homeostasis de la microbiota gastrointestinal.

Es importante destacar que los probióticos de múltiples especies deben contener cepas cuidadosamente seleccionadas que proporcionen diferentes propiedades antagónicas contra los patógenos y no se inhiban entre sí. Chapman CM et al²¹³, realizaron un estudio in vitro donde observaron que las 14 cepas empleadas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus salivarius* tenían la capacidad de inhibir por lo menos una de las otras cepas probióticas (sobre todo entre *Lactobacillus*), resultando en una posible disminución de su eficacia con la administración de múltiples especies²¹³. Sin embargo, el efecto general fue beneficioso ya que en la mitad de los casos la combinación de especies probióticas resultó superior en cuanto a la inhibición de patógenos en comparación a cuando se emplearon dichas cepas por separado²¹³. En el cultivo con *E. coli* NCFB 1989, resultaron más eficaces las cepas únicas de *Lactobacillus* y, contra *Salmonella*

typhimurium LT2, fueron mejores las combinaciones de distintos géneros²¹³. En futuros estudios se debe tomar en cuenta la biomasa de las especies, ya que existe una asociación entre esta y el poder neutralizante contra los microorganismos patógenos²¹³. Además, los consumidores deben ser cuidadosos a la hora de elegir el producto probiótico a usar ya que frecuentemente optan por aquel que presenta mayor número de especies diferentes, sin considerar que pueden tener un efecto inhibitorio entre ellas.

6.4.4 Otros factores influyentes en los resultados

- ✓ La dosis administrada en nuestro estudio es la más alta disponible en comparación con otros probióticos comercializados (10^{10} UFC), por lo que este no ha sido un factor que haya tenido influencia en nuestros resultados. En general, no se ha establecido una dosis adecuada para la administración de probióticos debido a sus amplias variaciones según la cepa y vía de administración. Sin embargo, tanto el estudio de Bohdot JM et al⁷⁹ como el de Reid G et al⁷³ donde se emplean distintas dosis de las cepas Lcr35 y GR-1 de *L. rhamnosus* respectivamente, concluyen que son necesarias más de $2-8 \times 10^8$ UFC/día para la normalización de la microbiota vaginal.
- ✓ El producto probiótico cuenta con un control de calidad realizado previo a su salida del laboratorio, donde la viabilidad de las cepas fue comprobada con éxito en cada uno de los lotes suministrados.
- ✓ El medicamento se almacenó correctamente a temperatura ambiente, lejos de la luz solar de acuerdo con las indicaciones del fabricante y aconsejamos a los pacientes que hicieran lo mismo en su domicilio. Además, se recomendó evitar la toma de las cápsulas con líquidos calientes para preservar la viabilidad de los *Lactobacillus*. Por tanto, las condiciones de almacenamiento tampoco se cree que hayan influido en los resultados del estudio.

- ✓ La presentación farmacológica utilizada en nuestro estudio es la estándar, similar a la de otros estudios con buenos resultados. Consta de cápsulas vegetales de hidroxipropilmetilcelulosa resistentes a secreciones de ácido gástrico y a los ácidos biliares. Además, se empleó maltrodextrina, un prebiótico ampliamente usado para promover el crecimiento de las colonias lactobacilares administradas. Por último, el excipiente añadido, estearato de magnesio, se encuentra presente en muchos alimentos y se utiliza habitualmente en la fabricación de medicamentos en polvo y comprimidos.
- ✓ La adherencia al tratamiento se controló mediante el recuento de las cápsulas restantes en las cajas devueltas en la Visita 3 y el testimonio de los pacientes.
- ✓ Las muestras vaginales tomadas fueron conservadas inmediatamente tras su toma y siguieron una cadena de frío controlada a -30 °C.
- ✓ Únicamente se incluyeron pacientes que no habían tomado antibióticos las dos semanas antes ni probióticos los dos meses previos, ya que pueden actuar como factores de confusión por el impacto que tienen estos productos sobre la microbiota vaginal. Como se reflejó en los CRD, solo cuatro sujetos tomaron antibióticos durante el estudio (dos de ellos como monodosis y el resto en tratamientos cortos de 3-4 días), por lo que este no fue un factor intercurrente negativo.
- ✓ Un aspecto clave a tener en cuenta al estudiar la microbiota vaginal es la forma en que se analizan las muestras. En la literatura, hay muchos ensayos clínicos que estudian la microbiota vaginal a través de métodos basados en cultivos que excluyen una cantidad importante de especies que no crecen en cultivos habituales de *Lactobacillus* como el *L. Iners*^{11,61}. Además, algunos estudios clasifican el estado de la microbiota vaginal según la puntuación de Amsel o Nugent, que puede tener cierta variabilidad interobservador. En nuestro estudio, las muestras se analizaron utilizando técnicas de secuenciación masiva para detectar el

gen 16S ARNr para identificar objetivamente todas las bacterias presentes a nivel de phylum, familia, género y especie. De esta manera, se obtuvo la composición exacta del ecosistema vaginal antes y después de la administración de nuestro probiótico oral.

6.5 Análisis de los resultados del estudio longitudinal de la composición de la microbiota vaginal por grupos taxonómicos.

En cuanto a la evolución de la microbiota de forma longitudinal existen muy pocos estudios publicados hasta el momento, ya que la mayor parte de ellos son transversales donde se analiza una única muestra vaginal por paciente. Estos estudios pueden no reflejar de forma fehaciente la comunidad bacteriana que presenta habitualmente cada paciente debido a que esta puede variar a lo largo del tiempo¹⁶. En este sentido, nuestro estudio aporta un tamaño muestral muy superior al existente en otros estudios en un tema poco estudiado hasta la fecha que es la variabilidad de la microbiota vaginal a lo largo del tiempo. Además, la mayoría de los estudios relevantes estudian la microbiota de mujeres americanas, pero prácticamente no hay estudios en nuestra población.

6.5.1 Test de dispersión y Canonical Correlation Analysis

Las pruebas de alfa-dispersión (Riqueza de la muestra, *índice de diversidad de Shannon* y de *Simpson*), así como las de beta-dispersión (*LCBD*, test de *PERMANOVA* sobre las variables del análisis principal de componentes o *PCoA* y *test de beta dispersión por parejas de variables*) empleadas a nivel de phylum, familia, género y especie, no mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la diversidad de las muestras. La contribución de las muestras a la diversidad encontrada fue relativamente homogénea sin ninguna que destacara en todos los niveles taxonómicos.

Por otro lado, tras maximizar las diferencias entre los grupos, la prueba *CCA* demostró que ninguna combinación de los phylum, familia, géneros y especies existentes en las muestras consigue definir las diferencias entre los grupos propuestos (probióticos vs placebo para cada visita).

6.5.2 Análisis de las muestras con *DESeq2* en cada nivel taxonómico

6.5.2.1 Nivel taxonómico de phylum

Tras el análisis de los resultados, se observó que *Firmicutes* fue el género mayoritario en nuestras muestras. Otros phylums frecuentemente aislados fueron *Actinotobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Tenericutes*. Al aplicar el algoritmo *RandomForest*, el phylum más importante para la diferenciación entre visitas fue *Tenericutes*, seguidos por *Proteobacteria* y *Fusobacteria*.

En cuanto a *Tenericutes*, su género más frecuente es *Mycoplasma* seguido por *Ureaplasma* que cuenta con algunas especies que afectan el tracto urogenital. *Mycoplasma hominis* y *Ureaplasma urealyticum* son dos especies habitualmente relacionadas con vaginosis bacteriana aunque también pueden ser encontradas en la microbiota de mujeres sanas⁹⁶. Por otro lado, el phylum *Proteobacteria* es uno de los más diversos y amplios de todas las bacterias, entre el que se encuentra la especie *Escherichia coli*, frecuentemente asociada a infecciones del tracto urinario. Por último, el phylum *Firmicutes* se encuentra entre uno de los más frecuentemente encontrados en la microbiota vaginal normal ya que contiene al género *Lactobacillus*, esencial para la lucha contra patógenos y la homeostasis de este entorno. Del phylum *Fusobacteria*, hablaremos más adelante.

En cuanto a las variaciones de los phylum observadas entre la Visita 1 y 3 mediante el análisis de la representación de los valores de *FoldChange*, se observa como el phylum *Fusobacteria* ha sido el único que ha reducido sus valores de forma significativa. *Firmicutes* también disminuye pero de forma muy discreta, coincidiendo con los hallazgos encontrados a nivel de género donde *Lactobacillus* resultó casi invariable en la Visita 3. *Proteobacteria* ha sido el phylum que más ha aumentado en comparación con el resto entre ambas visitas aunque sin alcanzar significancia estadística.

6.5.2.2 Nivel taxonómico de familia

La familia más habitualmente aislada fue *Lactobacillaceae*, aunque sus valores disminuyeron de forma discreta en la última visita, de forma paralela a lo

observado en su género *Lactobacillus* y en su phylum *Firmicutes*. Otras familias relevantes en cuanto a su frecuencia fueron *Atopobiaceae*, *Bifidobacteriaceae* y *Prevotellaceae*. Según lo observado tras la aplicación del *RandomForest*, *Microbacteriaceae* (phylum *Actinobacteria*) fue la familia mas importante para la dferenciación entre visitas, casi duplicando al resto de las familias, entre las cuales existió poca diferencia.

En cuanto a las variaciones de las familias observadas entre la Visita 1 y 3 mediante el análisis de la representación de los valores de *FoldChange*, se observa un descenso en la familia *Fusobacteriaceae* de forma estadísticamente significativa, al igual que se observó en su phylum *Fusobacteria* y su género *Fusobacterium*. Este género se ha visto relacionado con el cáncer cervical (especialmente la especie *Fusobacterium necrophorum*)¹⁷⁵ y al cáncer colorrectal¹⁸⁰. Además, está asociada a la formación de biofilms y a la VB²¹⁴. Por otro lado, la familia *Enterobacteriaceae* aumentó de forma estadísticamente significativa en la Visita 3 de forma similar a lo observado en su phylum *Proteobacteria*, pero este último sin alcanzar significancia estadística.

6.5.2.3 Nivel taxonómico de género

De igual manera a lo observado en otros estudios, el género *Lactobacillus* fue el más predominante en la microbiota vaginal de nuestras pacientes en ambas visitas. Sin embargo, se observó una depleción no significativa de los mismos en la Visita 3, así como para el género *Dialister* (relacionado con VB). Por tanto, *Lactobacillus* no han sufrido grandes variaciones en comparación con los otros géneros entre ambas visitas tras el periodo de intervención.

Las siguientes posiciones en cuanto a frecuencia las ocupan *Gardnerella*, *Prevotella* y *Atopobium*, siendo menos frecuentes los *Streptococcus*, *Dialister* y *Ureaplasma*. A pesar de que en ninguno de estos se obtuvo significancia estadística, *Gardnerella* presentó una significancia aceptable para su incremento en la visita final. *Gardnerella vaginalis* forma parte de la microbiota vaginal de mujeres sanas pero a su vez, es la precursora inicial de los biofilms bacterianos que se adhieren a las paredes vaginales mermando la efectividad de los antimicrobianos^{5,214}.

Por otro lado, los dos géneros más relevantes a la hora de diferenciar entre visitas fueron *Cutibacterium* y *Rhodoluna*. El primero (familia *Propionibacteriaceae*), es otro género que se encuentra asociado a la VB y que presenta enzimas que originan la resistencia al metronidazol²¹⁴ aunque también se encuentra presente en la microbiota vaginal de mujeres sanas⁹⁶. La segunda pertenece a la familia *Microbacteriaceae* que como mencionamos previamente fue el doble de relevante que el resto de familias del estudio para la diferenciación de los grupos.

Los géneros que han disminuido de forma significativa fueron *Parvimonas*, *Megasphaera*, *Mycoplasma*, *Fusobacterium* y *Mageeibacillus*. Los 3 primeros se encuentran en la microbiota vaginal normal⁵ y los dos últimos son bacterias asociadas a la VB²¹⁴. Finalmente, se encontró un aumento significativo de *Staphylococcus*, *Actinomyces* y *Escherichia*, todos hallados en estados fisiológicos aunque ocasionalmente puedan ser causante de infecciones⁵.

6.5.2.4 Nivel taxonómico de especie

Las especies más habitualmente aisladas fueron *Lactobacillus crispatus* y *L. iners*. Existió presencia de *L. jensenii* y *L. gasseri* pero de forma más reducida. Otras especies relevantes son *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella amni* entre otras de su especie y *Sneathia sanguinens*.

En cuanto a las especies más importante en la comparación entre visitas fue *Prevotella bivia* seguido de forma estrecha por *Prevotella disiens* (ambas del phylum *Bacteroidetes*), existiendo poca diferencia entre el resto de las especies. El género *Prevotella* está presente en la microbiota vaginal de mujeres asintomáticas comportándose como un comensal⁶. Sin embargo, es uno de los géneros más asociados a las VB y contribuye al crecimiento de *Gardnerella vaginalis* y *Peptostreptococcus anaerobius*⁶, además de que produce enzimas como las sialidasas y colagenasas que degradan la capa protectora de mucina vaginal facilitando la adherencia de bacterias patógenas y con ello la VB²¹⁴.

El *DESeq* reflejó una depleción de la especie *Parvimonas micra* de forma estadísticamente significativa y por encima del resto de microorganismos, seguido por *Peptoniphilus lacrimalis*, *Peptoniphilus coxis* (asociadas al vaginotipo IV⁶) y *Mageeibacillus indolicus*, todas ellas del phylum *Firmicutes*. La especie

Parvimonas micra es un patógeno frecuente de la cavidad oral y es una de las especies asociadas al vaginotipo IV. *Mageibacillus indolicus* fue aislada por primera vez en el 2015 en muestras endometriales de mujeres con enfermedad inflamatoria pélvica²¹⁵ y está asociada a las VB²¹⁴.

Por otro lado, en nuestro estudio se observó un incremento más pronunciado de *Escherichia fergusonii* (*Proteobacteria*), seguido de *Lactobacillus acidophilus*, *L. psittaci* (*Firmicutes*), *Actinomyces neuui* (*Actinobacteria*) y *Prevotella bivia* (*Bacteroidetes*), todas ellas de forma estadísticamente significativa. *Lactobacillus rhamnosus* mostró una disminución de sus cifras en la Visita 3 pero dicho cambio no resultó ser estadísticamente significativo.

6.5.3 Análisis de los vaginotipos encontrados en nuestra población

Los vaginotipos más frecuentes tomando en cuenta las muestras de ambas visitas fueron el I y el III, representado por dominancia de *L. crispatus* y *L. iners* respectivamente. El segundo lugar lo ocupa la microbiota tipo IV caracterizada por diversidad bacteriana sin predominio lactobacilar. Si bien en el estudio de Ravel J et al⁶ se observó una prevalencia de la comunidad tipo IV en mujeres hispanas asintomáticas, este estudio fue realizado en pacientes americanas. De cualquier forma, este vaginotipo puede considerarse como una variante fisiológica de este grupo étnico al igual que en aquellas de raza negra, aunque si se ha relacionado la comunidad bacteriana IV con una mayor incidencia de VB y multiplica por 4 el riesgo de infección por VIH¹²⁷.

Sin embargo, los hallazgos en nuestra población si son comparables a los de las pacientes blancas americanas de Ravel J et al⁶ y Gajer P et al¹⁶. Estos datos destacan aún más la importancia del estudio de la microbiota vaginal de cada población que, como hemos expuesto previamente, puede variar por múltiples factores externos.

De forma similar a lo observado en el estudio de Gajer P et al¹⁶, el 75% de las pacientes mantuvo su vaginotipo inicial durante el periodo de seguimiento, mientras que solo un 25% (19 pacientes) cambiaron su tipo de microbiota. La comunidad tipo I (*L. crispatus*) persiste en un 76% de las que se hallaron inicialmente, la tipo III (*L. iners*) en el 71,43% y la tipo IV en el 77,78% de los casos.

En relación al vaginotipo II (*L. gasseri*) y V (*L. jensenii*), debido a que el número absoluto de pacientes encontradas con estas microbiotas fue muy bajo, no se pueden generalizar sus resultados. De manera paralela, el estudio de Romero R et al¹⁵ también mostró una infrarepresentación de las microbiotas tipo II y V.

En general, vemos que existe una resistencia al cambio del tipo de microbiota de cada paciente. Esta suele mantenerse estable a lo largo del tiempo con baja variabilidad intraindividual, siendo modificada por ciertos factores externos y hormonales de forma transitoria para volver a su estado basal posteriormente. En este sentido, nuestra muestra sigue la hipótesis de *Community resilience*⁶. Además, debido a que las muestras tomadas a cada paciente pertenecían a ciclos menstruales distintos, podemos concluir que a pesar de que la menstruación puede producir cambios en la microbiota, estos no han sido suficientemente importantes como para producir un cambio de vaginotipo en la mayoría de las pacientes. Estos hallazgos coinciden con los de Kyono K et al¹⁷, que encontró una concentración lactobacilar estable dentro del mismo ciclo y entre diferentes ciclos a corto plazo en una cohorte de pacientes sanas.

De cualquier forma, para un estudio adecuado de la microbiota vaginal es imprescindible la realización de un muestreo de cada paciente seriado en el tiempo para obtener los datos más fidedignos posibles.

Por último, realizamos una comparativa entre la fase del ciclo en la que la muestra fue tomada en la Visita 1 y la comunidad bacteriana encontrada. Observamos que cuando se tomaban muestras en la fase folicular del ciclo el vaginotipo más recurrente fue el tipo III. En la fase periovulatoria, se encontró similar número de comunidades I y III. Por último, en la fase lútea el tipo más frecuente fue el I, seguido de forma estrecha por el tipo IV. Existen estudios que respaldan la idea de que los picos estrogénicos del ciclo menstrual (fase periovulatoria y lútea) fomentan la estabilidad en el tipo de microbiota vaginal¹⁶, además de que pueden promover la dominancia lactobacilar por su efecto sobre la disponibilidad del glucógeno en el epitelio vaginal. Sin embargo, como hemos señalado previamente, no es el único factor intercurrente. El resultante de nuestra microbiota es el producto de la combinación de múltiples factores intrínsecos y extrínsecos que la moldean y producen cambios en la misma. El estudio del

impacto único de los cambios hormonales en el ecosistema vaginal sería posible únicamente en un modelo *in vitro* donde se pueda controlar el efecto de cada factor por sí solo.

VII - CONCLUSIONES

CAPÍTULO VII CONCLUSIONES

Tras la revisión bibliográfica realizada, se pueden trazar las siguientes conclusiones:

- ✓ La formulación probiótica más ampliamente estudiada tanto vía oral como vaginal para el tratamiento de distintas afecciones vaginales es *L. rhamnosus* GR-1 + *L. Reuteri* RC-14 (1×10^9 UFC/día/2 semanas o más). Su efecto puede persistir en vagina entre 6-12 semanas después, dependiendo de la pauta.
- ✓ En cuanto a la vía vaginal, destaca la formulación simbiótica con *Lactobacillus gasseri* LN40, *L. fermentum* LN99, *L. casei* subespecie *rhamnosus* LN113 y *Pedicoccus acidilactici* LN23 (10^8 - 10^{10} UFC en total/12h/5 días, además de maltodextrina), tras los antimicrobianos, con eficacia en VC, VB y tricomonas. Estas cepas pueden permanecer en vagina hasta 6 meses después con un tratamiento ultracorto vía vaginal. La administración de *Lactobacillus acidophilus* (10^7 UFC) + 0.03mg de estriol + 600mg de lactosa/ 12-24h/ 6 días vía vaginal también resultó beneficiosa en el tratamiento de la VB con permanencia de esta cepa en vagina hasta 3 semanas después.
- ✓ Por el contrario, bien sea por la dosis o por el tipo de cepas empleadas, se requirió un mes o más de tratamiento para alcanzar el efecto terapéutico deseado o no llegaron nunca a producir cambios en la microbiota, por lo que no parece rentable el empleo de los siguientes probióticos:
 - *Lactobacillus fermentum* 57A, *Lactobacillus plantarum* 57B y *Lactobacillus gasseri* 57C (1×10^8 UFC en total/día/60días).
 - *L. plantarum* P17630 (5×10^9 UFC/cápsula/3 ciclos de tratamiento de 15 días).
 - *Lactobacillus rhamnosus* GG vía vaginal u oral

- ✓ En cuanto al VIH, resulta primordial el tratamiento y la prevención de las disbiosis debido a su asociación con la diseminación del virus, mediante la administración de probióticos con especies como *L. crispatus* y *L. jensenii* que cuentan con propiedades antagónicas contra este virus.

Entre los hallazgos más relevantes encontrados en cuanto al estudio de la microbiota vaginal de nuestra población podemos enumerar los siguientes:

1. La microbiota vaginal es estable a corto plazo, observándose baja variabilidad intraindividual entre dos ciclos menstruales consecutivos. En nuestro estudio, el 75% de las pacientes mantuvo su vaginotipo inicial. Estos hallazgos siguen la teoría de *Community Resilience*.
2. Los vaginotipos predominantes en nuestra población fueron el I y el III, representado por dominancia de *L. crispatus* y *L. iners* respectivamente. El segundo lugar lo ocupa la microbiota tipo IV caracterizada por diversidad bacteriana sin predominio lactobacilar. Existió una baja prevalencia de la comunidad bacteriana II (*L. gasseri*) y V (*L. jensenii*).
3. Existe mayor probabilidad de obtener una microbiota dominada por *L. Iners* (tipo III) cuando se toman las muestras en la fase folicular del ciclo. En la fase periovulatoria, son más prevalentes las comunidades I (*L. crispatus*) y III. Por último, en la fase lútea el tipo más frecuente es el I, seguido de forma estrecha por el tipo IV (diversidad bacteriana).
4. El phylum *Firmicutes* es el mayoritario en las muestras vaginales obtenidas, aunque sus valores disminuyen discretamente al final del estudio. *Fusobacteria* ha sido el único phylum que ha incrementado sus valores de forma significativa en la Visita 3.
5. La familia más frecuentemente aislada fue *Lactobacillaceae*, aunque sus valores disminuyen discretamente tras el periodo de seguimiento. *Enterobacteriaceae* fue la única familia que aumenta y *Fusobacteriaceae* la

única que disminuye de forma estadísticamente significativa en la visita final

6. El género más habitual fue *Lactobacillus* aunque disminuye discretamente en la visita final. Otros géneros predominantes fueron *Atopobium*, *Gardnerella* y *Prevotella*. Se observó una depleción significativa de los géneros *Parvimonas*, *Megasphaera*, *Fusobacterium*, *Mageibacillus* y *Mycoplasma*. Sin embargo, se encontró un aumento de *Staphylococcus*, *Actinomyces* y *Escherichia* en la Visita 3.
7. La especie más frecuentes fueron *Lactobacillus crispatus* y *L. iners*. Además, se encontró una depleción en la especie *Parvimonas micra* de forma estadísticamente significativa, seguido por *Peptoniphilus lacrimalis*, *Peptoniphilus coxis* y *Mageibacillus indolicus*. Además, se observó un aumento más pronunciado de *Escherichia fergusonii*, seguido de *Lactobacillus acidophilus*, *L. psittaci*, *Actinomyces neuui* y *Prevotella bivia*, todas ellas de forma estadísticamente significativa en la Visita 3. *Lactobacillus rhamnosus* disminuye al final del estudio aunque de forma no significativa.

El amplio estudio de microbiota vaginal realizado en este trabajo, servirá de base para la selección de nuevas cepas probióticas candidatas para su aporte exógeno en el tratamiento y prevención de diversas infecciones vaginales como el VPH. Además, el conocer las características del ecosistema vaginal de nuestras pacientes nos permite realizar un enfoque terapéutico personalizado y la posibilidad de un seguimiento más estrecho en aquellas que cuenten con microbiotas susceptibles a la disbiosis.

VIII – LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

CAPÍTULO VIII –LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

8.1 Limitaciones

Entre las limitaciones a destacar tras la realización de este proyecto de investigación se encuentra el corto periodo de seguimiento llevado a cabo en el estudio. Por tanto, no se han valorado los cambios que acontecen en la microbiota vaginal a largo plazo en ambos grupos de tratamiento. Existen algunas formulaciones probióticas, principalmente cuando se emplea la vía oral, que precisan de pautas de tratamiento más prolongadas para observar su impacto en la composición del ecosistema vaginal.

Es posible que los resultados de nuestro estudio se encuentren limitados por el hecho de que solo hemos empleado una cepa probiótica. Actualmente, existen muchos estudios que apoyan la noción de la administración de probióticos multiespecie ya que, algunas cepas, precisan de otras para mejorar su colonización vaginal y potenciar su efecto antagonico contra microorganismos nocivos.

Otro aspecto a considerar, es la importancia de la realización de análisis intermedios que permitan obtener una visión preliminar del curso de la investigación, tanto a nivel de eficacia y seguridad como en el diseño empleado. Así, en caso de que se puedan trazar conclusiones estadísticamente significativas con los datos obtenidos, se puede valorar la interrupción precoz del estudio. Esto puede ser necesario si se demuestra, por ejemplo, que un tratamiento sea claramente superior a otro, y por motivos éticos y económicos, se decida finalizar el estudio. Si por el contrario, se ha detectado un fallo en el diseño, se puede interrumpir a tiempo el estudio y realizar los ajustes necesarios que permitan reiniciar un nuevo estudio sin la pérdida de recursos innecesarios. Además, existen estudios donde la realización de un análisis intermedio ha permitido

observar un aumento claro de reacciones adversas en uno de los grupos de tratamiento, lo cual obliga a interrumpir el estudio.

Por último, a pesar de que nuestro estudio cuenta con un tamaño muy superior a otros publicados hasta el momento, muestras mayores de pacientes permitirían observar diferencias más pequeñas interindividuales en la microbiota vaginal. Además, no se han podido establecer diferencias en los vaginotipos predominantes según raza o etnia, ya que la gran mayoría de las pacientes reclutadas mediante el muestreo no probabilístico secuencial fueron de etnia hispana europea, con representación nula de pacientes de raza negra o asiática.

8.2 Futuras líneas de investigación

Dentro de las futuras líneas de investigación a considerar se encuentran las siguientes:

- ✓ Estudios in vitro para determinar la combinación óptima de probióticos multiespecie de colonización vaginal comprobada, que presenten un efecto potenciador o complementario contra patógenos sin inhibirse mutuamente. Posteriormente, comprobar su efecto en un estudio in vivo de intervención, aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo. Valorar el empleo de formulaciones multiespecie con CECT 8800 vía vaginal, donde ya se ha demostrado su eficacia.
- ✓ Estudios para evaluar el potencial efecto de probióticos específicamente diseñados para la optimización de la microbiota endometrial y vaginal, previamente y durante tratamientos de reproducción. La cepa *Lactobacillus rhamnosus* CECT 8800 ya ha demostrado su eficacia vía vaginal para este fin, pero se precisan estudios donde se comparen las tasas de embarazo y recién nacido vivo en el grupo de tratamiento probiótico vs placebo.
- ✓ Estudios de intervención empleando las especies de *Lactobacillus* más prevalentes vaginales tales como *L. crispatus*, empleando dosis superiores a 10^8 UFC/día para el tratamiento y prevención de diferentes afecciones

vaginales. Las especies *L. gasseri* y *L. jensenii* a pesar de que son frecuentes en otras poblaciones, no lo son en la nuestra, por lo que aportar exógenamente microorganismos que no se encuentran habitualmente en la microbiota de nuestras pacientes puede no dar buen resultado a largo plazo.

- ✓ Es recomendable valorar diferentes grupos de tratamiento para obtener el tratamiento más eficaz: probióticos en combinación con antimicrobianos, probióticos tras finalizar los antimicrobianos, probióticos vs antimicrobianos únicamente. Considerar pautas de tratamiento de al menos un mes y seguimiento posterior por un tiempo mínimo de 6 meses para valorar las recurrencias de infecciones vaginales según grupos de tratamiento.
- ✓ Debido a que otras cepas de la especie *Lactobacillus rhamnosus* han demostrado su beneficio a nivel intestinal tales como *L. rhamnosus* GG, resulta interesante la realización de estudios de intervención con la administración oral de la cepa CECT 8800 para determinar su impacto sobre este ecosistema.
- ✓ Estudios de intervención con especies probióticas como *L. crispatus* vía vaginal u oral a largo plazo en pacientes VPH positivas para valorar su efecto sobre el aclaramiento viral y la eliminación de LSIL. Valorar también el empleo de *L. rhamnosus* GR-1 + *L. Reuteri* RC-14 ya que ha resultado efectiva contra otro tipo de infecciones vaginales en un gran número de ensayos clínicos.
- ✓ Estudios de intervención con *L. crispatus* y *L. jensenii* en pacientes seropositivas con vaginosis debido a su asociación con la diseminación del VIH, o simplemente, como terapia de mantenimiento a largo plazo de forma profiláctica. Valorar el empleo de cepas específicamente modificadas mediante ingeniería genética para actuar contra el virus, y así, prevenir a largo plazo de la diseminación de un virus tan prevalente como éste, sobre todo en poblaciones de riesgo.

- ✓ En la literatura, hay muchos ensayos clínicos que estudian la microbiota vaginal a través de métodos basados en cultivos que excluyen una cantidad importante de especies que no crecen en cultivos habituales de *Lactobacillus*. Además, algunos estudios clasifican el estado de la microbiota vaginal según la puntuación de Amsel o escala Nugent, que pueden tener cierta variabilidad interobservador. En futuras líneas de investigación, resulta fundamental el empleo de técnicas de secuenciación masiva de la microbiota vaginal, ya que permite obtener una visión completa y objetiva de la composición de este ecosistema.

IX - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPÍTULO IX – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sender R, Fuchs S, Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*. 2016;164:337-40.
2. Mitra A, MacIntyre DA, Marchesi JR, Lee YS, Bennett PR, Kyrgiou M. The vaginal microbiota, human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia: what do we know and where are we going next?. *Microbiome*. 2016;4:58.
3. Prince AL, Chu DM, Seferovic MD, Antony KM, Ma J, Aagaard KM. The perinatal microbiome and pregnancy: moving beyond the vaginal microbiome. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5:a023051.
4. Chen C, Song X, Wei W, Zhong H, Dai J, Lan Z, et al. The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases. *Nat Commun*. 2017;8:875.
5. Mendling W. Vaginal Microbiota. *Adv Exp Med Biol*. 2016;902:83-93.
6. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108:4680-7.
7. Gardner HL, Dukes CD. *Haemophilus vaginalis* vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis. *Am J Obstet Gynecol*. 1955;69:962-76.
8. Greenwood JR, Pickett MJ. Transfer of *Haemophilus vaginalis* Gardner and Dukes to a New Genus, *Gardnerella*: *G. vaginalis* (Gardner and Dukes) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1980;30:170-8.
9. Guarner F, Sanders ME, Eliakim R, Fedorak R, Gangl A, Garisch J, et al. Probióticos y prebióticos. Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología;2017.<https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/probiotics-and-prebiotics/probiotics-and-prebiotics-spanish> (último acceso 13 abril 2020).
10. Cartwright P. The history of probiotics. In: Peter Cartwright. *Probiotics for Crohn's and Colitis*. Ilford: Prentice Publishing; 2003.p.17-32.

11. Martín R, Soberón N, Vázquez F, Suárez JE. La microbiota vaginal: composición, papel protector, patología asociada y perspectivas terapéuticas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2008;26:160-7.
12. Oh HY, Kim BS, Seo SS, Kong JS, Lee JK, Park SY, et al. The association of uterine cervical microbiota with an increased risk for cervical intraepithelial neoplasia in Korea. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21:674.e1-9.
13. Shipitsyna E, Roos A, Datcu R, Halle'n A, Fredlund H, Jensen J, et al. Composition of the Vaginal Microbiota in Women of Reproductive Age – Sensitive and Specific Molecular Diagnosis of Bacterial Vaginosis Is Possible?. *PLoS ONE*. 2013;8:e60670.
14. Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB. Order II Lactobacillales. In: Vos P, Garrity G, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volume three: The Firmicutes. Second edition. New York: Springer; 2009. p.464-736.
15. Romero R, Hassan SS, Gajer P, Tarca AL, Fadrosh DW, Nikita L, et al. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome*. 2014;2:4.
16. Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schütte UME, Zhong X, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. *Sci Transl Med*. 2012;4:132ra52.
17. Kyono K, Hashimoto T, Nagai Y, Sakuraba Y. Analysis of endometrial microbiota by 16S ribosomal RNA gene sequencing among infertile patients: a single-center pilot study. *Reprod Med Biol*. 2018;17:297-306.
18. Moreno I, Codoñer FM, Vilella F, Valbuena D, Martinez-Blanch JF, Jimenez-Almazán J, et al. Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;215:684-703.
19. Brabin L, Roberts SA, Fairbrother E, Mandal D, Higgins SP, Chandio S, et al. Factors affecting vaginal pH levels among female adolescents attending genitourinary medicine clinics. *Sex Transm Infect*. 2005;81:483-7.
20. Hammerschlag MR, Alpert S, Onderdonk AB, Thurston P, Drude E, McCormack WM, et al. Anaerobic microflora of the vagina in children. *Am J Obstet Gynecol*. 1978;131:853-6.

21. Hill GB, St Claire KK, Gutman LT. Anaerobes predominate among the vaginal microflora of prepubertal girls. *Clin Infect Dis*. 1995;20:S269-70.
22. Myhre AK, Bevanger LS, Berntzen K, Bratlid D. Anogenital bacteriology in non-abused preschool children: a descriptive study of the aerobic genital flora and the isolation of anogenital *Gardnerella vaginalis*. *Acta Paediatr*. 2002;91:885-91.
23. Hickey RJ, Zhou X, Settles ML, Erb J, Malone K, Hansmann MA, et al. Vaginal microbiota of adolescent girls prior to the onset of menarche resemble those of reproductive-age women. *mBio*. 2015;6:e00097-15.
24. Muhleisen AL, Herbst-Kralovetz MM. Menopause and the vaginal microbiome. *Maturitas*. 2016;91:42-50.
25. Burton JP, Reid G. Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. *J Infect Dis*. 2002;186:1770-80.
26. Hummelen R, Macklaim JM, Bisanz JE, Hammond JA, McMillan A, Vongsa R, et al. Vaginal microbiome and epithelial gene array in postmenopausal women with moderate to severe dryness. *PLoS One*. 2011;6:e26602.
27. Brotman RM, Shardell MD, Gajer P, Fadrosch D, Chang K, Silver MI, et al. Association between the vaginal microbiota, menopause status, and signs of vulvovaginal atrophy. *Menopause*. 2014;21:450-8.
28. Jaisamrarn U, Triratanachat S, Chaikittisilpa S, Grob P, Prasauskas V, Taechakraichana N. Ultra-low-dose estriol and lactobacilli in the local treatment of postmenopausal vaginal atrophy. *Climacteric*. 2013;16:347-55.
29. Petricevic L, Unger FM, Viernstein H, Kiss H. Randomized, double-blind, placebo-controlled study of oral lactobacilli to improve the vaginal flora of postmenopausal women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008;141:54-7.
30. Mitchell CM, Haick A, Nkwopara E, Garcia R, Rendi M, Agnew K, et al. Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women. *Am J Obstet Gynecol*. 2015;212:611.e1-9.
31. Miles SM, Hardy BL, Merrell DS. Investigation of the microbiota of the reproductive tract in women undergoing a total hysterectomy and bilateral salpingo-oophorectomy. *Fertil Steril*. 2017;107:813-20.e1.

32. Bo Z, Chaoyang S, Jia H, Meng X, Ensong G, Na L, et al. The biodiversity Composition of Microbiome in Ovarian Carcinoma Patients. *Sci Rep.* 2019;9:1691.
33. Banerjee S, Tian T, Wei Z, Shih N, Feldman MD, Alwine JC, et al. The ovarian cancer oncobiome. *Oncotarget.* 2017;8:36225–45.
34. Diep DB, Nes IF. Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr Drug Targets.* 2002; 3:107-22.
35. Reid G, Heinemann C, Velraeds M, Van Der Mei HC, Busscher HJ. Biosurfactants produced by *Lactobacillus*. *Methods Enzymol.* 1999;310:426-33.
36. Boris S, Suárez JE, Vázquez F, Barbés C. Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infect Immun.* 1998;66:1985-9.
37. Borgdorff H, Gautam R, Armstrong SD, Xia D, Ndayisaba GF, Van Teijlingen NH, et al. Cervicovaginal microbiome dysbiosis is associated with proteome changes related to alterations of the cervicovaginal mucosal barrier. *Mucosal Immunol.* 2016;9:621-33.
38. Coudeyras S, Jugie G, Vermerie M, Forestier C. Adhesion of human probiotic *Lactobacillus rhamnosus* to cervical and vaginal cells and interaction with vaginosis-associated pathogens. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2008;2008:549640.
39. Petrova MI, Lievens E, Verhoeven TL, Macklaim JM, Gloor G, Schols D, et al. The lectin-like protein 1 in *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 mediates tissue-specific adherence to vaginal epithelium and inhibits urogenital pathogens. *Sci Rep.* 2016;6:37437.
40. Clarke MA, Rodriguez AC, Gage JC, Herrero R, Hildesheim A, Wacholder S, et al. A large, population-based study of age-related associations between vaginal pH and human papillomavirus infection. *BMC Infect Dis.* 2012;12:33.
41. Wang KD, Xu DJ, Wang BY, Yan DH, Lv Z, Su JR. Inhibitory effect of Vaginal *Lactobacillus* Supernatants on cervical cancer cells. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2018;10:236-42.
42. Motevaseli E, Shirzad M, Akrami SM, Mousavi AS, Mirsalehian A, Modarressi MH. Normal and tumour cervical cells respond differently to

- vaginal lactobacilli, independent of pH and lactate. *J Med Microbiol.* 2013; 62:1065-72.
43. Wilks M, Wiggins R, Whiley A, Hennessy E, Warwick S, Porter H, et al. Identification and H₂O₂ production of vaginal lactobacilli from pregnant women at high risk of preterm birth and relation with outcome. *J Clin Microbiol.* 2004;42:713-7.
 44. Klebanoff SJ, Coombs RW. Viricidal effect of *Lactobacillus acidophilus* on human immunodeficiency virus type 1: possible role in heterosexual transmission. *J Exp Med.* 1991;174:289-92.
 45. Rosenstein IJ, Fontaine EA, Morgan DJ, Sheehan M, Lamont RF, Taylor-Robinson D. Relationship between hydrogen peroxide-producing strains of lactobacilli and vaginosis-associated bacterial species in pregnant women. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1997;16:517-22.
 46. Antonio MA, Rabe LK, Hillier SL. Colonization of the rectum by *Lactobacillus* species and decreased risk of bacterial vaginosis. *J Infect Dis.* 2005;192:394-8.
 47. Rousseau V, Lepargneur JP, Roques C, Remaud-Simeon M, Paul F. Prebiotic effects of oligosaccharides on selected vaginal lactobacilli and pathogenic microorganisms. *Anaerobe.* 2005;11:145-53.
 48. Sgibnev A, Kremleva E. Influence of Hydrogen Peroxide, Lactic Acid, and Surfactants from Vaginal Lactobacilli on the Antibiotic Sensitivity of Opportunistic Bacteria. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2017;9:131-41.
 49. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow?. *Lancet.* 2001;357:539-45.
 50. Global Market Insights [Internet]. 2017. Los Angeles: GlobeNewswire; [cited 2018 March 14]. Available from: <https://www.globenewswire.com/news-release/2017/10/10/1143574/0/en/Probiotics-Market-toexceed-65bn-by-2024-Global-Market-Insights-Inc.html>.
 51. Sanders ME. How do we know when something called “probiotic” is really a probiotic? A guideline for consumers and health care professionals. *Functional Food Reviews.* 2009;1:3–12.
 52. Sgibnev A, Kremleva E. Probiotics in addition to metronidazole for treatment *Trichomonas vaginalis* in the presence of BV: a randomized,

- placebo-controlled, double-blind study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2020;39:345-51.
53. Anukam K, Osazuwa E, Ahonkhai I, Ngwu M, Osemene G, Bruce AW, et al. Augmentation of antimicrobial metronidazole therapy of bacterial vaginosis with oral probiotics *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14: randomized, double-blind, placebo controlled trial. *Microbes Infect.* 2006;8:1450-4.
 54. Macklaim JM, Clemente JC, Knight R, Gloor GB, Reid G. Changes in vaginal microbiota following antimicrobial and probiotic therapy. *Microb Ecol Health Dis.* 2015;26:27799.
 55. Martinez RCR, Franceschini SA, Patta MC, Quintana SM, Gomes BC, De Martinis ECP, et al. Improved cure of bacterial vaginosis with single dose of tinidazole (2 g), *Lactobacillus rhamnosus* GR-1, and *Lactobacillus reuteri* RC-14: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Can J Microbiol.* 2009;5:133-8.
 56. Anukam KC, Osazuwa E, Osemene GI, Ehigiagbe F, Bruce AW, Reid G. Clinical study comparing probiotic *Lactobacillus* GR-1 and RC-14 with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis. *Microbes Infect.* 2006;8:2772-6.
 57. Senok AC, Verstraelen H, Temmerman M, Botta GA. Probiotics for the treatment of bacterial vaginosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009;(4):CD006289.
 58. Kaufmann U, Domig K, Lippitsch CI, Kraler M, Marschalek J, Kneifel W, et al. Ability of an orally administered lactobacilli preparation to improve the quality of the neovaginal microflora in male to female transsexual women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014;172:102-5.
 59. Gunawardana M, Mullen M, Yoo J, Webster P, Moss JA, Baum MM. Sustained delivery of commensal bacteria from pod-intravaginal rings. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:2262-7.
 60. Strus M, Chmielarczyk A, Kochan P, Adamski P, Chełmicki Z, Chełmicki A, et al. Studies on the effects of probiotic *Lactobacillus* mixture given orally on vaginal and rectal colonization and on parameters of vaginal health in women with intermediate vaginal flora. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012;163:210-5.

61. El Aila NA, Tency I, Claeys G, Verstraelen H, Saerens B, Santiago GL, et al. Identification and genotyping of bacteria from paired vaginal and rectal samples from pregnant women indicates similarity between vaginal and rectal microflora. *BMC Infect Dis.* 2009;9:167.
62. Reid G, Charbonneau D, Erb J, Kochanowski B, Beuerman D, Poehner R, et al. Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;35:131-4.
63. Wilkins T, Sequoia J. Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence. *Am Fam Physician.* 2017;96:170-8.
64. Navarro-López V, Ramírez-Boscá A, Ramón-Vidal D, Ruzafa-Costas B, Genovés-Martínez S, Chenoll-Cuadros E, et al. Effect of Oral Administration of a Mixture of Probiotic Strains on SCORAD Index and Use of Topical Steroids in Young Patients With Moderate Atopic Dermatitis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol.* 2018;154:37-43.
65. Knackstedt R, Knackstedt T, Gatherwright J. The role of topical probiotics on skin conditions: A systematic review of animal and human studies and implications for future therapies. *Exp Dermatol.* 2020;29(1):15-21.
66. Hendijani F, Akbari V. Probiotic supplementation for management of cardiovascular risk factors in adults with type II diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Clin Nutr.* 2018;37:532-41.
67. Zheng J, Feng Q, Zheng S, Xiao X. The effects of probiotics supplementation on metabolic health in pregnant women: An evidence based meta-analysis. *PLoS One.* 2018;13:e0197771.
68. Luoto R, Laitinen K, Nermes M, Isolauri E. Impact of maternal probiotic-supplemented dietary counselling on pregnancy outcome and prenatal and postnatal growth: a double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr.* 2010;103:1792-9.
69. Seminario-Amez M, López-López J, Estrugo-Devesa A, Ayuso-Montero R, Jané-Salas E. Probiotics and oral health: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2017;22:e282-e8.
70. Dolan KE, Finley HJ, Burns CM, Gasta MG, Gossard CM, Parker EC, et al. Probiotics and Disease: A Comprehensive Summary—Part 1, Mental and Neurological Health. *Integr Med (Encinitas).* 2016;15:46–58.

71. Kim SO, Sheikh HI, Ha SD, Martins A, Reid G. G-CSF-mediated inhibition of JNK is a key mechanism for *Lactobacillus rhamnosus*-induced suppression of TNF production in macrophages. *Cell Microbiol.* 2006;8:1958-71.
72. Reid G, Bruce AW, Fraser N, Heinemann C, Owen J, Henning B. Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2001;30:49-52.
73. Reid G, Beurman D, Heinemann C, Bruce AW. Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2001;32:37-41.
74. Vujic G, Jajac KA, Despot SV, Kuzmic VV. Efficacy of orally applied probiotic capsules for bacterial vaginosis and other vaginal infections: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013;168:75-9.
75. Mezzasalma V, Manfrini E, Ferri E, Boccarusso M, Di Gennaro P, Schiano I, et al. Orally administered multispecies probiotic formulations to prevent uro-genital infections: a randomized placebo-controlled pilot study. *Arch Gynecol Obstet.* 2017;295:163-72.
76. Parent D, Bossens M, Bayot D, Kirkpatrick C, Graf F, Wilkinson FE, et al. Therapy of Bacterial Vaginosis using exogeneously-applied *Lactobacilli aciophili* and a low dose of estriol: A placebo-controlled multicentric clinical trial. *Arzneimittelforschung.* 1996;46:68-73.
77. Ehrström S, Daroczy K, Rylander E, Samuelsson C, Johannesson U, Anzén B, et al. Lactic acid bacteria colonization and clinical outcome after probiotic supplementation in conventionally treated bacterial vaginosis and vulvovaginal candidiasis. *Microbes Infect.* 2010;12:691-9.
78. De Seta F, Parazzini F, De Leo R, Banco R, Maso GP, De Santo D, et al. *Lactobacillus plantarum* P17630 for preventing *Candida* vaginitis recurrence: a retrospective comparative study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014;182:136-9.
79. Bohbot JM, Cardot JM. Vaginal impact of the oral administration of total freeze-dried culture of LCR 35 in healthy women. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2012; 2012:503648.

80. Zawistowska-Rojek A, Tyski S. Are Probiotic Really Safe for Humans?. *Pol J Microbiol.* 2018;67:251-8.
81. Olveira Fuster G, González-Molero I. Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. *Nutr Hosp.* 2007;22:26-34.
82. Cannon JP, Lee TA, Bolanos JT, Danziger LH. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2005;24:31-40.
83. Husni RN, Gordon SM, Washington JA, Longworth DL. *Lactobacillus* bacteremia and endocarditis: review of 45 cases. *Clin Infect Dis.* 1997;25:1048-55.
84. Ouwehand AC, Saxelin M, Salminen S. Phenotypic differences between commercial *Lactobacillus rhamnosus* GG and *L. rhamnosus* strains recovered from blood. *Clin Infect Dis.* 2004;39:1858-60.
85. Pruccoli G, Silvestro E, Pace Napoleone C, Aidala E, Garazzino S, Scolfaro C. Are probiotics safe? *Bifidobacterium* bacteremia in a child with severe heart failure. *Infez Med.* 2019;27:175-8.
86. Redman MG, Ward EJ, Phillips RS. The efficacy and safety of probiotics in people with cancer: a systematic review. *Ann Oncol.* 2014;25:1919-29.
87. Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang ML. Probiotic use in clinical practice: what are the risks?. *Am J Clin Nutr.* 2006;83:1256-64.
88. Didari T, Solki S, Mozaffari S, Nikfar S, Abdollahi M. A systematic review of the safety of probiotics. *Expert Opin Drug Saf.* 2014;13:227-39.
89. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14:491-502.
90. Corzo N, Alonso JL, Azpiroz F, Calvo MA, Cirici M, Leis R, et al. Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutr Hosp.* 2015;31:99-118.
91. Coste I, Judlin P, Lepargneur JP, Bou-Antoun S. Safety and efficacy of an intravaginal prebiotic gel in the prevention of recurrent bacterial vaginosis: a randomized double-blind study. *Obstet Gynecol Int.* 2012;2012:147867.

92. Collins SL, McMillan A, Seney S, Van Der Veer C, Kort R, Sumarah MW, et al. Promising Prebiotic Candidate Established by Evaluation of Lactitol, Lactulose, Raffinose, and Oligofructose for Maintenance of a Lactobacillus-Dominated Vaginal Microbiota. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84(5).e02200-17.
93. Tester R, Al-Ghazzewi F, Shen N, Chen Z, Chen F, Yang J, et al. The use of konjac glucomannan hydrolysates to recover healthy microbiota in infected vaginas treated with an antifungal agent. *Benef Microbes.* 2012;3:61-6.
94. Al-Ghazzewi FH, Tester RF. Biotherapeutic agents and vaginal health. *J Appl Microbiol.* 2016;121:18-27.
95. Oakley BB, Fiedler TL, Marrazzo JM, Fredricks DN. Diversity of human vaginal bacterial communities and associations with clinically defined bacterial vaginosis. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:4898-909.
96. Romero D, Andreu A. Bacterial vaginosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2016;34:14-8.
97. Alsina M, Arencibia O, Centeno C, de la Cueva P, Fuertes I, Fusté P, et al. AEPCC-Guía: *Infecciones del tracto genital inferior*. Publicaciones AEPCC. 2016; 1-66.
98. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med.* 1983;74:14-22.
99. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol.* 1991;29:297-301.
100. Lamont RF, Nhan-Chang CL, Sobel JD, Workowski K, Conde-Agudelo A, Romero R. Treatment of abnormal vaginal flora in early pregnancy with clindamycin for the prevention of spontaneous preterm birth: a systematic review and metaanalysis. *Am J Obstet Gynecol.* 2011;205:177-90.
101. Koss CA, Baras DC, Lane SD, Aubry R, Marcus M, Markowitz LE, et al. Investigation of metronidazole use during pregnancy and adverse birth outcomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:4800-5.

102. Grupo de trabajo de la Guía Práctica de Asistencia SEGO. *Diagnóstico y tratamiento de las infecciones vulvovaginales*. Madrid; 2018.
103. Mendling W, Weissenbacher ER, Gerber S, Prasauskas V, Grob P. Use of locally delivered dequalinium chloride in the treatment of vaginal infections: a review. *Arch Gynecol Obstet*. 2016;293:469-84.
104. Sherrard J, Wilson J, Donders G, Mendling W, Jensen JS. 2018 European (IUSTI/WHO) International Union against sexually transmitted infections (IUSTI) World Health Organisation (WHO) guideline on the management of vaginal discharge. *International Journal of STD & AIDS*. 2018;29:1258-72.
105. Weissenbacher ER, Donders G, Unzeitig V, Martinez de Tejada B, Gerber S, Halaška M, et al. A comparison of dequalinium chloride vaginal tablets (Fluomizin®) and clindamycin vaginal cream in the treatment of bacterial vaginosis: a single-blind, randomized clinical trial of efficacy and safety. *Gynecol Obstet Invest*. 2012;73:8-15.
106. Laue C, Papazova E, Liesegang A, Pannenbeckers A, Arendarski P, Linnerth B, et al. Effect of a yoghurt drink containing Lactobacillus strains on bacterial vaginosis in women - a double-blind, randomised, controlled clinical pilot trial. *Benef Microbes*. 2018;9:35-50.
107. Falagas ME, Betsi GI, Athanasiou S. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother*. 2006;58:266-72.
108. Sobel JD, Chaim W. Vaginal microbiology of women with acute recurrent vulvovaginal candidiasis. *J Clin Microbiol*. 1996;34:2497-9.
109. Cribby S, Taylor M, Reid G. Vaginal microbiota and the use of probiotics. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2008;2008:256490.
110. Holland J, Young ML, Lee O, Chen S C-A. Vulvovaginal carriage of yeasts other than *Candida albicans*. *Sex Transm Infect*. 2003;79:249-50.
111. Steele C, Fidel PL Jr. Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans*. *Infect Immun*. 2002;70:577-83.
112. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet*. 2007;369(9577):1961-71.

113. Workowski KA, Berman S; Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Sexually transmitted diseases treatment guidelines. *MMWR Recomm Rep*. 2010;59:1-110.
114. Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12:80-96.
115. Phillips AJ. Treatment of non-albicans *Candida* vaginitis with amphotericin B vaginal suppositories. *Am J Obstet Gynecol*. 2005;192:2009-12.
116. Sobel JD, Chaim W, Nagappan V, Leaman D. Treatment of vaginitis caused by *Candida glabrata*: use of topical boric acid and flucytosine. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;189:1297-300.
117. Hettiarachchi N, Ashbee HR, Wilson JD. Prevalence and management of non-albicans vaginal candidiasis. *Sex Transm Infect*. 2010;86:99-100.
118. Sobel JD, Wiesenfeld HC, Martens M, Danna P, Hooton TM, Rompalo A, et al. Maintenance fluconazole therapy for recurrent vulvovaginal candidiasis. *N Engl J Med*. 2004;351:876-83.
119. Boris S, Suárez JE, Vázquez F, Barbés C. Adherence of Human Vaginal Lactobacilli to Vaginal Epithelial Cells and Interaction with Uropathogens. *Infection and Immunity*. 1998;66:1985-9
120. Reid G1, Bruce AW. Selection of lactobacillus strains for urogenital probiotic applications. *J Infect Dis*. 2001;183:S77-80.
121. Martinez RCR, Seney SL, Summers KL, Nomizo A, De Martinis EC, Reid G. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 on the ability of *Candida albicans* to infect cells and induce inflammation. *Microbiol Immunol*. 2009;53:487-95.
122. Vladareanu R, Miha D, Mitran M, Mehedintu C, Boiangiu A, Manolache M, et al. New evidence on oral *L. plantarum* P17630 product in women with history of recurrent vulvovaginal candidiasis (RVVC): a randomized double-blind placebo-controlled study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2018;22:262-7.
123. Brotman RM, Bradford LL, Conrad M, Gajer P, Ault K, Peralta L, Forney LJ, Carlton JM, Abdo Z, Ravel J. Association between *Trichomonas*

- vaginalis and vaginal bacterial community composition among reproductive-age women. *Sex Transm Dis*. 2012;39:807-12.
124. Phukan N, Parsamand T, Brooks AE, Nguyen TN, Simoes-Barbosa A. The adherence of *Trichomonas vaginalis* to host ectocervical cells is influenced by lactobacilli. *Sex Transm Infect*. 2013;89:455-9.
125. Organización Mundial de la Salud. VIH/Sida. [Internet]. Ginebra: WHO.int; 2019. [Consultado en Marzo 2020]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>.
126. Petrova MI, Van Den Broek M, Balzarini J, Vanderleyden J, Lebeer S. Vaginal microbiota and its role in HIV transmission and infection. *FEMS Microbiol Rev*. 2013;37:762-92.
127. Gosmann C, Anahtar MN, Handley SA, Farcasanu M, Abu-Ali G, Bowman BA, et al. Lactobacillus-Deficient Cervicovaginal Bacterial Communities Are Associated with Increased HIV Acquisition in Young South African Women. *Immunity*. 2017;46:29-37.
128. Sha BE, Zariffard MR, Wang QJ, Chen HY, Bremer J, Cohen MH, et al. Female genital tract HIV load correlates inversely with Lactobacillus species but positively with bacterial vaginosis and *Mycoplasma hominis*. *J Infect Dis*. 2005; 191:25-32.
129. Nunn KL, Wang YY, Harit D, Humphrys MS, Ma B, Cone R, et al. Enhanced Trapping of HIV-1 by Human Cervicovaginal Mucus Is Associated with lactobacillus crispatis-Dominant Microbiota. *mBio*. 2015;6:e01084-15.
130. Hummelen R, Chantalucha J, Butamanya NL, Cook A, Habbema JD, Reid G. Lactobacillus rhamnosus GR-1 and L. Reuteri RC-14 to prevent or cure bacterial vaginosis among women with HIV. *Int J Gynaecol Obstet*. 2010;111:245-8.
131. Mitchell C, Balkus JE, Fredricks D, Liu C, McKernan-Mullin J, Frenkel LM, et al. Interaction between lactobacilli, bacterial vaginosis-associated bacteria, and HIV Type 1 RNA and DNA Genital shedding in U.S. and Kenyan women. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2013;29:13-9.
132. Borgdorff H, Tsvitvadze E, Verhelst R, Marzorati M, Jurriaans S, Ndayisaba GF, et al. Lactobacillus-dominated cervicovaginal microbiota

- associated with reduced HIV/STI prevalence and genital HIV viral load in African women. *ISME J.* 2014;8:1781-93.
133. Dizzell S, Nazli A, Reid G, Kaushic C. Protective Effect of Probiotic Bacteria and Estrogen in Preventing HIV-1-Mediated Impairment of Epithelial Barrier Integrity in Female Genital Tract. *Cells.* 2019;8:E1120.
134. Wei W, Wiggins J, Hu D, Vrbanac V, Bowder D, Mellon M, et al. Blocking HIV-1 Infection by Chromosomal Integrative Expression of Human CD4 on the Surface of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *J Virol.* 2019;93:e01830-18.
135. Liu JJ, Reid G, Jiang Y, Turner MS, Tsai CC. Activity of HIV entry and fusion inhibitors expressed by the human vaginal colonizing probiotic *Lactobacillus reuteri* RC-14. *Cell Microbiol.* 2007;9:120-30.
136. Hyman RW, Fukushima M, Jiang H, Fung E, Rand L, Johnson B, et al. Diversity of the vaginal microbiome correlates with preterm birth. *Reprod Sci.* 2014;21:32-40.
137. Meis PJ, Goldenberg RL, Mercer B, Moawad A, Das A, McNellis D, et al. The preterm prediction study: significance of vaginal infections. National Institute of Child Health and Human Development Maternal-Fetal Medicine Units Network. *Am J Obstet Gynecol.* 1995;173:1231-5.
138. Nishijima K, Shukunami K, Kotsuji F. Probiotics affects vaginal flora in pregnant women, suggesting the possibility of preventing preterm labor. *J Clin Gastroenterol.* 2005;39:447-8.
139. Husain S, Allotey J, Drymoussi Z, Wilks M, Fernandez-Felix BM, Whiley A, et al. Effects of oral probiotic supplements on vaginal microbiota during pregnancy: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial with microbiome analysis. *BJOG.* 2020;127:275-84.
140. Sharpe M, Shah V, Freire-Lizama T, Cates EC, McGrath K, David I, et al. Effectiveness of oral intake of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 on Group B *Streptococcus* colonization during pregnancy: a midwifery-led double-blind randomized controlled pilot trial. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2019:1-8.
141. Mantaring J, Benyacoub J, Destura R, Pecquet S, Vidal K, Volger S, et al. Effect of maternal supplement beverage with and without probiotics during pregnancy and lactation on maternal and infant health: a

- randomized controlled trial in the Philippines. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2018;18:193.
142. Crusell MKW, Hansen TH, Nielsen T, Allin KH, Rühlemann MC, Damm P. Gestational diabetes is associated with change in the gut microbiota composition in third trimester of pregnancy and postpartum. *Microbiome*. 2018;6:89.
143. Gomez Arango LF, Barrett HL, Callaway LK, Nitert MD. Probiotics and pregnancy. *Curr Diab Rep*. 2015;15:567.
144. Dolatkhah N, Hajifaraji M, Abbasalizadeh F, Aghamohammadzadeh N, Mehrabi Y, Abbasi MM. Is there a value for probiotic supplements in gestational diabetes mellitus? A randomized clinical trial. *J Health Popul Nutr*. 2015;33:25.
145. Karamali M, Dadkhah F, Sadrkhanlou M, Jamilian M, Ahmadi S, Tajabadi-Ebrahimi M, et al. Effects of probiotic supplementation on glycaemic control and lipid profiles in gestational diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Metab*. 2016;42:234-41.
146. Reid G, Bocking A. The potential for probiotics to prevent bacterial vaginosis and preterm labor. *Am J Obstet Gynecol*. 2003;189:1202-8.
147. Hillier SL, Nugent RP, Eschenbach DA, Krohn MA, Gibbs RS, Martin DH, et al. Association between bacterial vaginosis and preterm delivery of a low-birth-weight infant. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *N Engl J Med*. 1995;333:1737-42.
148. Grev J, Berg M, Soll R. Maternal probiotic supplementation for prevention of morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2018;12:CD012519..
149. Othman M, Alfirevic Z, Neilson JP. Probiotics for preventing preterm labour. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2007;1:CD005941.
150. Neri A, Sabah G, Samra Z. Bacterial vaginosis in pregnancy treated with yoghurt. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 1993;72:17-9.
151. Shiozaki A, Yoneda S, Yoneda N, Yonezawa R, Matsubayashi T, Seo G, et al. Intestinal Microbiota is Different in Women with Preterm Birth: Results from Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *PLoS One*. 2014; 9:e11137.

152. Kirihara N, Kamitomo M, Tabira T, Hashimoto T, Taniguchi H, Maeda T. Effect of probiotics on perinatal outcome in patients at high risk of preterm birth. *J Obstet Gynaecol Res.* 2018;44:241-7.
153. Quinn KH, Parast MM. Decidual regulatory T cells in placental pathology and pregnancy complications. *Am J Reprod Immunol.* 2013;69:533-8.
154. Cilieborg MS, Boye M, Sangild PT. Bacterial colonization and gut development in preterm neonates. *Early Hum Dev.* 2012;88:S41-9.
155. AlFaleh K, Anabrees J. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews.* 2014;4:CD005496.
156. Benor S, Marom R, Ben Tov A, Armoni Domany K, Zaidenberg-Israeli G1, Dollberg S. Probiotic supplementation in mothers of very low birth weight infants. *Am J Perinatol.* 2014;31:497-504.
157. Fernández L, Cárdenas N, Arroyo R, Manzano S, Jiménez E, Martín V, et al. Prevention of Infectious Mastitis by Oral Administration of *Lactobacillus salivarius* PS2 During Late Pregnancy. *Clin Infect Dis.* 2016;62:568-73.
158. Arroyo R, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of *Lactobacilli* isolated from breast milk. *Clin Infect Dis.* 2010;50:1551-8.
159. Harton GL, Munné S, Surrey M, Grifo J, Kaplan B, McCulloh DH, et al. Diminished effect of maternal age on implantation after preimplantation genetic diagnosis with array comparative genomic hybridization. *Fertil Steril.* 2013;100:1695-703.
160. Moore DE, Soules MR, Klein NA, Fujimoto VY, Agnew KJ, Eschenbach DA. Bacteria in the transfer catheter tip influence the live-birth rate after in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2000;74:1118-24.
161. Koedooder R, Singer M, Schoenmakers S, Savelkoul PHM, Morré SA, de Jonge JD, et al. The vaginal microbiome as a predictor for outcome of in vitro fertilization with or without intracytoplasmic sperm injection: a prospective study. *Hum Reprod.* 2019;34:1042-54.

162. Chenoll E, Moreno I, Sánchez M, Garcia-Grau I, Silva Á1, González-Monfort M, et al. Selection of New Probiotics for Endometrial Health. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:114.
163. Serrano B, de Sanjosé S, Tous S, Quiros B, Muñoz N, Bosch X, et al. Human papillomavirus genotype attribution for HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 and 58 in female anogenital lesions. *Eur J Cancer.* 2015;51:1732-41
164. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer.* 2006;118:3030-44.
165. Pevsner-Fischer M, Tuganbaev T, Meijer M, Zhang SH, Zeng ZR, Chen MH, et al. Role of the microbiome in non-gastrointestinal cancers. *World J Clin Oncol.* 2016;7:200-13.
166. Pisani P1, Parkin DM, Muñoz N, Ferlay J. Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997;6:387-400.
167. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer.* 2019;144:1941-53.
168. Alemany L, Bayas JM, Borruel N, Campins M, Castellsagué X, Curran A, et al. AEPCC-Guía: *Vacunación selectiva frente al virus del papiloma humano en poblaciones de riesgo elevado.* Publicaciones AEPCC. 2016; 1-46.
169. Castellsagué X. Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer. *Gynecol Oncol.* 2008;110:S4-7.
170. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 2002; 89:191–9.
171. Gillet E, Meys JFA, Verstraelen H, Bosire C, De Sutter P, Temmerman M, et al. Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis. *BMC Infect Dis.* 2011;11:10.
172. Witkin SS, Mendes-Soares H, Linhares IM, Jayaram A, Ledger WJ, Forney LJ. Influence of vaginal bacteria and D- and L-lactic acid isomers on vaginal extracellular matrix metalloproteinase inducer: implications for protection against upper genital tract infections. *mBio.* 2013;4:e00460-13.
173. Norenhag J, Du J, Olovsson M, Verstraelen H, Engstrand L, Brusselaers N. The vaginal microbiota, human papillomavirus and cervical dysplasia: a systematic review and network meta-analysis. *BJOG.* 2020;127:171-80.

174. Arokiyaraj S, Seo SS, Kwon M, Lee JK, Kim MK. Association of cervical microbial community with persistence, clearance and negativity of Human Papillomavirus in Korean women: a longitudinal study. *Sci Rep*. 2018;8:15479.
175. Audirac-Chalifour A, Torres-Poveda K, Bahena-Román M, Téllez-Sosa J, Martínez-Barnetche J, Cortina-Ceballos B, et al. Cervical Microbiome and Cytokine Profile at Various Stages of Cervical Cancer: A Pilot Study. *PLoS One*. 2016;11:e0153274.
176. Brotman RM, Shardell MD, Gajer P, Tracy JK, Zenilman JM, Ravel J, et al. Interplay Between the Temporal Dynamics of the Vaginal Microbiota and Human Papillomavirus Detection. *J Infect Dis*. 2014;210:1723–33.
177. Mitra A, MacIntyre DA, Lee YS, Smith A, Marchesi JR, Lehne B, et al. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. *Sci Rep*. 2015;5:16865.
178. Verhoeven V, Renard N, Makar A, Van Royen P, Bogers JP, Lardon F, et al. Probiotics enhance the clearance of human papillomavirus-related cervical lesions: a prospective controlled pilot study. *Eur J Cancer Prev*. 2013;22:46-51.
179. Palma E, Recine N, Domenici L, Giorgini M, Pierangeli A, Panici PB. Long-term *Lactobacillus rhamnosus* BMX 54 application to restore a balanced vaginal ecosystem: a promising solution against HPV-infection. *BMC Infect Dis*. 2018; 18:13.
180. Kostic AD, Gevers D, Pedamallu CS, Michaud M, Duke F, Earl AM, et al. Genomic analysis identifies association of *Fusobacterium* with colorectal carcinoma. *Genome Res*. 2012;22:292-8
181. Bermúdez-Morales VH, Peralta-Zaragoza O, Alcocer-González JM, Moreno J, Madrid-Marina V. IL-10 expression is regulated by HPV E2 protein in cervical cancer cells. *Mol Med Rep*. 2011;4:369-75.
182. Cha M-K, Lee D-K, An H-M, Si-Won L, Seon-Hee S, Jeong-Hyun K, et al. Antiviral activity of *Bifidobacterium adolescentis* SPM1005-A on human papillomavirus type 16. *BMC Medicine*. 2012; 10:72.
183. Oncoguía SEGO: *Cáncer de Endometrio 2016*. Guías de práctica clínica en cáncer ginecológico y mamario. Publicaciones SEGO, Febrero 2016.

184. Walther-António MR, Chen J, Multinu F, Hokenstad A, Distad TJ, Cheek EH, et al. Potential contribution of the uterine microbiome in the development of endometrial cancer. *Genome Med.* 2016;8:122.
185. Ahn J, Sinha R, Pei Z, Dominianni C, Wu J, Shi J, et al. Human gut microbiome and risk for colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105:1907-11.
186. Ahn J, Segers S, Hayes RB. Periodontal disease, *Porphyromonas gingivalis* serum antibody levels and orodigestive cancer mortality. *Carcinogenesis.* 2012;33:1055-8.
187. Walsh DM, Hokenstad AN, Chen J, Sung J, Jenkins GD, Chia N, et al. Postmenopause as a key factor in the composition of the Endometrial Cancer Microbiome (ECbiome). *Sci Rep.* 2019;9:19213.
188. Mayrand MH, Duarte-Franco E, Rodrigues I, Walter SD, Hanley J, Ferenczy A, et al. Human papillomavirus DNA versus Papanicolaou screening tests for cervical cancer. *N Engl J Med.* 2007;357:1579-88.
189. Dossus L, Rinaldi S, Becker S, Lukanova A, Tjonneland A, Olsen A, et al. Obesity, inflammatory markers, and endometrial cancer risk: a prospective case-control study. *N Endocr Relat Cancer.* 2010;17:1007-19.
190. Oncoguía SEGO: *Cáncer Epitelial de ovario, trompa y peritoneo 2014*. Guías de práctica clínica en cáncer ginecológico y mamario. Publicaciones SEGO, Octubre 2014.
191. Nené NR, Reisel D, Leimbach A, Franchi D, Jones A, Evans I, et al. Association between the cervicovaginal microbiome, BRCA1 mutation status, and risk of ovarian cancer: a case-control study. *The Lancet Oncology.* 2019;20:1171-82.
192. Li X, Liu L, Cao Z, Li W, Li H, Lu C, et al. Gut microbiota as an "invisible organ" that modulates the function of drugs. *Biomed Pharmacother.* 2020;121:109653.
193. Alexander JL, Wilson ID, Teare J, Marchesi JR, Nicholson JK, Kinross JM. Gut microbiota modulation of chemotherapy efficacy and toxicity. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2017;14:356-65.
194. Zitvogel L, Daillère R, Roberti MP, Routy B, Kroemer G. Anticancer effects of the microbiome and its products. *Nat Rev Microbiol.* 2017;15:465-78.

195. Österlund P, Ruotsalainen T, Korpela R, Saxelin M, Ollus A, Valta P, et al. Lactobacillus supplementation for diarrhoea related to chemotherapy of colorectal cancer: a randomised study. *Br J Cancer*. 2007;97:1028-34.
196. Wada M, Nagata S, Saito M, Shimizu T, Yamashiro Y, Matsuki T, et al. Effects of the enteral administration of Bifidobacterium breve on patients undergoing chemotherapy for pediatric malignancies. *Support Care Cancer*. 2010;18:751-9.
197. Pinato DJ, Howlett S, Ottaviani D, Urus H, Patel A, Mineo T, et al. Association of Prior Antibiotic Treatment With Survival and Response to Immune Checkpoint Inhibitor Therapy in Patients With Cancer. *JAMA Oncol*. 2019;5:1774-8.
198. DNA Genotek [Internet]. Ontario: DNA Genotek; 2019 [cited 2020 April 6]. OMNIgene•VAGINAL (OMR-130) Collection instruction. Available from: <https://www.dnagenotek.com/us/support/collection-instructions/omnigene-vaginal/OMR-130.html>.
199. 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Protocol. (ILLUMINA).
200. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res*. 2013;41:e1.
201. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215:403-10.
202. Atlas RM, Bartha R. *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. Cuarta edición. Madrid: Pearson Educación; 2002.
203. Hill MO. Diversity and evenness: a unifying notation and its consequences. *Ecology*. 1973;54:427-73.
204. Chao A. Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics*. 1987;43:783-91.
205. Ata B, Yildiz S, Turkgeldi E, Brocal VP, Dinleyici EC, Moya A, et al. The Endobiota Study: Comparison of Vaginal, Cervical and Gut Microbiota Between Women with Stage 3/4 Endometriosis and Healthy Controls. *Sci Rep*. 2019;9:2204.
206. García-Velaszo JA, Requena A, Piro M, Fabris A, Matey S, Alvarez A. A randomized, double blind, placebo controlled trial assessing the effects of

- a vaginally administered pharmacobiotic ovule on the vaginal microbiome in women undergoing controlled ovarian stimulation. *Fertil Steril*. 2008;110:e340–e1.
207. Bertuccini L, Russo R, Iosi F, Superti F. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus acidophilus* on bacterial vaginal pathogens. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2017;30:163-7.
208. Ruíz FO, Gerbaldo G, García MJ, Giordano W, Pascual L, Barberis IL. Synergistic effect between two bacteriocin-like inhibitory substances produced by *Lactobacilli* Strains with inhibitory activity for *Streptococcus agalactiae*. *Curr Microbiol*. 2012;64:349-56.
209. De Alberti D, Russo R, Terruzzi F, Nobile V, Ouwehand AC. *Lactobacilli* vaginal colonisation after oral consumption of Respecta® complex: a randomised controlled pilot study. *Arch Gynecol Obstet*. 2015;292:861-7.
210. Vrese M, Laue C, Papazova E, Petricevic L, Schrezenmeir J. Impact of oral administration of four *Lactobacillus* strains on Nugent score - systematic review and meta-analysis. *Benef Microbes*. 2019;10:483-96.
211. Colodner R, Edelstein H, Chazan B, Raz R. Vaginal colonization by orally administered *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Isr Med Assoc J*. 2003;5:767-9.
212. Gardiner GE, Heinemann C, Bruce AW, Beuerman D, Reid G. Persistence of *Lactobacillus fermentum* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 but Not *L. rhamnosus* GG in the Human Vagina as Demonstrated by Randomly Amplified Polymorphic DNA. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9:92–6.
213. Chapman CM, Gibson GR, Rowland I. In vitro evaluation of single- and multi-strain probiotics: Inter-species inhibition between probiotic strains, and inhibition of pathogens. *Anaerobe*. 2012;18:405-13.
214. Vazquez F, Fernández-Blázquez A, García B. Vaginosis. *Microbiota vaginal*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2019; 37:592–601.
215. Austin MN, Rabe LK, Srinivasan S, Fredricks DN, Wiesenfeld HC, Hillier SL. *Mageeibacillus indolicus* gen. nov., sp. nov: A novel bacterium isolated from the female genital tract. *Anaerobe*. 2015;32:37–42.

X - ANEXOS

ANEXO 1. HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE**Estudio clínico de intervención para la evaluación del efecto de la ingesta de la cepa *L. rhamnosus* CECT 8800 sobre la microbiota vaginal**

Promotor: Biopolis S.L.

Centro: Hospital Universitario de Torrevieja

Investigador Principal: Melanie Cristine Alonzo Martínez

Versión: 02-25/07/2018

1. INTRODUCCIÓN

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio clínico en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación con Medicamentos y Productos Sanitarios (CEIm) de Torrevieja-Vinalopó, y sigue toda la normativa contemplada por la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica.

Nuestra intención es tan sólo que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello, lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

2. PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede decidir no participar y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

3. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

En este estudio se va a evaluar el efecto que produce un producto probiótico por vía oral sobre la microbiota vaginal. Al incluirla en el estudio recibirá al azar

el producto a estudio o un producto placebo. Ni el médico, ni usted, sabrán durante el estudio cual es el tratamiento que va a recibir, pues ambos tienen la misma apariencia. Además, ambos productos están fabricados en una empresa farmacéutica con autorización para la preparación de este producto.

El producto placebo estará basado en la sustancia maltodextrina, que se usa de manera rutinaria en estudios como el que vamos a realizar. Esta sustancia no posee propiedades curativas ni nocivas a la dosis que se va a usar durante el estudio. La apariencia y sabor del placebo y la sustancia a probar serán similares.

El periodo de tratamiento es de 4 semanas, y deberá acudir a la consulta de nuevo tras finalizar el tratamiento. Se dará la posibilidad de realizar una visita control a las 2 semanas del comienzo del tratamiento. En cada consulta, el investigador le tomará una muestra de mucosa vaginal, a fin de estudiar su microbiota.

La asignación al tratamiento se hará al azar y las probabilidades de recibir el producto a estudio son del 50% ya que 40 pacientes recibirán el producto y 40 recibirán el placebo durante el estudio.

No es de esperar ningún efecto nocivo por parte del producto a estudio y del placebo, pero por si ello ocurriera se le pide que notifique cualquier efecto adverso que ocurra durante su participación en el estudio, independientemente de que piense puede estar o no relacionado con las sustancias usadas en el estudio.

4. BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

El probiótico a administrar, al igual que otros probióticos, no tienen prácticamente ningún efecto secundario, solo en algunas ocasiones los sujetos/pacientes que lo tomado se han quejado de “malestar” abdominal sin otros efectos, y por lo general, solo de manera excepcional lo han tenido que dejar de tomar por este motivo.

5. TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS

Se le hace saber que, en caso de no participar en el estudio, usted recibirá el mismo trato y tratamiento que si lo hiciera. Una vez comercializado el producto a estudio, en caso de que su médico lo crea necesario, se utilizará, pero fuera del estudio clínico que aquí se le ofrece para participar. En este punto su médico le dará toda la información que desee sobre el producto.

6. SEGURO

El promotor del estudio tiene contratada una Póliza de Seguros de Responsabilidad Civil que cubre los daños y perjuicios que como consecuencia del estudio clínico pudieran resultar para la persona en que hubiere de realizarse, cubriendo, asimismo, la responsabilidad del promotor del estudio clínico, del investigador principal y sus colaboradores y del titular de los centros en que se realice el estudio clínico bajo su tutela, en los términos establecidos en el Real Decreto 1090/2015 del 4 de diciembre, y la Ley 14/2007 de 3 de julio de Investigación Biomédica. La póliza se ajusta en sus límites, garantías, cobertura, etc., a todo lo dispuesto en el citado Real Decreto 1090/2015 y la Ley 29/2006 de 26 de julio de garantías y uso racional de los medicamentos y a la normativa vigente en materia de seguros en España.

7. CONFIDENCIALIDAD

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de abril de 2016, de Protección de Datos de Carácter Personal. De acuerdo con lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio. Además, también puede limitar el tratamiento de datos que sean incorrectos, solicitar una copia o que se trasladen a un tercero (portabilidad) los datos que usted ha facilitado para el estudio. Para ejercitar sus derechos, diríjase al investigador principal del estudio.

Sin embargo, le recordamos que los datos aportados no se pueden eliminar, aunque deje de participar en el estudio para garantizar la validez de la investigación y cumplir con los deberes legales y los requisitos de autorización

de medicamentos. Así mismo tiene derecho a dirigirse a la Agencia de Protección de Datos si no quedara satisfecho.

Tanto el Centro como el Promotor son responsables del tratamiento de sus datos y se comprometen a cumplir con la normativa de protección de datos en vigor. Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código, de manera que no se incluya información que pueda identificarle, y sólo su médico del estudio/colaboradores podrá relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a ninguna otra persona salvo a las autoridades sanitarias, cuando así lo requieran o en casos de urgencia médica. Los Comités de Ética de la Investigación, los representantes de la Autoridad Sanitaria en materia de inspección y el personal autorizado por el Promotor, únicamente podrán acceder para comprobar los datos personales, los procedimientos del estudio clínico y el cumplimiento de las normas de buena práctica clínica (siempre manteniendo la confidencialidad de la información).

El Investigador y el Promotor están obligados a conservar los datos recogidos para el estudio al menos hasta 25 años tras su finalización. Posteriormente, su información personal solo se conservará por el Centro para el cuidado de su salud y por el Promotor para otros fines de investigación científica si usted hubiera otorgado su consentimiento para ello, y si así lo permite la ley y requisitos éticos aplicables.

Si realizáramos transferencia de sus datos codificados fuera de la UE a las entidades de nuestro grupo, a prestadores de servicios o a investigadores científicos que colaboren con nosotros, los datos del participante quedarán protegidos con salvaguardas tales como contratos u otros mecanismos por las autoridades de protección de datos.

8. COMPENSACIÓN ECONÓMICA

El promotor del estudio es el responsable de gestionar la financiación del estudio. Para la realización del estudio el promotor del mismo ha firmado un contrato con el centro donde se va a realizar y con el médico del estudio.

Su participación en el estudio no le supondrá ningún gasto y le serán reintegrados los gastos extraordinarios como comidas y traslados previa presentación de *ticket* acreditativo del gasto.

9. OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE

Cualquier nueva información referente a los productos utilizados en el estudio y que pueda afectar a su disposición para participar en el estudio, que se descubra durante su participación, le será comunicada por su médico lo antes posible.

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadido a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

También debe saber que puede ser excluido del estudio si el promotor los investigadores del estudio lo consideran oportuno, ya sea por motivos de seguridad, por cualquier acontecimiento adverso que se produzca por la medicación en estudio o porque consideren que no está cumpliendo con los procedimientos establecidos.

En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo que ha ocasionado su retirada del estudio. Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio explicados. Cuando acabe su participación recibirá el mejor tratamiento disponible y que su médico considere el más adecuado, pero es posible que no se le pueda seguir administrando la medicación del estudio.

PARA MÁS INFORMACIÓN

Si tiene alguna pregunta o inquietud sobre el estudio o sobre el tratamiento con el medicamento del estudio, sobre sus derechos o sobre las posibles consecuencias negativas relacionadas con el estudio, póngase en contacto con

Investigador: Dra. Melanie Cristine Alonzo Martínez

Número de teléfono: _____

ANEXO 2. CONSENTIMIENTO INFORMADO**Estudio clínico de intervención para la evaluación del efecto de ingesta de la cepa *L. rhamnosus* CECT 8800 sobre la microbiota vaginal****Promotor:** Biopolis S.L.**Centro:** Hospital Universitario de Torrevieja**Investigador Principal:** Melanie Cristine Alonzo Martínez**Versión:** 01-08/06/2018

Yo, Dña., con DNI
.....

He sido informado sobre el estudio arriba indicado
por el investigador
.....

Declaro que:

- Se me ha propuesto participar.
- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio y mi participación.
- He recibido suficiente información, se me ha respondido convenientemente y lo he entendido.

Comprendo que:

- Mi participación es voluntaria.
- Puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.

Así, presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

Accedo a que las muestras obtenidas para el estudio puedan ser utilizadas en el futuro para nuevos análisis relacionados no previstos en el protocolo actual (quedando excluidos los análisis genéticos, siempre y cuando no formen parte de los objetivos del estudio):

SÍ NO

En....., a de de

Paciente

Investigador

(Nombre y firma)

(Nombre y firma)

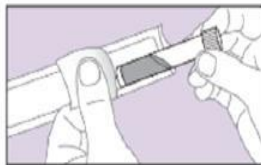
Fdo.:

Fdo.:

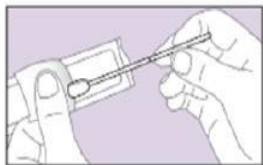
Este documento debe ser cumplimentado y firmado por duplicado. Una de las copias debe permanecer en posesión del paciente, y la otra quedará bajo custodia del investigador.

ANEXO 3. PROCEDIMIENTO DE TOMA DE MUESTRA VAGINAL

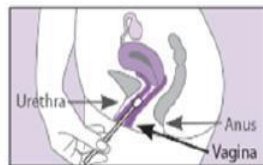
Para la toma de muestra vaginal se emplea el kit OMNIgene•VAGINAL (OMR-130, DNA Genotek), siguiendo las instrucciones del fabricante¹⁹⁸:



1. Eliminar el envoltorio del tubo de colección y colocar el tubo en una superficie limpia.



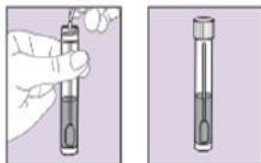
2. Extraer el hisopo de su envase. Sostenerlo por la zona de sujeción, no tocarlo por encima del punto de ruptura.



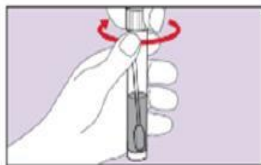
3. Separar suavemente los labios vulvares e introducir el hisopo en la vagina (de 3 a 5 cm). No curvarlo durante la toma de la muestra.



4. Mover el hisopo en círculos completos a lo largo de las paredes vaginales durante 20 segundos. Asegurarse de que todo el extremo del hisopo se impregna de muestra. Extraer cuidadosamente el hisopo de la vagina.



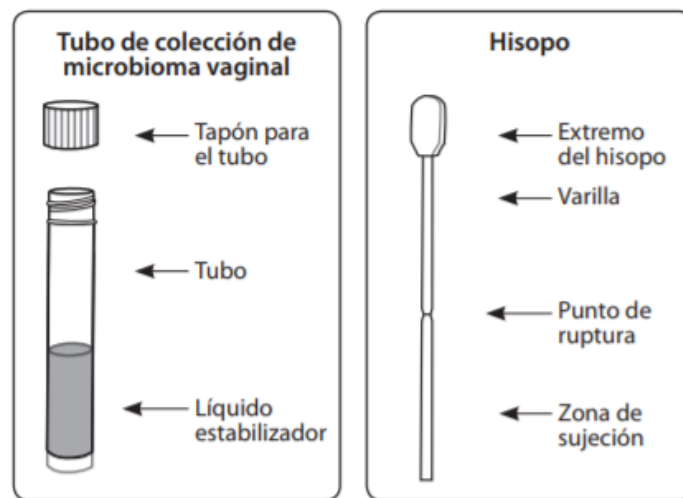
5. Inmediatamente introducir el hisopo en el tubo que contiene el líquido estabilizador y romperlo por el punto de ruptura. La punta del hisopo debe permanecer en el tubo con el líquido.



6. Tapar el tubo y preservarlo en refrigeración a -30°C.

ACLARACIONES

- No deben recolectarse muestras durante el período menstrual.
- Es normal y no debe ser motivo de preocupación si observa una descarga leve o sangre en el hisopo después de la recolección.



ANEXO 4. CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

Protocolo: **MV-PROB**
CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

**Estudio clínico de intervención para la
evaluación del efecto de la ingesta de la cepa *L.
rhamnosus* CECT 8800 sobre la microbiota
vaginal**

Protocolo: *MV-PROB*
Versión: *02-30/07/2018*

| | |
|-----------------------|--|
| Nº Paciente | |
| Código | |
| Centro | |
| Fecha de inicio | |
| Fecha de finalización | |

CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS**INFORMACIÓN CONFIDENCIAL**

Protocolo: **MV-PROB**
CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS

ESQUEMA DEL ESTUDIO

| Visita | 0/1 | 2* | 3 |
|----------------------------------------|-----|----|---|
| Semana | 0 | 2 | 4 |
| Hoja de información al paciente | X | | |
| Firma del consentimiento informado | X | | |
| Criterios de inclusión y exclusión | X | | |
| Aleatorización | X | | |
| Entrega del producto | X | | |
| Historia clínica del paciente | X | | |
| Tratamiento farmacológico del paciente | X | | |
| Toma de muestra vaginal | X | X | X |
| Acontecimientos adversos | | | X |
| Recuento del producto sobrante | | | X |

**Visita opcional para la paciente*

VISITA 1

VISITA 1**CRITERIOS DE INCLUSIÓN**

| | SÍ | NO |
|------------------------------------------------------------------|----|----|
| Mujeres en edad fértil (de una edad igual o superior a 30 años). | | |
| Mujeres sin diagnóstico clínico de vaginosis. | | |

Para la selección de este paciente TODAS estas respuestas deben ser
AFIRMATIVAS

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

| | SÍ | NO |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|----|
| Mujeres embarazadas, en periodo de lactancia o que no se comprometan a utilizar un método anticonceptivo de barrera. | | |
| Uso de espermicidas, dispositivos intrauterinos como métodos anticonceptivos o anticonceptivos orales. | | |
| Consumo de antibióticos durante el estudio y en las dos semanas previas al comienzo del mismo. | | |
| Contraindicación para la toma del producto o alguno de sus excipientes. | | |
| Consumo de probióticos, por vía oral o vaginal, en los dos meses anteriores al comienzo del estudio. | | |

Para la selección de este paciente TODAS estas respuestas deben ser
NEGATIVAS

VISITA 1
MUESTRA MICROBIOTA VAGINAL

- En la visita:

Se ha tomado la muestra: SI
NO

- Tras el análisis:

| | |
|------------|--|
| VAGINOTIPO | |
|------------|--|

| | |
|---------------------------------------------------|-----------------|
| Detección de <i>L. rhamnosus</i> CECT 8800 | |
| <input type="checkbox"/> | SÍ. Valor:..... |
| <input type="checkbox"/> | NO |

| Patógenos | | |
|---------------------------------|---|-------|
| Especie | X | Valor |
| <i>Gardnerella vaginali</i> | | |
| <i>Atopobium vaginae</i> | | |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | | |
| <i>Propionibacterium acnes</i> | | |

ALEATORIZACIÓN

Tratamiento asignado

| |
|--|
| |
|--|

COMIENZO DEL TRATAMIENTO

| | SÍ | NO |
|---------------------------------------------------------|----|----|
| El paciente cumple los criterios de inclusión/exclusión | | |
| Entrega del producto | | |
| Explicación de la conservación y consumo del producto | | |

Fecha de inicio del tratamiento:

____/____/____

VISITA 2

() Visita opcional para la paciente*

¿La paciente acepta una visita control opcional para toma de muestra vaginal?

- Sí
- NO

VISITA 2 (Opcional)

MUESTRA MICROBIOTA VAGINAL○ **En la visita**

Se ha tomado la muestra:

 SÍ NO○ **Tras el análisis**

| | |
|------------|--|
| VAGINOTIPO | |
|------------|--|

| | |
|--------------------------------------------|-----------------|
| Detección de <i>L. rhamnosus</i> CECT 8800 | |
| <input type="checkbox"/> | SÍ. Valor:..... |
| <input type="checkbox"/> | NO |

| Patógenos | | |
|---------------------------------|---|-------|
| Especie | X | Valor |
| <i>Gardnerella vaginali</i> | | |
| <i>Atopobium vaginae</i> | | |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | | |
| <i>Propionibacterium acnes</i> | | |

VISITA 3

VISITA 3

MUESTRA MICROBIOTA VAGINAL

○ **En la visita**

Se ha tomado la muestra:

SÍ

NO

○ **Tras el análisis**

| | |
|------------|--|
| VAGINOTIPO | |
|------------|--|

| | |
|--------------------------------------------|--|
| Detección de <i>L. rhamnosus</i> CECT 8800 | |
| <input type="checkbox"/> SÍ. Valor:..... | |
| <input type="checkbox"/> NO | |

| Patógenos | | |
|---------------------------------|---|-------|
| Especie | X | Valor |
| <i>Gardnerella vaginali</i> | | |
| <i>Atopobium vaginae</i> | | |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> | | |
| <i>Propionibacterium acnes</i> | | |

VISITA 3**ACONTECIMIENTOS ADVERSOS**

| Descripción | Fecha | Tratamiento | Atribuible |
|--------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------|
| | Inicio: Final: | Dosis: Fechas: | SI NO |
| | Inicio: Final: | Dosis: Fechas: | SI NO |
| | Inicio: Final: | Dosis: Fechas: | SI NO |
| | Inicio: Final: | Dosis: Fechas: | SI NO |
| | Inicio: Final: | Dosis: Fechas: | SI NO |

DEVOLUCIÓN DEL TRATAMIENTO

| | |
|------------------------------|--|
| Nº CÁPSULAS DEVUELTAS | |
|------------------------------|--|

FINALIZACIÓN DEL ESTUDIO

¿Ha completado la voluntaria el estudio?

| | |
|----|----|
| SI | NO |
| | |

(Marcar con una cruz donde proceda)

En el caso de NO haber completado el estudio, anotar las causas:

| CAUSA DE ABANDONO |
|-------------------|
| |

FECHA DE FINALIZACIÓN DEL ESTUDIO _____

El investigador certifica que ha examinado cada página de este cuaderno y que la información contenida es una reproducción completa y veraz de los datos del sujeto, que el estudio se ha realizado de acuerdo con el protocolo, y que antes de empezar el estudio se consiguió el consentimiento informado del paciente por escrito.

EL INVESTIGADOR

Nombre y firma

Fdo.:

ANEXO 5. Base de datos de todas las pacientes de la muestra. Se hace referencia al número asignado a la paciente, número de Visita, Vaginitipo, grupo de Tratamiento (1=probiótico, 2=placebo), detección de *L. rhamnosus* y de los patógenos estudiados.

| Nº | Visita | Vaginitipo | T | L. <i>rhamnosus</i> | PATÓGENOS | | | |
|----|--------|-------------------------|---|------------------------|------------------------|----------------------|-------------------------|--------------------|
| | | | | | G. <i>vaginalis</i> | A. <i>vaginae</i> | S. <i>agalactiae</i> | P. <i>acnes</i> |
| 1 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 1 | 0,011 | 7,68 | 2,616 | 0 | 0,059 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0 | 5,501 | 0,363 | 0 | 0,006 |
| 2 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 1 | 0,002 | 2,62 | 1,17 | 0 | 0 |
| | V3 | <i>I (L. crispatus)</i> | | 0,001 | 2,765 | 0,011 | 0 | 0 |
| 3 | V1 | III (<i>L. iners</i>) | 2 | 0 | 0,177 | 0,022 | 0 | 0 |
| | V2 | - | | 0 | 0,023 | 0,005 | 0,001 | 0 |
| | V3 | III (<i>L. iners</i>) | | 0 | 0,061 | 0,003 | 0 | 0 |
| 4 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 2 | 0 | 0,392 | 0,088 | 0 | 0,001 |
| | V3 | <i>I (L. crispatus)</i> | | 0 | 3,377 | 0,005 | 0,002 | 0 |
| 5 | V1 | IV (Diversity group) | 1 | 0 | 35,363 | 4,473 | 0 | 0 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0,02 | 44,565 | 3,337 | 0,001 | 0,001 |
| 6 | V1 | IV (Diversity group) | 2 | 0 | 16,848 | 6,173 | 0 | 0 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0 | 14,627 | 5,36 | 0,001 | 0 |
| 7 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 2 | 0,021 | 0,623 | 0,023 | 0 | 0 |
| | V3 | <i>I (L. crispatus)</i> | | 0 | 0,005 | 0,003 | 0,001 | 0,002 |
| 8 | V1 | III (<i>L. iners</i>) | 1 | 0,013 | 2,559 | 0,733 | 0,041 | 0 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0,035 | 43,021 | 45,601 | 0 | 0,001 |
| 9 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 1 | 0,005 | 0,287 | 0,022 | 0,011 | 0 |
| | V3 | III (<i>L. iners</i>) | | 0 | 0,013 | 0,003 | 0,003 | 0 |
| 10 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 2 | 0,004 | 0,923 | 0,254 | 0,004 | 0,002 |
| | V3 | <i>I (L. crispatus)</i> | | 0 | 0,008 | 0,005 | 0,001 | 0,001 |
| 11 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 1 | 0,008 | 1,501 | 0,181 | 0,002 | 0,008 |
| | V3 | III (<i>L. iners</i>) | | 0,012 | 2,167 | 0,004 | 0,001 | 0 |
| 12 | V1 | <i>V (L. jensenii)</i> | 2 | 0,002 | 0,523 | 0,052 | 0 | 0,018 |
| | V3 | <i>V (L. jensenii)</i> | | 0,002 | 0,012 | 0,004 | 28,682 | 0 |
| 13 | V1 | III (<i>L. iners</i>) | / | - | - | - | - | - |
| | V3 | III (<i>L. iners</i>) | | 0,001 | 0,007 | 0,005 | 0 | 0,007 |
| 14 | V1 | - | / | 0 | 20,912 | 5,972 | 0,002 | 0 |
| | V3 | - | | - | - | - | - | - |
| 15 | V1 | <i>V (L. jensenii)</i> | 2 | 0,003 | 4,052 | 0,475 | 0,003 | 0,003 |
| | V3 | <i>V (L. jensenii)</i> | | 0,007 | 0,019 | 0,003 | 0,001 | 0,001 |

| | | | | | | | | |
|----|----|---------------------------|---|-------|--------|-------|-------|-------|
| 16 | V1 | III (<i>L. iners</i>) | / | 0 | 0,086 | 0,013 | 0 | 0 |
| | V3 | III (<i>L. iners</i>) | | - | - | - | - | - |
| 17 | V1 | I (<i>L. crispatus</i>) | 1 | 0 | 0,574 | 0,093 | 0 | 0,004 |
| | V3 | I (<i>L. crispatus</i>) | | 0 | 0,346 | 0,105 | 0,003 | 0 |
| 18 | V1 | IV (Diversity group) | 2 | 0,017 | 1,557 | 3,881 | 0 | 0 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0,005 | 0,079 | 0,005 | 0 | 0 |
| 19 | V1 | I (<i>L. crispatus</i>) | 2 | 0 | 0,02 | 0,01 | 0 | 0 |
| | V3 | III (<i>L. iners</i>) | | 0 | 0,166 | 0,03 | 0 | 0,03 |
| 20 | V1 | I (<i>L. crispatus</i>) | 1 | 0 | 0,042 | 0,002 | 0 | 0,007 |
| | V3 | I (<i>L. crispatus</i>) | | 0,002 | 2,053 | 0,821 | 0 | 0 |
| 21 | V1 | I (<i>L. crispatus</i>) | 1 | 0 | 0,028 | 0 | 0 | 0,002 |
| | V3 | I (<i>L. crispatus</i>) | | 0,002 | 0,12 | 0,051 | 0 | 0 |
| 22 | V1 | III (<i>L. iners</i>) | 2 | 0 | 0,047 | 0,014 | 0 | 0,004 |
| | V2 | - | | 0,002 | 0,002 | 0 | 0 | 0,004 |
| | V3 | III (<i>L. iners</i>) | | 0,001 | 33,158 | 0,007 | 0 | 0 |
| 23 | V1 | I (<i>L. crispatus</i>) | 1 | 0 | 0,023 | 0,002 | 0 | 0,002 |
| | V2 | - | | 0,002 | 0,01 | 0,003 | 0 | 0,011 |
| | V3 | III (<i>L. iners</i>) | | 0,006 | 0,69 | 0,104 | 0 | 0,001 |
| 24 | V1 | I (<i>L. crispatus</i>) | 2 | 0,002 | 0,292 | 0,111 | 0 | 0 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0,016 | 29,74 | 0,007 | 0 | 0 |
| 25 | V1 | IV (Diversity group) | 1 | 0,966 | 42,834 | 0,006 | 0 | 0 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0,479 | 42,763 | 0,011 | 0 | 0 |
| 26 | V1 | I (<i>L. crispatus</i>) | / | 0 | 3,329 | 0,232 | 0 | 0,018 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0 | 54,219 | 0,061 | 0,004 | 0,004 |
| 27 | V1 | III (<i>L. iners</i>) | 2 | 0 | 0,008 | 0,002 | 0 | 0,003 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0,002 | 3,561 | 1,395 | 0 | 0 |
| 28 | V1 | III (<i>L. iners</i>) | 2 | 0 | 1,135 | 0,114 | 0,061 | 0 |
| | V3 | III (<i>L. iners</i>) | | 0 | 1,088 | 0,971 | 0,003 | 0,02 |
| 29 | V1 | I (<i>L. crispatus</i>) | 1 | 0,007 | 0,024 | 0,004 | 0 | 0,001 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0,002 | 0,1 | 0,217 | 0 | 0 |
| 30 | V1 | III (<i>L. iners</i>) | 2 | 0 | 5,819 | 0,002 | 0,001 | 0 |
| | V3 | III (<i>L. iners</i>) | | 0,003 | 0,242 | 0,023 | 0 | 0 |
| 31 | V1 | I (<i>L. crispatus</i>) | 2 | 0 | 0,288 | 0,098 | 0 | 0 |
| | V3 | I (<i>L. crispatus</i>) | | 0,027 | 0,021 | 0,006 | 0 | 0 |
| 32 | V1 | III (<i>L. iners</i>) | 1 | 0,001 | 0,015 | 0,002 | 0 | 0,001 |
| | V3 | III (<i>L. iners</i>) | | 0,001 | 0,056 | 0,02 | 0,032 | 0,011 |
| 33 | V1 | IV (Diversity group) | 1 | 0 | 27,528 | 8,849 | 0 | 0 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0,006 | 17,297 | 9,326 | 0 | 0 |
| 34 | V1 | - | / | 0,001 | 16,759 | 8,034 | 0 | 0 |

| | | | | | | | | |
|----|----|-------------------------|---|-------|--------|--------|--------|-------|
| | V2 | - | | 0,013 | 28,214 | 12,867 | 0 | 0 |
| | V3 | - | | - | - | - | - | - |
| 35 | V1 | IV (Diversity group) | 1 | 0,001 | 0,024 | 0,008 | 10,598 | 0,003 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0,003 | 0,081 | 0,049 | 0,291 | 0,005 |
| 36 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 2 | 0,031 | 0,017 | 0,002 | 0,002 | 0,024 |
| | V3 | <i>I (L. crispatus)</i> | | 0,002 | 0,976 | 0,393 | 0 | 0,004 |
| 37 | V1 | IV (Diversity group) | 1 | 0,042 | 20,934 | 7,295 | 0,001 | 0 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0,009 | 17,875 | 4,659 | 0 | 0,002 |
| 38 | V1 | IV (Diversity group) | 1 | - | - | - | - | - |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0 | 17,736 | 8,663 | 0 | 0 |
| 39 | V1 | <i>III (L. iners)</i> | 2 | - | - | - | - | - |
| | V3 | <i>III (L. iners)</i> | | 0,002 | 0,569 | 0,011 | 0 | 0 |
| 40 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 2 | 0 | 0,007 | 0,002 | 0 | 0,008 |
| | V3 | <i>III (L. iners)</i> | | 0 | 0,065 | 0,02 | 0 | 0,013 |
| 41 | V1 | <i>III (L. iners)</i> | 1 | 0 | 0,006 | 0,001 | 0 | 0 |
| | V3 | <i>III (L. iners)</i> | | 0 | 5,024 | 2,488 | 0 | 0,014 |
| 42 | V1 | <i>III (L. iners)</i> | 1 | 0 | 0,007 | 0,002 | 0 | 0 |
| | V3 | <i>III (L. iners)</i> | | 0 | 2,504 | 0,851 | 0 | 0,005 |
| 43 | V1 | <i>III (L. iners)</i> | 2 | 0,001 | 0,203 | 0,004 | 0 | 0 |
| | V3 | <i>III (L. iners)</i> | | 0 | 27,619 | 0,013 | 0 | 0 |
| 44 | V1 | IV (Diversity group) | 2 | 0,001 | 2,154 | 9,466 | 0 | 0 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0 | 3,449 | 7,901 | 0 | 0 |
| 45 | V1 | <i>III (L. iners)</i> | 1 | 0,081 | 0,006 | 0,002 | 0,001 | 0,002 |
| | V3 | <i>III (L. iners)</i> | | 0,029 | 0,309 | 0,012 | 0 | 0,002 |
| 46 | V1 | <i>III (L. iners)</i> | 1 | 0,032 | 0,014 | 0,004 | 0 | 0,002 |
| | V3 | <i>III (L. iners)</i> | | 0,01 | 0,22 | 0,019 | 0 | 0,092 |
| 47 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 2 | 0 | 0,792 | 0,002 | 0,001 | 0 |
| | V3 | <i>III (L. iners)</i> | | 0,002 | 0,077 | 0,007 | 0 | 0,023 |
| 48 | V1 | <i>III (L. iners)</i> | 1 | 0 | 15,428 | 4,792 | 0,004 | 0 |
| | V3 | <i>III (L. iners)</i> | | 0 | 24,119 | 11,879 | 0 | 0 |
| 49 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 2 | 0,003 | 1,317 | 0,003 | 0,001 | 0 |
| | V3 | <i>I (L. crispatus)</i> | | 0,002 | 2,771 | 0,215 | 0 | 0,002 |
| 50 | V1 | <i>III (L. iners)</i> | 1 | 0,006 | 2,928 | 0,002 | 0 | 0 |
| | V3 | <i>III (L. iners)</i> | | 0 | 11,513 | 0,012 | 0 | 0,013 |
| 51 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 1 | 0,003 | 2,151 | 0,107 | 0 | 0,012 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0,013 | 4,94 | 0,64 | 0 | 0,145 |
| 52 | V1 | IV (Diversity group) | 2 | 0 | 8,957 | 9,858 | 0 | 0 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0,001 | 9,704 | 12,838 | 0 | 0 |
| 53 | V1 | IV (Diversity group) | 2 | 0 | 9,196 | 9,711 | 0 | 0 |

| | | | | | | | | |
|----|----|-------------------------|---|-------|--------|--------|-------|-------|
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0,002 | 17,595 | 9,961 | 0 | 0 |
| 54 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | | 0,013 | 0,098 | 0,019 | 0 | 0,004 |
| | V3 | <i>I (L. crispatus)</i> | 1 | 0,005 | 0,461 | 0,04 | 0 | 0,007 |
| 55 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 2 | 0 | 0,568 | 0,021 | 0 | 0,003 |
| | V3 | <i>I (L. crispatus)</i> | | 0 | 5,265 | 0,045 | 0,004 | 0 |
| 56 | V1 | IV (Diversity group) | 2 | 0 | 0,079 | 0,015 | 18,63 | 0 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0,028 | 93,9 | 0,054 | 0,01 | 0,008 |
| 57 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 1 | 0 | 0,109 | 0,02 | 0,002 | 0,009 |
| | V3 | <i>III (L. iners)</i> | | 0,002 | 0,044 | 0,01 | 0,014 | 0,016 |
| 58 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 1 | 0 | 16,785 | 9,519 | 0,003 | 0 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0 | 0,137 | 0,014 | 0,006 | 0 |
| 59 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 2 | 0,01 | 0,669 | 0,039 | 0,004 | 0,01 |
| | V3 | <i>III (L. iners)</i> | | 0,001 | 0,366 | 0,04 | 0 | 0 |
| 60 | V1 | <i>III (L. iners)</i> | 1 | 0,006 | 5,864 | 1,305 | 0,003 | 0 |
| | V3 | <i>III (L. iners)</i> | | 0,01 | 0,073 | 0,007 | 0,007 | 0,001 |
| 61 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 2 | 0 | 14,434 | 15,194 | 0,003 | 0 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0,002 | 0,036 | 0,016 | 0 | 0 |
| 62 | V1 | IV (Diversity group) | 1 | 0 | 19,81 | 4,779 | 0 | 0 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0 | 21 | 13,066 | 0 | 0 |
| 63 | V1 | <i>III (L. iners)</i> | 1 | 0,002 | 0,155 | 0,011 | 0 | 0,002 |
| | V3 | <i>III (L. iners)</i> | | 0 | 1,669 | 0,226 | 0 | 0,006 |
| 64 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 2 | 0,002 | 0,005 | 0 | 0,002 | 0,005 |
| | V3 | <i>I (L. crispatus)</i> | | 0 | 0,02 | 0,009 | 0 | 0,005 |
| 65 | V1 | <i>II (L. gasseri)</i> | 2 | 0,005 | 12,988 | 0,024 | 0 | 0,003 |
| | V3 | <i>II (L. gasseri)</i> | | 0,043 | 0,441 | 0,122 | 0 | 0,038 |
| 66 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 1 | 0 | 3,277 | 0,817 | 0 | 0 |
| | V3 | <i>I (L. crispatus)</i> | | 0 | 0,675 | 0,089 | 0 | 0 |
| 67 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 2 | 0,006 | 2,378 | 0,039 | 0,002 | 0,018 |
| | V3 | <i>I (L. crispatus)</i> | | 0,012 | 2,472 | 0 | 0 | 0,014 |
| 68 | V1 | IV (Diversity group) | 2 | 0 | 0,028 | 0,005 | 0,002 | 0 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0,012 | 0,041 | 0,007 | 0 | 0 |
| 69 | V1 | IV (Diversity group) | 1 | 0,004 | 17,947 | 21,306 | 0 | 0 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0,005 | 22,094 | 6,398 | 0 | 0 |
| 70 | V1 | IV (Diversity group) | 1 | 0,036 | 0,048 | 30,358 | 0 | 0 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0,03 | 0,051 | 13,328 | 0 | 0 |
| 71 | V1 | - | / | 0,031 | 0,612 | 0,007 | 0 | 0,01 |
| | V3 | - | | - | - | - | - | - |
| 72 | V1 | <i>III (L. iners)</i> | 1 | 0,04 | 5,299 | 0,027 | 0 | 0 |
| | V3 | <i>III (L. iners)</i> | | 0,054 | 0,852 | 0,054 | 0 | 0 |

| | | | | | | | | |
|----|----|-------------------------|---|--------|--------|--------|-------|-------|
| 73 | V1 | - | / | 0,015 | 20,743 | 13,72 | 0 | 0 |
| | V3 | - | | - | - | - | - | - |
| 74 | V1 | IV (Diversity group) | 1 | 38,974 | 57,63 | 0,179 | 0 | 0 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 36,838 | 59,04 | 0,038 | 0 | 0,003 |
| 75 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 1 | 0,026 | 0,276 | 0,121 | 0,002 | 0 |
| | V3 | <i>I (L. crispatus)</i> | | 0,002 | 0,069 | 0,016 | 0 | 0 |
| 76 | V1 | <i>III (L. iners)</i> | 2 | 0 | 1,263 | 0,126 | 0,002 | 0 |
| | V3 | <i>III (L. iners)</i> | | 0 | 0,059 | 0,011 | 0 | 0 |
| 77 | V1 | <i>II (L. gasseri)</i> | 2 | 0 | 0,081 | 0,021 | 0,005 | 0,021 |
| | V3 | <i>II (L. gasseri)</i> | | 0 | 0,768 | 0,13 | 0,066 | 0,013 |
| 78 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 1 | 0,004 | 16,859 | 0,1 | 0 | 0 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0,004 | 5,772 | 9,891 | 0 | 0 |
| 79 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 2 | 0,003 | 1,08 | 0,107 | 0 | 0 |
| | V3 | <i>I (L. crispatus)</i> | | 0 | 0,544 | 0,014 | 0 | 0 |
| 80 | V1 | <i>I (L. crispatus)</i> | 2 | 0 | 5,058 | 0,202 | 0 | 0,006 |
| | V3 | IV (Diversity group) | | 0,011 | 25,219 | 15,914 | 0 | 0 |

ANEXO 6. DICTÁMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA CON MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS DE LOS HOSPITALES UNIVERSITARIOS DE TORREVIEJA Y VINALOPÓ (CEIm).

DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

D. Alejandro Jover Botella, Jefe de la Secretaría Técnica y D. Eduardo Cazorla Amorós, Presidente del Comité Ético de Investigación con Medicamentos Torrevieja-Vinalopó

CERTIFICAN

Que este CEIm, en su reunión de fecha 26 septiembre de 2018 ha revisado la documentación aportada por el Promotor del estudio:

Título completo del estudio: "Estudio Clínico de Intervención para la evaluación del efecto de ingesta de la cepa *L. rhamnosus* CECT 8800 sobre la microbiota vaginal".

Nº EudraCT: No aplica

Código del protocolo: MV-PROB

Protocolo versión y fecha: v 2 de 30 de julio de 2018

Hoja de Información al Paciente Versión: 2.0 de 25-07-2018

Consentimiento Informado Versión: 1.0 de 08-06-2018

Nombre del promotor: Biopolis S.L.

Investigador Principal: Dr. Melanie Cristine Alonzo Martínez

Servicio de Obstetricia y Ginecología

Hospital Universitario de Torrevieja

Y teniendo en consideración las siguientes cuestiones:

1. Cuestiones relacionadas con la idoneidad del investigador y de sus colaboradores
2. Cuestiones relacionadas con la idoneidad de las instalaciones
3. Cuestiones relacionadas con las cantidades y, en su caso, previsiones de remuneración o compensación para los investigadores y sujetos del ensayo y los aspectos relevantes de cualquier acuerdo entre el promotor y el centro.
4. Consideraciones generales del ensayo

Se decide **EMITIR INFORME FAVORABLE**.

A modo de informativo, se detalla la siguiente observación:

“La evaluación es favorable, aunque se formulan observaciones sobre los métodos anticonceptivos orales que se incluyen en la V. 2 de 30 de julio de 2018 como criterio de exclusión de las participantes. Más concretamente, no se fomentará entre las pacientes el cambio de método anticonceptivo (de ACOS a métodos de barrera) con la intención de incluirlas en el estudio; simplemente incluir a aquellas que ya estén utilizando este método.”

Que el comité tanto en su composición como en sus PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95); con el RD 1090/2015 así como la normativa autonómica en materia de investigación aplicable de la Comunitat Valenciana; y su composición actual es la siguiente:

- **Presidente:** Eduardo Cazorla Amorós, Jefe de Servicio Obstetricia y Ginecología HU Torrevieja HU Vinalopó
- **Vicepresidenta:** Simona Mas Antón; Jefa Pediatría HU Torrevieja HU Vinalopó
- **Secretaría Técnica:** Alejandro Jover Botella; Jefe Servicio de Farmacia HU Vinalopó
- Konrad Schargel Palacios; Adjunto Servicio Oftalmología HU Torrevieja
- Noemí Pérez Prior; Farmacéutica Atención Primaria HU Torrevieja
- Carmen Tristán Antona; Especialista en Farmacología clínica Jefa de Servicio de Prevención SG Promoción de la Salud y Vigilancia en Salud Pública
- María Almendro Candel; Médico de Familia Dpto. de Salud del Vinalopó
- José V. Tuells Hernández; Facultativo Servicio Medicina Preventiva HU Torrevieja HU Vinalopó
- Julio Cesar Blázquez Encinar; Jefe Servicio Medicina Interna HU Torrevieja. Miembro de la Comisión de Investigación.
- Andrés Tomás Gómez; Jefe Servicio Cirugía general y Digestiva HU Torrevieja
- María Marín Palazón; Adjunta Servicio Obstetricia y Ginecología HU Torrevieja
- Javier López Solís; Diplomado en Enfermería HU Torrevieja
- Carlos Marqués Espí; Licenciado en Derecho. HU Torrevieja HU Vinalopó. Miembro del Comité de Bioética.
- Joaquín Quiles; Miembro Lego no vinculado laboralmente a los centros

Que en dicha reunión del Comité Ético de Investigación Clínica se cumplió el quórum preceptivo legalmente.

Que en el caso de evaluación de algún estudio del que algún integrante del equipo investigador forme parte de este CEIm, este se ausentará durante la deliberación y votación del mismo.

En Elche, a

4

de

octubre

2018



Eduardo Cazorla Amorós



Alejandro Jover Botella