

# Nuevos biomarcadores asociados a alteraciones en el microbioma intestinal que impactan en el resultado reproductivo

## *New biomarkers associated with alterations in the gut microbiome that impact outcomereproductive*

María A. Azpiroz<sup>1</sup>, Soledada Mayol<sup>1</sup>, Lucila Orguilla<sup>1,2</sup>, Maripaz Jimenez Guerrero<sup>1</sup>, Alejandro Malpartida<sup>1</sup>, Florencia Cerimedo<sup>1</sup>, Gabriela Gutiérrez<sup>1,2</sup>.

<sup>1</sup> Microgénesis, Buenos Aires, Argentina;

<sup>2</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas Buenos Aires, Argentina.

**Correspondencia:** Gutiérrez, Gabriela. gabriela.gutierrez@microgenesis.net - +54-911-4438 2133; Av. Coronel Díaz 2277 8B, CABA, Argentina

**Agradecimientos:** Los autores agradecen a todos los participantes por su contribución. El estudio fue financiado por el Banco Mundial, EMPRETECNO 2016, PAEBT 016/16.

**Conflicto de intereses:** El documento US 63/076690 ha sido asignado a Microgenesis Corporation y CONICET. Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

**Problema:** El aumento de la infertilidad a nivel mundial no solo está vinculado al aumento de la edad materna sino al impacto de factores ambientales que provocan cambios epigenéticos en el estado de salud de la mujer, y que tienen impacto en el origen de trastornos inflamatorios cuyo primer síntoma podría ser la infertilidad.

**Método de estudio:** Se reclutó a un total de 301 mujeres con múltiples fracasos de FIV-ET. Se analizó la expresión de microARNs específicos asociados a desbalances de la microbiota junto con marcadores en sangre y en saliva. Todas las pacientes mostraron desbalances al menos uno de los marcadores antes mencionados y decidieron seguir con su tratamiento habitual (n=23) o personalizar una suplementación alimentaria y de probióticos durante 75 días (n=278). La tasa de embarazo fue comparada entre ambos grupos luego de 180 días de búsqueda de embarazo.

**Resultado(s):** El 84% de las pacientes infértiles mostraron un aumento en al menos uno de estos microARNs. Teniendo en cuenta estos parámetros y los marcadores de sangre periférica y saliva, las pacientes fueron suplementadas con una combinación de dietas biomédicas, probióticos y nutraceuticos. La tasa de embarazo tras otro intento de FIV-ET fue del 75% para el grupo que personalizó la suplementación y del 30% para el grupo que no realizó la suplementación (\*p<0.05).

**Conclusiones:** Una suplementación dietaria adecuada según nuestra novedosa plataforma de diagnóstico de microARNs mejoró la tasa de embarazo de los pacientes con múltiples fallas de FIV-ET.

**Palabras clave:** infertilidad, microARNs, microbiota, permeabilidad intestinal, autoanticuerpos

**Problem:** The increase in infertility worldwide is not only linked to the increase in maternal age but also to the impact of environmental factors associated to epigenetic changes in women's health status, which have an impact on the origin of inflammatory disorders whose first symptom could be infertility.

**Method of study:** A total of 301 women with multiple IVF-ET failures were recruited. The expression of specific microRNAs associated with microbiota imbalances was analyzed together with biomarkers in blood and saliva. All patients showed imbalances in at least one of the above-mentioned biomarkers and decided to continue with their usual treatment (n=23) or to customize dietary and probiotic supplementation for 75 days (n=278). Pregnancy rate was compared between both groups after 180 days of pregnancy search.

**Result(s):** 84% of the infertile patients showed an increase in at least one of these microRNAs. Considering these parameters and peripheral blood and saliva biomarkers, the patients were supplemented with a combination of biomedical diets, probiotics and nutraceuticals. Pregnancy rate after another IVF-ET attempt was 75% for the group that customized supplementation and 30% for the group that did not supplement according tests results (\*p<0.05).

**Conclusions:** Appropriate dietary supplementation according to our novel microRNA diagnostic platform improved the pregnancy rate of patients with multiple IVF-ET failures.

**Keywords:** infertility, microRNAs, microbiota, intestinal permeability, autoantibodies

## INTRODUCCIÓN

La infertilidad es un importante problema de salud pública, con una prevalencia mundial del 8-12% entre las parejas en edad reproductiva<sup>1</sup> que tiene graves efectos adversos en la sociedad, la economía y la salud mental de la pareja implicada<sup>2</sup>. Las principales causas de infertilidad femenina son: 1) trastornos de la ovulación, 2) problemas uterinos o cervicales, 3) alteraciones tubáricas, 4) endometriosis, y/o 5) factores inmunológicos<sup>1</sup>. Sin embargo, aproximadamente el 30% de las faltas de embarazo no se pueden explicar, lo que se define como “infertilidad inexplicada” (IU) o sin causa aparente<sup>3</sup>.

En la actualidad, hay cada vez más pruebas que demuestran el impacto de la microbiota humana como factor de salud y enfermedad<sup>4,5</sup>. La microbiota es un grupo de microorganismos que se encuentran en los tejidos de las mucosas, como el intestino, el tracto reproductivo y la piel, y que son beneficiosos para la fisiología normal del huésped. La microbiota humana desempeña un papel fundamental en múltiples procesos biológicos, como el metabolismo de los nutrientes y los fármacos, el mantenimiento de la integridad estructural de la barrera de la mucosa, la inmunomodulación y la protección contra los patógenos<sup>6</sup>. La alteración de la composición de la microbiota, que resulta de una disminución de la proporción de bacterias beneficiosas/nocivas, se define como “disbiosis”<sup>7</sup>. La disbiosis puede clasificarse en tres tipos diferentes: pérdida de organismos beneficiosos, crecimiento excesivo de organismos potencialmente dañinos y pérdida de la diversidad microbiana general. Además, estos tres tipos no se excluyen mutuamente y pueden darse simultáneamente<sup>7-10</sup>.

La microbiota del tracto reproductivo femenino está recibiendo cada vez más atención en la reproducción humana porque no sólo puede influir en las posibilidades de lograr un embarazo, sino también en el estado de salud de la madre y del niño antes y después del parto. Estudios recientes han demostrado que la abundancia relativa de *L. iners*, *L. crispatus* y *L. gasseri* en la vagina puede distinguir a las mujeres infértiles idiopáticas de mujeres fértiles<sup>11</sup>.

Además de la función normal en el tracto digestivo, la microbiota intestinal normal tiene un impacto en la función normal del tracto reproductivo masculino y femenino al regular los cambios inmunológicos asociados con la concepción<sup>12</sup>. Sin embargo, los mecanismos asociados a esta regulación son todavía poco conocidos. Mientras que la microbiota intestinal normal es esencial para la función del sistema inmunitario, la disbiosis puede tener un gran impacto en su función normal, lo que provoca una desviación de las respuestas inmunitarias normales<sup>7</sup>. La permeabilidad del epitelio intestinal depende de

la regulación del sistema inmunitario de la mucosa y de las uniones estrechas intercelulares (TJ). La disfunción de la TJ parece ser un defecto primario en varias enfermedades autoinmunes (EA)<sup>13-20</sup>. La regulación fisiopatológica de las TJ está influenciada por muchos factores, como la inmunoglobulina A (IgA) secretora, las lectinas, las levaduras, las bacterias y los microARN (miARN)<sup>21,22</sup>.

Los microARNs son una clase de pequeñas moléculas de ARN no codificantes que controlan la expresión de los genes a nivel post-transcripcional<sup>23</sup>. Se ha descrito que varios miRNAs están asociados a estados de disbiosis y al desequilibrio inmunitario de las dos principales poblaciones celulares inmunitarias de las mucosas: los macrófagos (Ms) y las células dendríticas (DCs), mientras que la infiltración tisular y la remediación de la inflamación podrían estar reguladas por los miARNs<sup>24,25</sup>.

Se ha descubierto que el aumento de la permeabilidad intestinal desempeña un papel clave en el desarrollo de diversos trastornos inflamatorios y autoinmunes<sup>13-16,26</sup>. Los trastornos inmunitarios también están implicados en el fracaso reproductivo, y ocho de cada diez pacientes infértiles inexplicables dan positivo en las pruebas de autoanticuerpos<sup>27,28</sup>. Dado que, como se ha comentado anteriormente, la composición del microbioma afecta al repertorio de células inmunológicas de la mucosa, y que la disbiosis está asociada a las enfermedades inflamatorias<sup>29-33</sup> la hipótesis es que la patogénesis de la infertilidad podría estar asociada a respuestas inmunológicas anormales debidas a alteraciones de la microbiota. En este sentido, es plausible que la microbiota pueda desempeñar un papel en el desarrollo de la infertilidad al afectar a las funciones epigenéticas, inmunológicas y/o bioquímicas del huésped.

Demostramos previamente que el grupo de pacientes con infertilidad sin causa aparente y síntomas de intestino permeable tenía un desequilibrio del microbioma asociados a una sobreexpresión de microARNs<sup>34</sup>. Hemos propuesto la asociación entre la composición bacteriana y los trastornos inmunometabólicos. Así, cuando estudiamos los microARNs que comunican el microbioma con el sistema inmunitario y que están relacionados con la alteración de la TJ, observamos que miR-21-5p y miR-155-5p estaban sobreexpresados a nivel rectal y vaginal en estas mujeres. miR-21-5p está asociado con la alteración de las uniones estrechas intercelulares en el intestino<sup>35-40</sup>, trastornos en el Sistema inmunitario<sup>41-43</sup> y el sobrecrecimiento de levaduras<sup>44</sup> y miR-155-5p se asocia con enfermedades inflamatorias<sup>45</sup>, activación de los macrófagos hacia el fenotipo M1<sup>46,47</sup> y el sobrecrecimiento bacteriano<sup>48</sup>.

El objetivo de este estudio fue evaluar si los biomarcadores estudiados eran una buena herramienta

para personalizar el uso de los suplementos dietarios probióticos y dietas para mejorar el resultado reproductivo de las pacientes con infertilidad sin causa aparente.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Grupo de estudio

Un total de 301 mujeres fueron reclutadas desde marzo de 2018 hasta diciembre de 2020. La participación en este estudio preliminar fue voluntaria y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de los sujetos. El estudio fue aprobado por el Comité de Revisión Ética del Instituto Médico Halitus.

Se definió a las pacientes como infertilidad inexplicada (IU) o sin causa aparente cuando cumplían los siguientes criterios: 1) función ovárica normal, según el día 3 del ciclo menstrual (+/-2 días) FSH  $\leq$  12 UI/L en el plazo de 1 año antes del inicio del estudio; 2) anatomía tubárica (al menos una trompa de Falopio permeable) y peritoneal normales, según histerosalpingografía y/o laparoscopia; 3) progesterona sérica de mitad de fase lutea  $>10$  ng/mL; 4) sin evidencia de infertilidad masculina; 5) los números 1 y 3 no se aplican si están en un programa de ovodonación (OD) debido al diagnóstico de insuficiencia ovárica; y 6) historial de al menos 2 procedimientos de FIV-ET o 1 OD-ET sin éxito. Se consideraron criterios de exclusión: la presencia de hidrosalpinx, endometriosis grave, tratamiento crónico con antibióticos y trastornos hormonales no tratados.

### Análisis de muestras de sangre

Se determinó la cuantificación de anticuerpos anti-tiroperoxidasa (ATPO), anticuerpos antitiroglobulina tiroidea (TgAb), anticuerpos anti-*Saccharomyces cerevisiae* (ASCA), anticoagulante lúpico y anticuerpos antinucleares (ANA), junto con los niveles sanguíneos de la hormona estimulante de la tiroides (TSH), la hemoglobina, las vitaminas D y B12, la insulina y la glucosa, siguiendo protocolos estándar en laboratorios clínicos certificados.

### Preparación de muestras de hisopado vaginal

La muestra vaginal fue recolectada por cada paciente utilizando un hisopo estéril de Dacron. El hisopo se suspendió en 1 mL de solución de ARN *later* para estabilizar el ARN y se almacenó a  $-80^{\circ}\text{C}$  en tubos individuales hasta su procesamiento. Para la toma de muestra las pacientes debieron abrir los labios vaginales, introducir el hisopo de 3 a 5 cm en la vagina, rotar el hisopo en varios círculos completos a lo largo de las paredes vaginales durante 20 segundos, e inmediatamente introducir el hisopo en el tubo de recogida.

### Aislamiento del ARN

El ARN total (incluidos los microARN) se aisló de cada muestra utilizando el kit de aislamiento mirVana (Life Technologies, EE.UU.), según las instrucciones del fabricante. La pureza (absorbancia 260/280) y la cantidad del ARN extraído se midieron con un espectrofotómetro Nanodrop One (Thermo Scientific, EE.UU.).

### Síntesis de ADN copia

El ADNc se sintetizó utilizando la transcripción reversa (RT) TaqMan específica prediseñada y el kit de transcripción reversa de microARN TaqMan (Applied Biosystems, EE.UU.), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones de transcripción reversa se realizaron en un volumen final de 15  $\mu\text{L}$ , y cada reacción contenía 4 ng de ARN total. Las reacciones se incubaron a  $16^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos,  $42^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos y  $85^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos, con una retención final a  $4^{\circ}\text{C}$ .

### Análisis por qRT-PCR

El volumen de reacción final fue de 20  $\mu\text{L}$ , que contenía 1,33  $\mu\text{L}$  del producto de la reacción RT. Los ciclos de PCR en tiempo real se realizaron en un sistema de tiempo real Thermal Cycler C1000 Touch CFX96 (Bio-Rad, EE.UU.) utilizando los siguientes parámetros:  $95^{\circ}\text{C}$  durante 10 min, seguido de 40 - 45 ciclos de  $95^{\circ}\text{C}$  durante 15 s, y  $60^{\circ}\text{C}$  durante 1 min. Los valores del ciclo umbral (Ct) se calcularon automáticamente utilizando el software Bio-Rad CFX Maestro, y los cambios en la expresión se calcularon mediante el método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  utilizando RNU48 como control endógeno de la expresión de microARNs<sup>49</sup>. Todas las combinaciones muestra-ensayo se detectaron por duplicado para muestras individuales, y se incluyeron controles negativos y positivos en cada placa.

### Análisis estadístico

El análisis de la eficacia de la intervención personalizada se realizó comparando el resultado primario de tasa de embarazo de las mujeres que utilizaron el tratamiento indicado según los biomarcadores estudiados vs. aquellas que no lo hicieron, mediante la prueba de chi-cuadrado de Pearson.

## RESULTADOS

### Caracterización clínica de los grupos de estudio

Un total de 301 pacientes con IU fueron incluidas en este estudio. La edad media era de 40 años (rango: 27-52); 26% de tasa de embarazo; media de Gravidad/Paridad = 1,2/0; media de ciclos de FIV-ET fallidos = 4,2; y media de tiempo intentando concebir = 10 años. 120 pacientes ya habían fracasado al menos en una TE con ovocitos donados de buena calidad.

### **Evaluación de miR-21 y miR-155 como biomarcadores de infertilidad femenina**

Teniendo en cuenta que los microARNs evaluados se asocian a diferentes funciones: miR-21-5p se asocia a la alteración de las uniones estrechas en el intestino, al sobrecrecimiento fúngico y a la ausencia de especies bacterianas; y miR-155-5p se asocia a los trastornos inflamatorios y al sobrecrecimiento bacteriano, se realizó el análisis para cada marcador individualmente. Este análisis mostro que el 20% de las pacientes tenía sobre-expresión únicamente de miR21, el 8% tenía sobre expresión de miR155, el 56% tenía sobreexpresión de ambos microARNs y un 16% tenía ambos microARNs por debajo del valor de corte.

### **Suplementos dietarios personalizados y su impacto en la tasa de embarazo**

Teniendo en cuenta los niveles vaginales de miR-21 y miR-155 y la expresión de marcadores inmunometabólicos (insulina, vitamina D, anticuerpos antinucleares, colesterol LDL y sIgA), clasificamos a las pacientes en 64 fenotipos diferentes y se les indico una combinación de nutraceuticos, probióticos y dietas biomédicas que podría mejorar potencialmente el resultado reproductivo. Las diferentes combinaciones de nutraceuticos, probióticos y dietas biomédicas estaba basada en: 1) tres perfiles nutricionales (hipofermentativo; bajo índice glucémico y bajo en grasas saturadas); 2) dos cepas probióticas (*Lactobacillus spp.* y *Bifidobacterium spp.*); y 3) once nutraceuticos (L-Glutamina, Triptófano, Magnesio, Omega3, Selenio, Trans-resveratrol, Vitamina D, Vitamina B12, Vitamina A, Vitamina E y Vitamina C).

De las 301 mujeres incluidas en este estudio, 23 no realizaron ningún cambio en la dieta ni incorporaron suplementos o probioticos antes del siguiente intento de FIV-ET y 287 pacientes recibieron la suplementación específica personalizada según los biomarcadores durante los 75 días previos al siguiente ciclo de FIV-ET. En este ultimo grupo se realizaron controles de los marcadores de sangre a partir del día 30 de suplementación. Luego de confirmar que las pacientes normalizaban los biomarcadores, se sometieron a un nuevo ciclo de FIV-ET y se registró el resultado del embarazo. El 41,8% de la cohorte total recibió ovocitos donados y el 55% de las pacientes transfirió embriones congelados en un ciclo no estimulado.

La tasa total de embarazo se tradujo en un 75% (215/287) de embarazo bioquímico (beta hCG) y un 73% (157/215) de embarazo clínicamente confirmado por ecografía.

En el grupo que no realizo cambios en las indicaciones antes del siguiente FIV, solo el 30% (7/23)

de las mujeres lograron un embarazo dentro de los 180 días siguientes.

### **DISCUSIÓN**

La infertilidad sin causa aparente es la categoría que incluye a todas las parejas que no tienen una explicación para su incapacidad de lograr un embarazo exitoso luego de 1 año de búsqueda no interrumpida. Buscar los biomarcadores correctos que discriminen la causa e identifiquen el siguiente tratamiento es algo que la ciencia le debe a estas parejas.

Consideramos que es importante identificar si los marcadores de sangre periférica y saliva de las vías inmunometabólicas probadas en este estudio estaban conectadas con la disfunción intestinal debido a una firma específica de microARNs que está relacionada con el aumento de la permeabilidad intestinal. Y en este caso, si la suplementación alimentaria personalizada puede mejorar los resultados reproductivos.

Analizamos los niveles de vitamina B12 en suero porque una de las causas más comunes de anemia crónica es la deficiencia de vitamina B12, que es sintetizada por las bacterias intestinales y se asocia con la gastritis autoinmune o distrófica<sup>50,51</sup>. Analizamos los niveles de insulina y LDL porque se ha demostrado que la disbiosis intestinal, al alterar el metabolismo del microbioma y, en consecuencia, el del huésped, no sólo afecta a las respuestas inflamatorias sino que también contribuye a los trastornos metabólicos<sup>52</sup>. Comparamos los niveles de autoanticuerpos porque, además de la predisposición genética y la exposición a antígenos no propios, la pérdida de la función protectora del microbioma normal y el efecto de la disbiosis en la función de las barreras de la mucosa, que interactúan con las células inmunitarias subyacentes, están relacionados con el desarrollo de autoanticuerpos<sup>53</sup>. Asimismo, se ha reportado de que los individuos con disfunción de la barrera intestinal expresan niveles más altos de anticuerpos ASCA que los individuos sanos y la expresión de este anticuerpo se correlacionó con la sobreexpresión de levaduras y la disfunción de la TJ<sup>54</sup>.

Consideramos que un desequilibrio de microorganismos a nivel intestinal se asocia con una barrera intestinal alterada a través de una TJ abierta, dando lugar a la entrada de antígenos inmunogénicos extraños y a la activación del sistema inmunitario de la mucosa. La alteración de la barrera epitelial inflamada está relacionada con la sobreexpresión de miR-21 y miR-155. Estos miRNAs podrían viajar a través de la circulación sanguínea y dirigirse al sistema reproductor, en el que también observamos una disbiosis, una mucosa inflamada y una barrera epitelial alterada.

Reportamos por primera vez que la identificación de biomarcadores específicos se correlaciona con la presencia de una firma específica del microbioma en pacientes con infertilidad sin causa aparente. Además, demostramos que una intervención personalizada de suplementos dietarios podría tener un impacto significativo en la tasa de éxito del embarazo.

La modulación del sistema inmunitario y del microbioma puede realizarse utilizando una combinación de diferentes cepas de probióticos y nutracéuticos seleccionados por su capacidad antioxidante, su capacidad para reparar la mucosa y para modular los sistemas inmunitarios innato y adaptativo. Todos ellos mostraron un efecto antiinflamatorio dosis-específico para mantener un delicado equilibrio inmunitario y favorecer la vascularización de la mucosa endometrial y la posterior placentación, para lograr un embarazo saludable.

El resultado del embarazo tras la suplementación personalizada se comparo con los datos registrados por las sociedades nacionales e internacionales y observamos una mayor tasa de nacidos vivos para la misma cohorte de edad. La Sociedad de Tecnología de Reproducción Asistida de Estados Unidos (SART) informó en 2018 una tasa de nacidos vivos por extracción y transferencia de óvulos prevista del 21,7% con óvulos frescos propios; 42,7% para transferencia de embriones congelados a partir de

óvulos propios; 42,7% para embriones transferidos en fresco de óvulos de donante y 39,3% para embriones congelados de óvulos de donante. Tras nuestra suplementación personalizada, observamos una tasa de nacidos vivos por extracción y transferencia de óvulos prevista del 52% para los óvulos frescos propios; del 55% para la transferencia de embriones criopreservados obtenidos a partir de ovulos propios; del 63% para embriones de óvulos frescos de donante y del 63% para embriones de óvulos congelados de donante.

Esta en curso la planificación de un futuro estudio en el que se analizará a todas las pacientes antes y después de la suplementación dietaria previo a un nuevo ciclo de búsqueda de embarazo para ver como se modulan estos biomarcadores y lograr una correlación directa entre el análisis de microARNs y la suplementación dietaria personalizada.

### CONCLUSIÓN

En conclusión, para evaluar el bioma fértil de una mujer, podríamos analizar un hisopo vaginal para buscar la firma de microARNs específicos. La firma de los microARNs, junto con los marcadores sanguíneos específicos, nos permite identificar los nutrientes de precisión, los probióticos y los nutracéuticos necesarios para mejorar los resultados reproductivos.

Tabla 1. Caracterización clínica de los biomarcadores sistémicos. Los datos se presentan como número de pacientes (n) y porcentaje del total de pacientes estudiados (%). Total pacientes = 278.

Caracterización clínica	Mujeres con IU	
	n	%
Anemia	43	15.0
Hipovitaminosis B y/o D	210	73.2
Hipotiroidismo	147	51.2
Síndrome metabólico	161	56.1
Síndrome de ovario poliquístico	53	18.5
Endometriosis y/o CA125+	78	27.2
Autoinmunidad	188	65.5
ATPO +	57	19.9
TgAb +	53	18.5
ANA +	59	20.6
ASCA (IgA, IgG)	88	30.7

Anemia: hemoglobina < 12 g/dL; Hipovitaminosis B: Vitamina B12 < 200 pg/mL; Hipovitaminosis D: Vitamina D < 30 ng/mL; Hipotiroidismo: TSH > 4 UI/mL; Síndrome metabólico: prueba de tolerancia oral a la glucosa (PTOG) alterada, glucemia > 100 mg/dL, insulina > 24 mU/L y/o Evaluación del Modelo Homeostático (HOMA) > 3; Síndrome de ovario poliquístico: diagnóstico ecográfico y/o indicación de inositol-metformina; endometriosis: diagnóstico laparoscópico y/o CA125 > 35 UI/mL; Autoinmunidad: diagnóstico de enfermedad celíaca, enfermedad de Hashimoto, enfermedad de Crohn, diabetes autoinmune, lupus, Graves, artritis reumatoide, esclerodermia, miastenia gravis y/o Sjogren; ATPO: anticuerpo anti-tiroperoxidasa; TgAb: anticuerpo anti-tiroglobulina; ANA: anticuerpo antinuclear; ASCA: anticuerpo anti-Saccharomyces cerevisiae; IgA: Inmunoglobulina A; IgG: Inmunoglobulina G.

**Tabla 2. Resultados obstetricos.** Los datos se presentan como porcentaje del total de pacientes estudiados en cada grupo (%).

	Pacientes que siguieron la recomendación de suplementos dietarios	Pacientes que NO siguieron recomendación de suplementos dietarios	P value
<b>Tasa de Embarazo bioquímico (%)</b>	75	30	p<0.05
<b>Tasa de embarazo clínico (%)</b>	55	29	p<0.05

## Referencias

- Vander Borgh M, Wyns C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin Biochem.* 2018;62:2-10. doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012
- Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: New thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update.* 2014;21(4):411-426. doi:10.1093/humupd/dmv016
- Sadegui MR. *Unexplained Infertility, the Controversial Matter in Management of Infertile Couples - PubMed.*; 2015. doi:10.1093/humupd/dmv016. Epub 2015 Mar 22. PMID: 25801630
- Kährström CT, Pariente N, Weiss U. Intestinal microbiota in health and disease. *Nature.* 2016;535(7610):47. doi:10.1038/535047a
- Dinan TG, Cryan JF. The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. *Gastroenterol Clin North Am.* 2017;46(1):77-89. doi:10.1016/j.gtc.2016.09.007
- Lynch S V, Pedersen O. The Human Intestinal Microbiome in Health and Disease. *N Engl J Med.* 2016;375(24):2369-2379. doi:10.1056/nejmra1600266
- Fallucca F, Porrata C, Fallucca S, Pianesi M. Influence of diet on gut microbiota, inflammation and type 2 diabetes mellitus. First experience with macrobiotic Ma-Pi 2 diet. *Diabetes Metab Res Rev.* 2014;30(S1):48-54. doi:10.1002/dmrr.2518
- Aagaard K, Riehle K, Ma J, et al. A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. *PLoS One.* 2012;7(6). doi:10.1371/journal.pone.0036466
- Boers SA, Jansen R, Hays JP. Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;38(6):1059-1070. doi:10.1007/s10096-019-03520-3
- Degruttola AK, Low D, Mizoguchi A, Mizoguchi E. Current understanding of dysbiosis in disease in human and animal models. *Inflamm Bowel Dis.* 2016;22(5):1137-1150. doi:10.1097/MIB.0000000000000750
- Campisciano G, Florian F, D'Eustacchio A, et al. Subclinical alteration of the cervical-vaginal microbiome in women with idiopathic infertility. *J Cell Physiol.* 2017;232(7):1681-1688. doi:10.1002/jcp.25806
- Mor G, Aldo P, Alvero AB. The unique immunological and microbial aspects of pregnancy. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(8):469-482. doi:10.1038/nri.2017.64
- Fasano A, Shea-Donohue T. Mechanisms of disease: The role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2005;2(9):416-422. doi:10.1038/ncpgasthep0259
- Arvonen M, Berntson L, Pokka T, Karttunen TJ, Vähäsalo P, Stoll ML. Gut microbiota-host interactions and juvenile idiopathic arthritis. *Pediatr Rheumatol.* 2016;14(1). doi:10.1186/s12969-016-0104-6
- Fahlén A, Engstrand L, Baker BS, Powles A, Fry L. Comparison of bacterial microbiota in skin biopsies from normal and psoriatic skin. *Arch Dermatol Res.* 2012;304(1):15-22. doi:10.1007/s00403-011-1189-x
- Hold GL, Smith M, Grange C, Watt ER, El-Omar EM, Mukhopadhyaya I. Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: What have we learnt in the past 10 years? *World J Gastroenterol.* 2014;20(5):1192-1210. doi:10.3748/wjg.v20.i5.1192
- Huipeng W, Lifeng G, Chuang G, Jiaying Z, Yuankun C. The differences in colonic mucosal microbiota between normal individual and colon cancer patients by polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis. *J Clin Gastroenterol.* 2014;48(2):138-144. doi:10.1097/MCG.0b013e3182a26719
- Maes M, Kubera M, Leuni J-C. The gut-brain barrier in major depression: Intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative enterobacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression. *Neuro Endocrinol Lett.* Published online 2008. Accessed January 12, 2021. [https://www.researchgate.net/publication/5569445\\_The\\_gut-brain\\_barrier\\_in\\_major\\_depression\\_Intestinal\\_mucosal\\_dysfunction\\_with\\_an\\_increased\\_translocation\\_of\\_LPS\\_from\\_gram\\_negative\\_enterobacteria\\_leaky\\_gut\\_plays\\_a\\_role\\_in\\_the\\_inflammatory\\_pathophysio](https://www.researchgate.net/publication/5569445_The_gut-brain_barrier_in_major_depression_Intestinal_mucosal_dysfunction_with_an_increased_translocation_of_LPS_from_gram_negative_enterobacteria_leaky_gut_plays_a_role_in_the_inflammatory_pathophysio)
- Pärty A, Kalliomäki M, Wacklin P, Salminen S, Isolauri E. A possible link between early probiotic intervention and the risk of neuropsychiatric disorders later in childhood: A randomized trial. *Pediatr Res.* 2015;77(6):823-828. doi:10.1038/pr.2015.51
- Peterson DA, Frank DN, Pace NR, Gordon JI. Metagenomic Approaches for Defining the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Host Microbe.* 2008;3(6):417-427. doi:10.1016/j.chom.2008.05.001
- Jeon MK. Intestinal barrier: Molecular pathways and modifiers. *World J Gastrointest Pathophysiol.* 2013;4(4):94. doi:10.4291/wjgp.v4.i4.94
- Catanzaro JR, Strauss JD, Bielecka A, et al. IgA-deficient humans exhibit gut microbiota dysbiosis despite secretion of compensatory IgM. *Sci Rep.* 2019;9(1). doi:10.1038/s41598-019-49923-2
- Gulyaeva LF, Kushlinskiy NE. Regulatory mechanisms of microRNA expression. *J Transl Med.* 2016;14(1). doi:10.1186/s12967-016-0893-x

24. Mortha A, Chudnovskiy A, Hashimoto D, et al. Microbiota-dependent crosstalk between macrophages and ILC3 promotes intestinal homeostasis. *Science (80- )*. 2014;343(6178). doi:10.1126/science.1249288
25. Curtale G, Rubino M, Locati M. MicroRNAs as molecular switches in macrophage activation. *Front Immunol*. 2019;10(MAR). doi:10.3389/fimmu.2019.00799
26. Vojdani A. For the assessment of intestinal permeability, size matters. *Altern Ther Health Med*. 2013;19(1):12-24. Accessed January 12, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23341423/>
27. Gleicher N, El-Roeiy A. The reproductive autoimmune failure syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 1988;159(1):223-227. doi:10.1016/0002-9378(88)90525-X
28. Laschke MW, Menger MD. The gut microbiota: A puppet master in the pathogenesis of endometriosis? *Am J Obstet Gynecol*. 2016;215(1):68.e1-68.e4. doi:10.1016/j.ajog.2016.02.036
29. De Luca F, Shoenfeld Y. The microbiome in autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol*. 2019;195(1):74-85. doi:10.1111/cei.13158
30. Yu LCH. Microbiota dysbiosis and barrier dysfunction in inflammatory bowel disease and colorectal cancers: exploring a common ground hypothesis. *J Biomed Sci*. 2018;25(1). doi:10.1186/s12929-018-0483-8
31. Flores R, Shi J, Fuhrman B, et al. Fecal microbial determinants of fecal and systemic estrogens and estrogen metabolites: A cross-sectional study. *J Transl Med*. 2012;10(1). doi:10.1186/1479-5876-10-253
32. Zeng B, Lai Z, Sun L, et al. Structural and functional profiles of the gut microbial community in polycystic ovary syndrome with insulin resistance (IR-PCOS): a pilot study. *Res Microbiol*. 2019;170(1):43-52. doi:10.1016/j.resmic.2018.09.002
33. Yurtdaş G, Akdevelioğlu Y. A New Approach to Polycystic Ovary Syndrome: The Gut Microbiota. *J Am Coll Nutr*. 2020;39(4):371-382. doi:10.1080/07315724.2019.1657515
34. MA A, L O, MI P, et al. Potential biomarkers of infertility associated with microbiome imbalances. *Am J Reprod Immunol*. Published online 2021. doi:10.1111/AJI.13438
35. Zhang L, Zhang F, He DK, Fan XM, Shen J. MicroRNA-21 is upregulated during intestinal barrier dysfunction induced by ischemia reperfusion. *Kaohsiung J Med Sci*. 2018;34(10):556-563. doi:10.1016/j.kjms.2018.05.006
36. Zhang L, Shen J, Cheng J, Fan X. MicroRNA-21 regulates intestinal epithelial tight junction permeability. *Cell Biochem Funct*. 2015;33(4):235-240. doi:10.1002/cbf.3109
37. Nakata K, Sugi Y, Narabayashi H, et al. Commensal Microbiota-induced microRNA modulates intestinal epithelial permeability through the small GTPase ARF4. *J Biol Chem*. 2017;292(37):15426-15433. doi:10.1074/jbc.M117.788596
38. Shi C, Liang Y, Yang J, et al. MicroRNA-21 Knockout Improve the Survival Rate in DSS Induced Fatal Colitis through Protecting against Inflammation and Tissue Injury. *PLoS One*. 2013;8(6). doi:10.1371/journal.pone.0066814
39. Shi C, Yang Y, Xia Y, et al. Novel evidence for an oncogenic role of microRNA-21 in colitis-associated colorectal cancer. *Gut*. 2016;65(9):1470-1481. doi:10.1136/gutjnl-2014-308455
40. Jiang W, Li X. Molecular Analysis of Inflammatory Bowel Disease: Clinically Useful Tools for Diagnosis, Response Prediction, and Monitoring of Targeted Therapy. *Mol Diagnosis Ther*. 2015;19(3):141-158. doi:10.1007/s40291-015-0142-7
41. Xu WD, Pan HF, Li JH, Ye DQ. MicroRNA-21 with therapeutic potential in autoimmune diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 2013;17(6):659-665. doi:10.1517/14728222.2013.773311
42. Wang S, Wan X, Ruan Q. The microRNA-21 in autoimmune diseases. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6). doi:10.3390/ijms17060864
43. Wang Z, Brandt S, Medeiros A, et al. MicroRNA 21 Is a homeostatic regulator of macrophage polarization and prevents prostaglandin e2-mediated M2 generation. *PLoS One*. 2015;10(2). doi:10.1371/journal.pone.0115855
44. Croston TL, Lemons AR, Beezhold DH, Green BJ. MicroRNA regulation of host immune responses following fungal exposure. *Front Immunol*. 2018;9(FEB). doi:10.3389/fimmu.2018.00170
45. Abdul-Maksoud RS, Sediq AM, Kattaia AAA, et al. Serum miR-210 and miR-155 expression levels as novel biomarkers for rheumatoid arthritis diagnosis. *Br J Biomed Sci*. 2017;74(4):209-213. doi:10.1080/09674845.2017.1343545
46. Bala S, Csak T, Saha B, et al. The pro-inflammatory effects of miR-155 promote liver fibrosis and alcohol-induced steatohepatitis. *J Hepatol*. 2016;64(6):1378-1387. doi:10.1016/j.jhep.2016.01.035
47. Saare M, Rekker K, Laisk-Podar T, et al. Challenges in endometriosis miRNA studies — From tissue heterogeneity to disease specific miRNAs. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2017;1863(9):2282-2292. doi:10.1016/j.bbdis.2017.06.018
48. Nisenblat V, Sharkey DJ, Wang Z, et al. Plasma miRNAs display limited potential as diagnostic tools for endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(6):1999-2022. doi:10.1210/je.2018-01464
49. Rotelli MT, Di Lena M, Cavallini A, et al. Fecal microRNA profile in patients with colorectal carcinoma before and after curative surgery. *Int J Colorectal Dis*. 2015;30(7):891-898. doi:10.1007/s00384-015-2248-0
50. Kulnigg-Dabsch S. Autoimmungastritis. *Wiener Medizinische Wochenschrift*. 2016;166(13-14):424-430. doi:10.1007/s10354-016-0515-5
51. Rodriguez-Castro KI, Franceschi M, Noto A, et al. Clinical manifestations of chronic atrophic gastritis. *Acta Biomed*. 2018;89(8-S):88-92. doi:10.23750/abm.v89i8-S.7921
52. Belizário JE, Faintuch J, Garay-Malpartida M. New frontiers for treatment of metabolic diseases. *Mediators Inflamm*. 2018;2018. doi:10.1155/2018/2037838
53. Kalinkovich A, Gabdulina G, Livshits G. Autoimmunity, inflammation, and dysbiosis mutually govern the transition from the preclinical to the clinical stage of rheumatoid arthritis. *Immunol Res*. 2018;66(6):696-709. doi:10.1007/s12026-018-9048-x
54. Vojdani A, Vojdani E, Herbert M, Kharrazian D. Correlation between antibodies to bacterial lipopolysaccharides and barrier proteins in sera positive for asca and anca. *Int J Mol Sci*. 2020;21(4). doi:10.3390/ijms21041381



Esta obra está bajo una licencia de *Creative Commons* Atribución-NonCommercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. Reconocimiento – Permite copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra. A cambio se debe reconocer y citar al autor original. No comercial – esta obra no puede ser utilizada con finalidades comerciales, a menos que se obtenga el permiso.