

**MESTRADO INTEGRADO**  
MEDICINA

# **A Influência do Microbioma do Trato Reprodutor Feminino na Fertilidade**

Ana Salomé Barreiros de Almeida

**M**

2025



# **A Influência do Microbioma do Trato Reprodutor Feminino na Fertilidade**

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Medicina, submetida ao Instituto de Ciências  
Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto

Estudante: Ana Salomé Barreiros de Almeida

Aluna de 6.º ano do Mestrado Integrado em Medicina (n.º mecanográfico: 201904538)

Endereço de correio eletrónico: [up201904538@icbas.up.pt](mailto:up201904538@icbas.up.pt)

Orientadora: Dra. Cláudia Sofia Ferreira Macário Lourenço

Assistente Hospitalar Graduada de Ginecologia e Obstetrícia no Centro Materno-Infantil do Norte  
Albino Aroso da Unidade Local de Saúde de Santo António

Colaboradora Externa no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto

Coorientador: Professor Doutor Hélder Bruno Carvalho Ferreira

Assistente Hospitalar Graduado de Ginecologia e Obstetrícia no Centro Materno-Infantil do Norte  
Albino Aroso da Unidade Local de Saúde de Santo António

Professor Associado Convidado no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do  
Porto

Junho de 2025

# **A Influência do Microbioma do Trato Reprodutor Feminino na Fertilidade**

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Medicina, submetida ao Instituto de Ciências  
Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto

Estudante: Ana Salomé Barreiros de Almeida



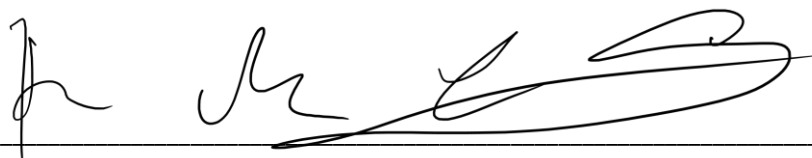
---

Orientadora: Dra. Cláudia Sofia Ferreira Macário Lourenço



---

Coorientador: Professor Doutor Hélder Bruno Carvalho Ferreira

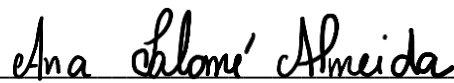


---

Junho de 2025

## DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Eu, Ana Salomé Barreiros de Almeida, com o número mecanográfico 201904538, estudante do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, declaro que a presente dissertação é de minha autoria, não tendo sido utilizada em nenhum outro curso ou unidade curricular, desta ou de outra instituição. Declaro também que não recorri à prática de plágio, estando, todas as fontes de informação utilizadas, devidamente citadas e referenciadas, em conformidade com as normas em vigor.

A handwritten signature in black ink, reading "Ana Salomé Almeida", is positioned above a horizontal line.

(Ana Salomé Almeida)

## DEDICATÓRIA

À minha mãe,  
Por sempre ter sido uma estrela guia.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, possibilitaram a realização deste trabalho.

Agradeço, em especial, à Dra. Cláudia Lourenço e ao Professor Doutor Hélder Ferreira, pela sua orientação, disponibilidade e apoio prestados.

## RESUMO

**Introdução:** O microbioma do trato reprodutor feminino (TRF) tem ganho especial destaque no seio da comunidade científica pelo seu potencial diagnóstico e terapêutico na saúde reprodutiva da mulher. Embora, historicamente, se acreditasse que o útero era um órgão estéril, com o advento da tecnologia de Sequenciação de Nova Geração (NGS), diversas pesquisas demonstraram a existência de comunidades microbianas desde a vagina até ao ovário. Assim, tem-se proposto que estas comunidades desempenhem um papel importante na fertilidade feminina e possam mesmo modular os resultados das técnicas de Procriação Medicamente Assistida (PMA).

**Objetivo:** Esta revisão tem como principal objetivo analisar a literatura mais recente referente ao microbioma do TRF e avaliar qual a sua influência na fertilidade e nas técnicas de PMA.

**Metodologia:** Foi realizada uma pesquisa bibliográfica nas bases *PubMed* e *Scopus*, utilizando os termos “*Microbiota*”, “*Endometrium*”, “*Vagina*”, “*Fallopian Tubes*”, “*Ovary*”, “*Infertility, Female*”, “*Fertility*”, “*Reproduction*” e “*Dysbiosis*”, combinados entre si. Foram incluídos artigos originais, revisões sistemáticas, meta-análises e revisões narrativas, publicados entre 2014 e 2024, em inglês ou português. Excluíram-se estudos que abordassem exclusivamente populações veterinárias, populações não-reprodutivas, microbioma fora do trato reprodutor, fertilidade ou microbioma masculinos sem relação com a fertilidade feminina e artigos sem texto completo disponível. Da pesquisa resultaram 2519 artigos, dos quais, após a aplicação dos critérios de elegibilidade, foram selecionados 80, aos quais se adicionaram 2 artigos identificados por pesquisa direcionada, totalizando 82 artigos incluídos nesta revisão.

**Conclusão:** O microbioma do TFR tem emergido como um possível fator determinante para a fertilidade como para o sucesso das técnicas de PMA. Contudo, a sua composição ideal e o papel dos diversos microrganismos envolvidos permanecem ainda incertos. Assim, torna-se essencial aprofundar o conhecimento nesta área, de forma, a no futuro, se poder integrar a análise do microbioma deste sistema na prática clínica.

**Palavras-chaves:** Microbioma, Trato Reprodutor Feminino, Fertilidade, Disbiose, Procriação Medicamente Assistida

## ABSTRACT

**Introduction:** The microbiome of the female reproductive tract (FRT) has gained special attention in the scientific community due to its diagnostic and therapeutic potential in the field of women's reproductive health. Historically, the uterus was considered sterile, however, with the advent of Next-Generation Sequencing (NGS) technology, numerous studies have described the presence of microbial communities from the vagina to the ovary. Consequently, it has been hypothesized that these communities may play an important role in female fertility and can potentially impact the success of Assisted Reproductive Technologies (ART).

**Objective:** This review aims to analyze the most recent literature regarding the FRT microbiome and evaluate its influence on fertility and ART outcomes.

**Methodology:** A search was conducted in the PubMed and Scopus databases using the words “Microbiota”, “Endometrium”, “Vagina”, “Fallopian Tubes”, “Ovary”, “Infertility, Female”, “Fertility”, “Reproduction” and “Dysbiosis” combined in various ways. Original articles, systematic reviews, meta-analyses, and narrative reviews published between 2014 and 2024 in English or Portuguese were included. Studies that exclusively focused on veterinary populations, non-reproductive populations, microbiomes outside the reproductive tract, male fertility or microbiomes unrelated to female fertility, and articles without full text available were excluded. The search yielded 2.519 articles, of which 80 were selected after applying the eligibility criteria. Two additional articles were identified through a targeted search, resulting in a total of 82 articles included in this review.

**Conclusion:** The FRT microbiome is considered a potentially determining factor in fertility and ART success. However, its ideal composition and the roles of the various microorganisms involved are unknown. Therefore, it is necessary to expand the knowledge in this area so that, in the future, microbiome analysis may be integrated into clinical practice.

**Keywords:** Microbiome, Female Reproductive Tract, Fertility, Dysbiosis, Assisted Reproductive Technologies



## LISTA DE ABREVIATURAS

HMP - *The Human Microbiome Project*

TRF – Trato Reprodutor Feminino

PMA – Procriação Medicamente Assistida

FIV - Fertilização In Vitro

VB – Vaginose Bacteriana

CST - *Community State Types*

DIU - Dispositivo Intrauterino

NGS - Sequenciação de Nova Geração (do inglês, *Next-Generation Sequencing*)

LD – Dominado por *Lactobacillus* (do inglês, *Lactobacillus-dominated*)

NLD – Não dominado por *Lactobacillus* (do inglês, *Non-Lactobacillus-dominated*)

LH – Hormona Luteinizante

ET – Transferência Embrionária

EC - Endometrite Crônica

RIF - Falha Recorrente da Implantação (do inglês, *Recurrent Implantation Failure*)

RPL – Perda Gestacional Recorrente (do inglês, *Recurrent Pregnancy Loss*)

TMV – Transplante de Microbiota Vaginal

## ÍNDICE

|                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| INTRODUÇÃO .....                                                          | 1  |
| OBJETIVOS .....                                                           | 2  |
| METODOLOGIA .....                                                         | 2  |
| CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA EUBIÓTICO DO TRATO REPRODUTOR FEMININO ..... | 3  |
| Microbioma Vaginal .....                                                  | 3  |
| Microbioma Cervical .....                                                 | 6  |
| Microbioma Endometrial .....                                              | 7  |
| Microbioma das Trompas de Falópio e do Ovário .....                       | 10 |
| DISBIOSE, INFERTILIDADE E PROcriação MEDICAMENTE ASSISTIDA .....          | 11 |
| Microbioma Vaginal .....                                                  | 11 |
| Microbioma Cervical .....                                                 | 13 |
| Microbioma Endometrial .....                                              | 13 |
| Microbioma Endometrial e Patologias Causadoras de Infertilidade.....      | 17 |
| Microbioma e Falhas Recorrentes da Implantação.....                       | 19 |
| Microbioma e Perda Gestacional Recorrente .....                           | 20 |
| ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS E PERSPECTIVAS FUTURAS .....                     | 21 |
| Antibióticos .....                                                        | 21 |
| Probióticos e Prebióticos .....                                           | 22 |
| Transplantes de microbianos .....                                         | 23 |
| CONCLUSÃO .....                                                           | 23 |
| APÊNDICE .....                                                            | 25 |
| BIBLIOGRAFIA.....                                                         | 26 |

## INTRODUÇÃO

O corpo humano é habitado por uma grande variedade de microrganismos, entre eles, bactérias, fungos, vírus e protozoários e estes juntamente com o seu genoma e os seus metabolitos, constituem o microbioma humano<sup>[1, 2]</sup>. Estes microrganismos encontram-se distribuídos por várias regiões do corpo e formam comunidades únicas e distintas entre si, tanto qualitativa quanto quantitativamente.

A investigação médica concentrou, durante muito tempo, o seu estudo no papel que o microbioma exercia na patogénese de diversas doenças<sup>[1]</sup>. No entanto, com o advento e a utilização de novas técnicas de sequenciação genética, tornou-se possível aprofundar o conhecimento sobre estas comunidades e compreender, de forma mais detalhada, qual a sua função fisiológica. O grande impulsionador desta área de estudo foi o *The Human Microbiome Project* (HMP), publicado pelo *National Institutes of Health*, em 2007, e cujo principal propósito era identificar e caracterizar as comunidades bacterianas de diferentes locais anatómicos de um indivíduo saudável. Este projeto visava compreender o comportamento e as funções deste microssistema, bem como caracterizar o seu impacto na saúde do hospedeiro<sup>[1]</sup>. Um dos locais analisados foi o TRF, mais concretamente o microbioma vaginal, uma vez que já era extensamente aceite na comunidade científica que a vagina apresentava uma comunidade microbiana ativa e que a sua disbiose estava associada a diversas doenças como, por exemplo, cervicovaginites e infeções pós-operatórias<sup>[3]</sup>.

Com os dados fornecidos pelo HMP e com o recurso a variadas técnicas metagenómicas, diversos estudos debruçaram-se sobre o microbioma do TRF e demonstraram que este não se resume apenas ao microbioma vaginal. Verificou-se, primeiramente, que existia um microbioma pequeno, mas ativo, na cavidade uterina pondo em causa a ideia historicamente implantada que esta cavidade era estéril<sup>[1, 4, 5]</sup>. Posteriormente, descreveram-se também comunidades bacterianas para além da cavidade endometrial, nas trompas de Falópio e nos ovários<sup>[6]</sup>.

Com a descoberta que o TRF apresenta um *continuum* de microbioma da vagina aos ovários e sabendo-se que, a nível vaginal, este possui uma composição dinâmica que varia ao longo do tempo, de acordo com a fase do ciclo menstrual, surgiu a hipótese de que variações semelhantes possam ocorrer em outros locais do TRF. Especula-se, assim, que estas variações possam ter um papel crucial em processos biológicos como a gravidez e, ainda, no sucesso de técnicas de PMA, como a fertilização in vitro (FIV)<sup>[6]</sup>.

## OBJETIVOS

Esta revisão bibliográfica tem como principal objetivo compilar a literatura mais recente sobre o microbioma do TRF e avaliar a sua influência na fertilidade, caracterizando o microbioma eubiótico e descrevendo de que forma a sua disbiose afeta a saúde reprodutiva da mulher. Ademais, objetiva-se também perceber como este desequilíbrio pode interferir nos resultados das técnicas de PMA e explorar como a modulação destas comunidades de microrganismos pode melhorar os desfechos reprodutivos destas técnicas.

## METODOLOGIA

Para alcançar os objetivos supracitados, foi realizada uma pesquisa bibliográfica de artigos indexados nas bases de dados *PubMed* e *Scopus*, através da associação dos seguintes termos e palavras-chave: “*Microbiota*”, “*Endometrium*”, “*Vagina*”, “*Fallopian Tubes*”, “*Ovary*”, “*Infertility*”, “*Female*”, “*Fertility*”, “*Reproduction*” e “*Dysbiosis*”. Estes foram combinados entre si com recurso aos operadores “*AND*” e “*OR*”. A pesquisa foi executada entre novembro de 2024 e janeiro de 2025, tendo sido repetida várias vezes para garantir que os estudos mais recentes também fossem incluídos e analisados.

Nesta revisão bibliográfica narrativa, foram, então, incluídos artigos de revisão sistemática, meta-análises, artigos de revisão simples e artigos originais que cumprissem os seguintes critérios de inclusão: artigos publicados na última década (de 1 de janeiro de 2014 até 31 de dezembro de 2024) e artigos publicados em inglês ou em português. Foram excluídos artigos cuja população não fosse exclusivamente veterinária, artigos que incluíssem exclusivamente populações não reprodutivas (por exemplo, adolescentes ou mulheres pós-menopáusicas), artigos focados no microbioma de outras regiões anatómicas que não o TRF, artigos sobre a fertilidade masculina ou o microbioma masculino sem relação direta com a fertilidade feminina e artigos em que apenas estivesse disponível o *abstract*.

Da busca realizada nas bases de dados, resultou um total de 2519 artigos. Inicialmente, foram removidos os artigos duplicados, os artigos que não se enquadravam no período temporal escolhido para esta revisão e os artigos que não se encontravam disponíveis em inglês ou em português, com auxílio da ferramenta de gestão de referências *Endnote*. Após a remoção destes artigos, os títulos e os *abstract* dos restantes foram avaliados com o objetivo de determinar a sua elegibilidade com base nos critérios de exclusão previamente estabelecidos. Aqueles que atendiam a estes critérios foram, então, lidos na íntegra para uma avaliação mais detalhada. Destes, foram descartados os artigos que não atendiam aos critérios de elegibilidade ou que não se enquadravam nos objetivos desta análise, resultando num total de 80 artigos. Por fim, adicionaram-se dois artigos

obtidos por pesquisa direcionada, totalizado um número final de 82 artigos incluídos nesta revisão. O fluxograma de seleção dos artigos encontra-se no apêndice desta revisão.

## **CARACTERIZAÇÃO DO MICROBIOMA EUBIÓTICO DO TRATO REPRODUTOR FEMININO**

O TRF é comumente subdividido em trato reprodutor superior, constituído pelos ovários, trompas de Falópio, útero e endocérrix, e trato reprodutor inferior, formado pelo ectocérrix e pela vagina<sup>[7]</sup>. Apesar de já ser largamente aceite pela comunidade científica que o TRF inferior apresenta um microbioma dinâmico, com um papel fundamental na defesa contra microrganismos patógenos, o trato reprodutor superior foi, até muito recentemente, considerado estéril, acreditando-se que o cérrix atuava como uma barreira para a ascensão de bactérias<sup>[8]</sup>. No entanto, com o desenvolvimento das técnicas de sequenciação genética, este paradigma foi mudado, demonstrando-se a existência de comunidades microbianas também no trato reprodutivo superior<sup>[8]</sup>. Estas comunidades caracterizam-se por apresentarem uma maior diversidade e menor biomassa, em comparação com a, até então, conhecida microbiota vaginal<sup>[7]</sup>. Atualmente, acredita-se que o microbioma do TRF represente cerca de 9% da carga bacteriana total do corpo humano<sup>[9]</sup>, e que desempenhe importantes funções fisiológicas e fisiopatológicas<sup>[8]</sup>.

### **Microbioma Vaginal**

O microbioma vaginal é um dos ecossistemas microbianos mais estudados do corpo humano e o mais estudado do TRF, não apenas pela facilidade de obtenção de amostras, mas também pela sua relevância para a saúde reprodutiva e geral da mulher<sup>[1, 10]</sup>.

Na maioria das mulheres saudáveis em idade reprodutiva, a microbiota vaginal é caracterizada por uma baixa diversidade bacteriana, sendo predominantemente composta por espécies do género *Lactobacillus*, com uma concentração estimada de cerca de  $10^7$ - $10^9$  unidades formadoras de colónias (UFC) por grama de fluido vaginal<sup>[11]</sup>. Este género é responsável pela produção de ácido láctico, que mantém o ambiente vaginal ácido (pH entre os 3,8 e os 4,5), o que inibe o crescimento de microrganismos patogénicos e protege contra uma variedade de infeções<sup>[12, 13]</sup>. De forma complementar, exerce uma função imunomoduladora essencial, suprimindo citocinas inflamatórias (como IL-6 e TNF- $\alpha$ ), estimulando a produção de anti-inflamatórios (IL-1RA) e inibindo a ativação da via NF- $\kappa$ B, mantendo, assim, um meio eubiótico<sup>[14]</sup>.

No entanto, cerca de 25% das mulheres saudáveis e assintomáticas apresentam uma microbiota vaginal mais diversificada, composta por uma ampla variedade de outras espécies microbianas<sup>[13, 15]</sup>. Esta descoberta desafiou a noção tradicional de que um microbioma vaginal

saudável deve ser exclusivamente dominado por *Lactobacillus*, sugerindo que a definição de "saudável" pode variar significativamente entre indivíduos e populações.

Perante isto, em 2011, Rave *et al.* propuseram pela primeira vez uma classificação para a microbiota vaginal com base na sua composição e na abundância relativa das diferentes espécies bacterianas presentes<sup>[7]</sup>. Utilizando a sequenciação de alta capacidade do gene 16S rRNA, demonstraram a existência de pelo menos cinco tipos principais de microbiota vaginal, denominados *Community State Types* (CST)<sup>[15, 16]</sup>. Mais recentemente, em 2020, France e colaboradores expandiram esta classificação para 13 CSTs, criando o sistema VALENCIA (*VAginal community state type Nearest Centroid classifier*)<sup>[7, 17]</sup>. Apesar do surgimento desta nova classificação, a classificação original ainda é mais amplamente utilizada na comunidade científica.

Os CSTs são classificados com base na espécie dominante de *Lactobacillus* (CST I, II, III e V) ou, na ausência de uma espécie dominante deste género, pela presença de uma comunidade polimicrobiana (CST IV), composta principalmente por anaeróbios estritos e facultativos. O CST I, II, III e V são dominados pelas espécies *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* e *L. jensenii*, respetivamente, apresentando uma baixa heterogeneidade bacteriana<sup>[11, 13, 15]</sup>. Por sua vez, o CST IV subdivide-se em CST IV-A e CST IV-B<sup>[16]</sup>. O CST IV-A é caracterizado pela coexistência de quantidades moderadas de *Lactobacillus* (geralmente, da espécie *L. iners*) com anaeróbios estritos ou facultativos, nomeadamente espécies dos géneros *Anaerobacteria*, *Peptobacteria*, *Corynebacterium*, *Prevotella*, *Fingoldia* e *Streptococcus*<sup>[18]</sup>. Já o CST IV-B apresenta uma ausência quase total de *Lactobacillus spp.* e é caracterizado pelo domínio de espécies dos géneros *Atopobium*, *Prevotella*, *Parvimonas*, *Sneathia*, *Gardnerella*, *Mobiluncus*, e *Peptoniphilus*, entre outros<sup>[18, 19]</sup>.

Ao longo da vida, as mulheres podem experimentar transições entre as diferentes comunidades bacterianas<sup>[15]</sup>, dada a natureza altamente dinâmica dos CSTs. Há estudos que, referem que em alguns casos, estes padrões transitórios podem ser desencadeados por fatores como a menstruação e comportamentos sexuais, enquanto em outros casos podem não ter um fator precipitante conhecido<sup>[13]</sup>.

A composição da microbiota vaginal é, na verdade, influenciada por uma diversidade de fatores, tanto intrínsecos como extrínsecos<sup>[11, 15, 20]</sup>, que poderão explicar a existência de diferentes CSTs, bem como estas transições entre estes.

As alterações na composição da flora vaginal estão diretamente relacionadas com as flutuações hormonais, nomeadamente as variações dos níveis de estrogénio, que ocorrem ao longo das diferentes fases da vida da mulher<sup>[20]</sup>. Acredita-se que após o nascimento e por um curto período, as recém-nascidas tenham um microbioma vaginal dominado por *Lactobacillus* semelhante ao da mãe, devido à presença de estrogénio materno residual<sup>[21]</sup>. Posteriormente, durante a infância, já sem a influência das hormonas maternas, este passa a ser dominado por

bactérias anaeróbicas Gram-positivas (gêneros *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Propionibacterium*), bactérias anaeróbicas Gram-negativas (gêneros *Bacteroides*, *Fusobacterium* e *Veillonella*), bem como por bactérias aeróbicas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans* e *Enterococcus faecalis*)<sup>[21, 22]</sup>. Com o aumento dos níveis de estrogênio na puberdade, o microbioma vaginal das adolescentes começa a aproximar-se daquele que será o microbioma das mulheres em idade reprodutiva, descrito anteriormente<sup>[22, 23]</sup>. Por fim, com o início da menopausa, os níveis de estrogênio diminuem, assim como a quantidade de glicogênio no epitélio vaginal, o que leva a uma redução da prevalência de *Lactobacillus* e a um aumento do pH vaginal, o que promove a colonização da vagina por microrganismos nocivos como *Escherichia coli*, *Candida*, *Enterobacter* e *Gardnerella*. Aliás, é importante destacar que a baixa abundância deste gênero tem sido consistentemente associada ao aparecimento de sintomas característicos da menopausa, tais como secura e atrofia vaginal<sup>[23, 24]</sup>.

O tipo de comunidade bacteriana da microbiota vaginal parece também ser influenciado pela origem étnica e geográfica da mulher<sup>[3]</sup>. Estudos demonstraram que 90% das mulheres caucasianas e 80% das asiáticas possuem uma microbiota vaginal dominada por *Lactobacillus*, enquanto apenas 60% das mulheres africanas e latino-americanas apresentam este perfil microbiano<sup>[25]</sup>. Isto é, os CST-I, II, III e V são mais frequentemente encontrados em mulheres caucasianas e asiáticas, enquanto o CST-IV é predominantemente observado em mulheres de origem africana e hispânicas<sup>[11]</sup>. Estas diferenças poderão estar relacionadas com fatores genéticos, ambientais e comportamentais, que ainda não são completamente compreendidos.

Adicionalmente, estudos com gêmeos monozigóticos e dizigóticos sugerem que a composição deste microecossistema é influenciada por fatores genéticos<sup>[26]</sup>, que modificam a sua composição e estabilidade, apesar das evidências ainda serem escassas. No entanto, crê-se que alguns polimorfismos genéticos, capazes de interferir na sinalização do sistema imunológico inato, possam estar ligados a uma flora vaginal menos equilibrada<sup>[26]</sup>. Num estudo foi observado que um polimorfismo alélico no intrão de um gene da família da interleucina-1, especificamente o IL1RN2, está relacionado a um aumento do pH vaginal e, em mulheres negras, a uma redução na presença de *Lactobacillus* <sup>[11]</sup>.

O microbioma vaginal é igualmente modificado por uma variedade de fatores relacionados com o estilo de vida, incluindo a dieta, a atividade sexual, as práticas de higiene, o uso de antibióticos, a utilização de contraceptivos, o tabagismo, o stress e a obesidade<sup>[26]</sup>. Entre estes fatores, a dieta tem sido alvo de particular interesse, uma vez que já foi demonstrado que é um dos principais modeladores do microbioma intestinal, supondo-se assim que poderá ter, de igual forma, impacto importante na microbiota vaginal. Alguns estudos sugerem que uma dieta rica em amido

pode promover a secreção de glicogénio vaginal, favorecendo a dominância de *Lactobacillus*, enquanto uma dieta rica em gordura pode aumentar os níveis de estradiol sérico, e contribuir para efeitos semelhantes<sup>[23, 26]</sup>. No entanto, estas hipóteses carecem de evidências robustas, destacando-se a necessidade de mais estudos intervencionais que explorem diretamente esta relação. O tabagismo, por outro lado, tem sido consistentemente associado à disbiose vaginal e à prevalência de vaginose bacteriana (VB). Um estudo piloto mostrou que mulheres com um microbioma CST-IV tinham 25 vezes mais probabilidade de serem fumadoras do que aquelas com um microbioma CST-I<sup>[26]</sup>. Estes dados suportam a hipótese de que o tabagismo reduz os níveis de *L. crispatus* e *L. iners*<sup>[15]</sup>, contribuindo para um desequilíbrio deste microssistema. As práticas de higiene íntima também desempenham um papel crucial na manutenção do equilíbrio do microbioma vaginal. A lavagem vaginal, frequentemente designada por "ducha vaginal", tem sido associada à diminuição da percentagem de *Lactobacillus* e ao aumento da presença de bactérias patogénicas<sup>[15]</sup>. No que diz respeito aos métodos contraceptivos, os dispositivos intrauterinos (DIU) mostraram um impacto direto na composição deste microbioma, podendo alterar a presença de bactérias específicas, como *L. gasseri* e *Sneathia*, levando à redução de microrganismos benéficos e ao aumento do risco de VB<sup>[12, 15]</sup>. A atividade sexual é outro fator determinante, havendo alguns autores que têm demonstrado que a disbiose vaginal está relacionada com a frequência de relações sexuais vaginais e com o número de parceiros sexuais, tendo sido comprovado o efeito protetor do uso do preservativo<sup>[26]</sup>.

### Microbioma Cervical

Em mulheres em idade fértil, o microbioma cervical tende a apresentar uma composição similar à do microbioma vaginal<sup>[7, 27]</sup>, mantendo-se uma clara dominância pelo género *Lactobacillus*.

Estudos demonstraram que o microbioma cervical em mulheres saudáveis apresenta uma elevada percentagem de *Lactobacillus*, podendo este género representar até 97,56% das comunidades microbianas detetadas em amostras de muco cervical, com especial destaque para as espécies *L. crispatus* e *L. iners*<sup>[28, 29]</sup>. Embora o género *Lactobacillus* seja amplamente reconhecido como o género dominante, alguns estudos relatam uma codominância com o género *Prevotella*<sup>[6]</sup>, enquanto outros realçam a presença de *Gardnerella*, *Veillonella*, *Sneathia* e *Fusobacterium* como os géneros mais frequentes após o *Lactobacillus*<sup>[30]</sup>. Curiosamente, houve um estudo único que descreveu o género *Acinetobacter* como dominante, seguido pelos géneros *Pseudomonas*, *Comamonadaceae*, *Cloacibacterium* e que o *Lactobacillus* representaria uma menor percentagem (19,24%)<sup>[31]</sup>. Esta diferença poderá ser explicada por diferentes abordagens metodológicas ou por condições fisiológicas distintas.



Curiosamente, observou-se também que existe uma forte correlação microbiana entre as amostras vaginais, cervicais, endometriais e da cavidade peritoneal no mesmo indivíduo<sup>[30]</sup>. Com base nisto, pressupõem-se que a partir da análise da microbiota cervical se poderá avaliar o estado do útero e até mesmo da cavidade de peritoneal<sup>[32]</sup>.

### Microbioma Endometrial

Historicamente, acreditava-se que a cavidade uterina era estéril, no entanto, na última década, graças ao advento da tecnologia de Sequenciação de Nova Geração (NGS), nomeadamente através da sequenciação do gene 16S rRNA, diversos estudos propuseram que o endométrio apresenta um microbioma único e funcional<sup>[28, 33, 34]</sup>. É frequentemente descrito como sendo heterogéneo e de baixa biomassa, estimando-se que sua carga bacteriana seja 100 a 10.000 vezes inferior à encontrada no microbioma vaginal<sup>[7, 35]</sup>.

Esta descoberta levantou múltiplas questões no que diz respeito à via de colonização do útero. A teoria mais amplamente aceite é que a colonização deste órgão resulte da ascensão dos microrganismos presentes na vagina e no colo do útero<sup>[7, 35]</sup>. Outra hipótese igualmente debatida é a colonização por via hematológica, segundo a qual, os microrganismos presentes nos intestinos, cavidade oral e trato respiratório alcançariam o útero através da circulação sanguínea<sup>[35]</sup>. Hipotetiza-se que outras vias possam influenciar esta colonização, nomeadamente procedimentos médicos<sup>[35]</sup> e a transmissão vertical do microbioma materno durante o parto<sup>[36]</sup>.

Apesar do interesse crescente no potencial do microbioma endometrial em diversas áreas da ginecologia e da obstetrícia, a sua composição continua a ser alvo de discussão e investigação, dado que até ao momento, ainda não se conseguiu chegar ao consenso do qual será a sua constituição “saudável” ou “normal”<sup>[35]</sup>. No entanto, com base nos estudos atuais, poder-se-ão já realizar algumas generalizações, nomeadamente, que os principais filos encontrados na microbiota endometrial são o *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* e *Actinobacteria*<sup>[35]</sup>.

Uma grande parte da comunidade científica defende que o microbioma endometrial é dominado pelo género *Lactobacillus*, tal como acontece no microbioma vaginal, havendo já vários estudos que apoiam esta perspetiva <sup>[33, 34, 37, 38]</sup>. Num destes estudos, Mitchell *et al.* analisaram os *swabs* endometriais de 58 mulheres submetidas a histerectomia por causas benignas e concluíram que 95% das mulheres estava colonizada e que as espécies mais abundantes eram *L. iners*, *L. crispatus*, seguidos, de *Prevotella spp.*<sup>[33]</sup>. De forma semelhante, Moreno *et al.*, num estudo realizado em 13 mulheres férteis, constataram que o género *Lactobacillus* era o mais frequentemente encontrado nas amostras de fluido endometrial desta população. Com base nesta descoberta, este estudo propôs classificar a microbiota endometrial em *Lactobacillus-dominated*

(LD, >90% de *Lactobacillus spp.*) e *Non-Lactobacillus-dominated* (NLD, <90% de *Lactobacillus spp.* e >10% de outras bactérias), com base na abundância relativa deste gênero bacteriano<sup>[34]</sup>. Esta classificação demonstrou-se, mais tarde, valiosa na avaliação dos desfechos reprodutivos<sup>[39]</sup>. Posteriormente, Kyono e colaboradores avaliaram o microbiota do fluido endometrial de sete voluntárias saudáveis e observaram, novamente, que a maioria (6/7) apresentavam uma alta abundância de *Lactobacillus*, chegando este gênero a representar mais de 90% da composição microbiana deste nicho<sup>[38]</sup>.

Contudo, esta perspectiva não é consensual. Existem autores que argumentam que o microbioma endometrial poderá ser mais heterogêneo e não dominado apenas por um gênero bacteriano, sem que isso seja sinônimo de doença ou disbiose<sup>[29, 32, 40]</sup>. Chen *et al.* verificaram que as amostras endometriais de 80 mulheres submetidas as cirurgias ginecológicas possuíam um microbioma constituído predominantemente pelos gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Vagococcus* e *Sphingobium* e que o gênero *Lactobacillus* não era dominante<sup>[32]</sup>. Um estudo posterior de Winters *et al.* corrobora estes achados, afirmando que o gênero mais representado nas amostras de *swabs* endometriais era o *Acinetobacter*, seguido pelos gêneros *Escherichia* e *Pseudomonas* e que a percentagem de *Lactobacillus* era inferior a 1%<sup>[31]</sup>. Também Li *et al.*, após a avaliação de amostras de 137 mulheres chinesas submetidas a cirurgia ginecológica, descreveram que este microssistema apresentava uma composição predominantemente formada por membros das famílias *Moraxellaceae*, *Propionibacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* e *Streptococcaceae*<sup>[29]</sup>. Mais recentemente, uma análise de biópsia endometriais de mulheres saudáveis revelou uma composição ainda mais complexa, incluindo não só bactérias(85%), mas também fungos(10%) e vírus(5%) e até arqueas(0,3%); e descrevendo espécies como *Clostridium botulinum*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pasteurella multocida* como as mais abundantes<sup>[40]</sup>.

Esta diversidade de resultados poderá ser, em pequena parte, explicada por alterações fisiológicas que ocorrem ao longo da vida da mulher. De forma semelhante ao que acontece no microbioma vaginal, hipotetiza-se que também o microbioma endometrial possa ser modulado por fatores tais como a idade, etnia, alterações hormonais, atividade sexual e a utilização de dispositivos intrauterinos<sup>[32, 41]</sup>. Um estudo realizado em 2021, por Wang e colaboradores comprovou que a composição desta flora varia com a idade. Foi constatada uma redução gradual na diversidade alfa (diversidade intraindividual) com o avançar da idade, enquanto a diversidade beta (diversidade interindividual) aumentou com o envelhecimento, sendo menor em mulher com 20 anos ou menos<sup>[42]</sup>. O aumento da diversidade beta em mulheres mais velhas, sugerindo uma maior heterogeneidade na composição uterina entre indivíduos, poderá ser explicado pela influência de fatores ambientais, nomeadamente relacionados com o estilo de vida e história obstétrica (número de abortos e partos vaginais<sup>[41, 43]</sup>).

Um outro fator descrito como potencial modificador do microbioma endometrial são as alterações hormonais associadas às diferentes fases do ciclo menstrual. De facto, está descrito por alguns autores que a abundância de bactérias, vírus e arqueas, difere significativamente entre as fases secretora e proliferativa<sup>[40, 43]</sup>. Estudos distintos identificaram uma maior abundância de *Prevotella* spp. na fase proliferativa<sup>[30, 43]</sup> e um incremento de *Sneathia* spp. na fase secretora, reforçando esta diferença da composição nas diferentes fases do ciclo menstrual<sup>[30]</sup>. Anteriormente, um outro estudo demonstrou igualmente que os géneros *Propionibacterium*, *Pseudomonas* e *Sphingobium*, também sofriam flutuações no decorrer do ciclo, apresentando uma regulação positiva na fase proliferativa<sup>[32]</sup>. Foram também relatadas variações na abundância de *Lactobacillus*, ao longo do ciclo, com valores inferiores 50% após a menstruação e aumentando até 70% na fase lútea<sup>[30]</sup>. Por outro lado, o microbioma uterino parece manter-se relativamente estável nas fases endometriais pré-recetivas e recetivas (2 e 7 dias após o pico da hormona luteinizante (LH))<sup>[34]</sup>.

Também o tratamento com hormonas exógenas, nomeadamente associados a PMA, parece alterar a constituição do microssistema uterino. Um estudo piloto avaliou o impacto da estimulação ovárica e da suplementação com progesterona na microbioma endometrial e concluiu que estas intervenções induzem mudanças significativas neste microssistema durante a janela de implantação. Os resultados demonstraram que, após estes procedimentos, há um aumento da biodiversidade local, acompanhado por uma diminuição da proporção relativa de *Lactobacillus* endometriais e por um aumento de bactérias como *Atopobium*, *Escherichia-Shigella* e *Prevotella*<sup>[44]</sup>.

Neste nicho anatómico é de especial relevância considerar que a variabilidade encontrada entre os diversos estudos poderá não ser apenas fruto das alterações fisiológicas e ambientais discutidas anteriormente, mas poderá ser também resultante da utilização de diferentes técnicas e metodologias de análise<sup>[35]</sup>. O microbioma endometrial, como todos os microbioma de baixa biomassa, é particularmente desafiante a nível técnico dado ser muito suscetível a contaminações<sup>[45]</sup> e limitações metodológicas ao longo de todo processo analítico, desde a sua colheita até à sequenciação e análise dos dados<sup>[46]</sup>. O risco de contaminação está, em grande parte, associado ao método de colheita utilizado em cada estudo, sendo que as vias de colheita transcervicais aumentam a possibilidade de contaminantes vaginais e cervicais na amostra em comparação com a colheita pós-histerectomia, que permite um ambiente estéril e mais controlado<sup>[35]</sup>. Por outro lado, a escolha dos *primers* da região V do gene 16S rRNA, os métodos de extração de DNA utilizados e a classificação das unidades taxonómicas operacionais também foram identificados como possíveis causas de variabilidade<sup>[35]</sup>. De igual forma é importante lembrar que a sequenciação do 16S rRNA não permite distinguir entre bactérias viáveis e fragmentos

bacterianos, o que pode levar a uma sobrestimativa dos microrganismos presentes no endométrio<sup>[46]</sup>.

### Microbioma das Trompas de Falópio e do Ovário

O conhecimento sobre o microbioma das trompas de Falópio e dos ovários permanece limitado, em grande parte devido ao número reduzido de ensaios dedicados a estes órgãos reprodutivos. Esta lacuna é atribuída à dificuldade e ao risco de acesso a estas estruturas em mulheres saudáveis<sup>[8]</sup>, assim como, às limitações metodológicas dos estudos já disponíveis, tais como pequeno tamanho amostral e diferentes modos de colheita da amostra. Contudo, assim como no útero, já foi demonstrado que estas estruturas se encontram colonizadas, por comunidades microbianas endógenas e que estas são afetadas por mudanças hormonais, pela utilização de antibióticos e que exibem tropismo biogeográfico<sup>[6, 28, 47]</sup>.

O microbioma das trompas de Falópio tem demonstrado apresentar uma baixa biomassa, mas uma diversidade microbiana considerável, similar àquela observada no endométrio<sup>[32]</sup>. Em um estudo conduzido por Chen *et al.* foi observado que os géneros *Acinetobacter*, *Comamonas*, *Pseudomonas*, *Dysgonomonas* eram os que apresentavam maior abundância relativa na microbiota tubária, em contraste com o género *Lactobacillus* que representava apenas 1,69%<sup>[32]</sup>. Numa investigação subsequente, a microbiota das trompas de Falópio foi avaliada em 16 mulheres concluindo-se que *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Lactobacillus* eram os géneros predominantes, seguidos pelos *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Propionibacterium* e *Prevotella*. Curiosamente, observaram-se diferenças constitucionais entre as trompas direitas e esquerdas com *Staphylococcus spp.* sendo mais abundante à direita e, *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.* e *Prevotella spp.* mais prevalentes à esquerda<sup>[47]</sup>. Estas diferenças podem estar relacionadas com variações anatómicas, fisiológicas ou até mesmo com fatores externos, como infeções ou inflamações localizadas.

Miles e colaboradores analisaram a composição das comunidades microbianas nas trompas de Falópio e nos ovários de 10 mulheres submetidas a histerectomia com salpingo-ooforectomia bilateral. As amostras das trompas relevaram a presença de espécies dos géneros *Bacteroides*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Coprococcus* e *Hymenobacter*, enquanto nas amostras ováricas foram identificados os géneros *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Escherichia* e *Blautia*<sup>[6]</sup>. Análises subsequentes do fluido folicular ovárico revelaram a presença de *L. iners*, *Corynebacterium auromuosum* e dos géneros *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Prevotella* e *Staphylococcus spp.*<sup>[28]</sup>.

## DISBIOSE, INFERTILIDADE E PROcriação MEDICAMENTE ASSISTIDA

A infertilidade é, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), definida como a incapacidade em engravidar após 12 meses ou mais de relações sexuais regulares desprotegidas. Estima-se que cerca de uma em cada seis pessoas enfrente problemas de infertilidade em algum momento das suas vidas<sup>[2, 48]</sup>.

As principais causas de infertilidade feminina identificadas incluem os distúrbios da ovulação, endometriose, anomalias estruturais uterinas e fatores tubários<sup>[2]</sup>. No entanto, cerca de 30% dos casos de infertilidade, ainda permanecem sem uma causa identificada, sendo comumente classificados como infertilidade inexplicada ou idiopática.

Atualmente, um dos principais desafios para a comunidade científica e médica é identificar as causas ocultas da infertilidade e aprimorar a eficiência e a efetividade das técnicas de PMA<sup>[2]</sup>. Neste contexto, e com os avanços recentes na área, o microbioma do TRF tem emergido como um tema de grande relevância no estudo da infertilidade.

De facto, estudos recentes têm evidenciado uma ligação significativa entre a composição desta microbiota e casos de infertilidade, destacando a necessidade de aprofundar a investigação nesta área para otimizar os resultados reprodutivos<sup>[10, 18]</sup>.

### Microbioma Vaginal

O microbioma vaginal desempenha um papel fundamental na saúde reprodutiva das mulheres. Com o aumento global dos casos de infertilidade, torna-se crucial compreender de que forma o desequilíbrio na homeostase deste microssistema, isto é, a sua disbiose, influencia os resultados reprodutivos e o sucesso das técnicas de PMA. São exemplos conhecidos de disbiose vaginal a VB, vaginite aeróbica, candidíase vaginal e tricomóníase. Entre eles, a forma mais comum, e mais estudada neste contexto, é a VB, que se caracteriza por uma diminuição na quantidade de *Lactobacillus* e uma maior diversidade de outras bactérias<sup>[39]</sup>. Este desequilíbrio da microbiota vaginal afeta 20-50% das mulheres em idade reprodutiva, muitas vezes de forma assintomática, e representa um fator de risco conhecido para a fertilidade<sup>[21]</sup>.

Está descrito na literatura que a composição do microbioma vaginal é consideravelmente diferente entre mulheres saudáveis/férteis e mulheres inférteis, hipotetizando-se que, nestas últimas, a própria etiologia da fertilidade possa ser também um fator diferenciador entre elas<sup>[2]</sup>. De uma forma geral, estudos indicam, que as mulheres com infertilidade apresentam uma microbiota mais heterogénea, caracterizada por uma diminuição do género *Lactobacillus* e um aumento de outras bactérias<sup>[49]</sup>, ou seja, que apresentaram um microbioma que em tudo se aproxima daquele descrito como VB. Isto foi observado, num estudo transversal realizado por Babu *et al.*, em que a presença de um microbioma LD foi inferior no grupo de mulheres com infertilidade quando

comparada com a o grupo de mulheres saudáveis (3,5% vs. 27,8%). Além disso, observou-se também uma quantidade elevada de bactérias associadas à VB no grupo de mulheres inférteis, nomeadamente *Enterococcus*, *E. Coli* e *Staphylococcus*<sup>[50]</sup>. De forma similar, um estudo mais recente, constatou que mulheres com infertilidade idiopática apresentavam um aumento da diversidade da microbiota vaginal, associada a uma diminuição do género *Lactobacillus* e a presença aumentada de *Gardnerella*, *Prevotella*, *Enterobacteria* e *Atopobium*<sup>[2]</sup>. De acordo com uma revisão sistemática de 2023, as mulheres inférteis apresentam, frequentemente, no seu microbioma vaginal espécies dos géneros *Gardnerella*, *Atopobium*, *Prevotella*, *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Sneathia*, *Staphylococcus* e *Enterococcus*, tendo também sido relatados com menor frequência os géneros *Candida* e *Ureaplasma* e as espécies *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma hominis*<sup>[49]</sup>.

Adicionalmente, a microbiota vaginal parece influenciar os resultados das técnicas de PMA<sup>[51-53]</sup>. Diferentes pesquisas têm revelado que a dominância do género *Lactobacillus* tem um efeito benéfico no microbioma vaginal, estando associada a melhores resultados reprodutivos, tais como o aumento das taxas de gravidez e um aumento do número de nados-vivos<sup>[54, 55]</sup>. Por outro lado, a presença de outras bactérias tais como *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Atopobium vaginae* e *G. vaginalis* tem sido descrita como prejudicial, encontrando-se associada à diminuição das taxas de implantação, gravidez e número de nados-vivos e a um aumento de taxas de perda gestacional precoce<sup>[34, 54, 56]</sup>. Num estudo realizado por Haahr *et al.*, foi analisada a microbiota vaginal de 84 mulheres submetidas a tratamentos de FIV. Os resultados demonstraram uma forte correlação entre a composição da microbiota vaginal e as taxas de sucesso na gravidez. Do total de participantes, 22 mulheres apresentavam uma composição alterada da microbiota (com alta percentagem de *G. vaginalis* e/ou *A. vaginae*), e destas apenas 9% alcançaram uma gravidez clínica. Por outro lado, entre as 62 mulheres com uma composição “saudável” da microbiota, isto é, com alto teor de *Lactobacillus*, 47% obtiveram uma gravidez clínica<sup>[56]</sup>. Posteriormente, Bernabeu *et al.* obtiveram resultados semelhantes. Num estudo em que avaliaram a microbiota vaginal de 31 mulheres submetidas a PMA, concluíram que um maior índice de diversidade alfa foi encontrado em mulheres que não engravidaram, em comparação com aquelas que engravidaram, embora esta diferença não tenha atingido significância estatística. Além disso, observaram que as amostras de mulheres que engravidaram apresentavam uma maior presença de *Lactobacillus spp.*<sup>[51]</sup>. Estes dados indicam que uma microbiota vaginal menos heterogénea e dominada por *Lactobacillus* poderá estar associada tanto ao sucesso reprodutivo e como ao sucesso dos procedimentos de PMA<sup>[51, 56]</sup>.

Há, no entanto, um estudo da autoria de Koedooder *et al.* que refere que apesar de uma alta abundância de *Lactobacillus* a nível vaginal parece ser vantajosa para o resultado de FIV e FIV-

ICSI, diferentes espécies de *Lactobacillus* (*L. crispatus*, *L. iners* e *L. gasseri*) podem exercer efeitos distintos na receptividade endometrial. Os resultados deste estudo demonstraram que mulheres com microbioma eubiótico com alta abundância relativa ( $\geq 60\%$ ) de *L. crispatus* tinham 24% de chance de engravidar após a primeira transferência embrionária, enquanto aquelas com alta abundância relativa ( $\geq 60\%$ ) de *L. iners* tinham 50% de chance de engravidar. Sugerem que esta diferença entre espécies esteja associada às suas características metabólicas, tais como a capacidade de produzir ácido láctico a partir da degradação da conversão de glicogénio<sup>[54]</sup>. Aconselham, então, que em investigações futuras não se generalize o efeito benéfico do género *Lactobacillus*, mas sim, que se tenha em conta que diferentes espécies de *Lactobacillus*.

Com base nestes resultados, diversos autores propõem que se avalie a microbiota vaginal a todas as mulheres que vão ser submetidas a técnicas de PMA, e se necessário, fornecer tratamentos para corrigir desequilíbrios antes de iniciar estes procedimentos.

### **Microbioma Cervical**

Até ao momento, apenas um estudo avaliou o potencial impacto que o microbioma cervical poderá ter nos resultados reprodutivos da PMA. A investigação de Villani *et al.* demonstrou que existe uma associação entre a composição da microbiota cervical e os desfechos reprodutivos de mulheres submetidas a técnicas de PMA. Os resultados detetaram, ao nível de género, um aumento significativo de *Bifidobacterium* no grupo favorável, enquanto no grupo desfavorável se observou uma maior abundância relativa de *Atopobium*. Para além disso, ao nível de espécie, verificaram que um aumento de abundância relativa de *L. inners* e uma diminuição do *L. crispatus* estava associada a desfechos negativos. Concluíram, assim, que o microbioma do colo do útero poderá ter um papel nos resultados da PMA<sup>[57]</sup>.

### **Microbioma Endometrial**

Após a descoberta de que a cavidade uterina apresenta um microssistema endógeno, o microbioma endometrial tem sido cada vez mais reconhecido como um potencial fator determinante na saúde reprodutiva feminina. Desta forma, a sua disbiose tem sido alvo de grande número de investigações<sup>[39, 41]</sup>. Estudos recentes demonstram que a composição microbiana do endométrio poderá ser um elemento importante para o sucesso reprodutivo, influenciando a implantação embrionária, a manutenção da gravidez e, ainda, o resultado das técnicas de PMA<sup>[36, 41]</sup>.

Algumas investigações revelaram diferenças na composição microbiana do endométrio entre mulheres férteis e inférteis<sup>[34, 38]</sup>, tal como acontece na microbiota vaginal. Acredita-se que

mulheres inférteis apresentem, com maior frequência, um microbioma com uma abundância relativa de *Lactobacillus spp.* inferior aquela encontrada em mulheres férteis<sup>[58]</sup>. De facto, Moreno *et al.* constataram que 52,6% das mulheres inférteis avaliadas em um estudo, que visava analisar o impacto da comunidade microbiana endometrial nos resultados reprodutivos de doentes inférteis submetidas a FIV, apresentavam um microbioma NLD. Em contraste, apenas 36,3% das mulheres férteis apresentavam uma microbiota NLD<sup>[34]</sup>. De forma semelhante, Kyono *et al.* observaram que 62% das doentes inférteis submetidas a FIV apresentavam uma composição bacteriana endometrial anormal, ou seja, definida como NLD. Os autores constataram, também, que a percentagem de *Lactobacillus* nesta flora diferia entre mulheres inférteis submetidas a FIV, mulheres inférteis não submetidas a FIV e voluntárias saudáveis (63,90 % vs. 96,20% vs. 99,50 %), sendo significativamente menor naquelas submetidas a FIV. Concordantemente, a percentagem de mulheres com microbioma LD foi significativamente menor no grupo submetido a FIV, quando comparado com mulheres inférteis não submetidas a FIV e voluntárias saudáveis (38% vs. 73,9% vs. 85,7%)<sup>[38]</sup>. A discrepância na percentagem de *Lactobacillus* entre as mulheres inférteis submetidas e não submetidas a FIV poderá ser explicada por diversos fatores, nomeadamente, um período de infertilidade mais longo, exames transvaginais frequentes, história passada de inseminações intrauterinas, administração frequente de antibióticos, flutuações hormonais devido à estimulação ovárica, entre outros.

A análise do microbioma endometrial em mulheres inférteis submetidas a técnicas de PMA revelou, não só uma composição microbiana distinta da observada em mulheres férteis, conforme referido anteriormente, mas, permitiu também caracterizar este microssistema durante a transferência embrionária (ET), uma momento chave no sucesso destas técnicas. Isto é possível através da análise de amostras de cateter de transferência<sup>[59]</sup>. Atendendo a este potencial, diversos autores investigaram de que forma o microbioma uterino no momento da transferência embrionária pode influenciar os resultados reprodutivos das técnicas de PMA.

Neste contexto, o microbioma LD tem sido frequentemente associada a melhores resultados reprodutivos. Moreno *et al.* foram pioneiros ao demonstrar esta relação, num estudo que classificou a microbiota endometrial de mulheres submetidas a FIV em dois grupos, microbiota LD e microbiota NLD, correlacionando-os com os desfechos reprodutivos. Os resultados mostraram que mulheres com microbiota LD apresentaram taxas de implantação significativamente maiores (60,7% vs. 23,1%), assim como taxas mais elevadas de gravidez (70,6% vs. 33,3%) e de nascidos vivos (58,8% vs. 6,7%). Além disso, o grupo NLD teve taxas de aborto mais altas, embora esta diferença não tenha atingido significância estatística (16,7% vs. 60%,  $p = 0,07$ ). A percentagem de *Lactobacillus* foi considerada, por estes autores, um fator preditivo para o sucesso reprodutivo na FIV, e o valor de 90% foi estabelecido como o ponto de corte adequado para esta classificação<sup>[34]</sup>.



De forma complementar, Kyono *et al.* realizaram um estudo preliminar que reforça estas observações. Neste estudo, a percentagem mediana de *Lactobacillus* no endométrio em 18 casos de gravidez foi de 96,45%, sugerindo que um endométrio LD pode favorecer a implantação<sup>[38]</sup>.

Como referido anteriormente, acredita-se que os *Lactobacillus* presentes no microbioma vaginal sejam responsáveis por manter a hemostasia local através da produção de ácido láctico, promovendo a acidificação do ambiente vaginal e, assim, inibindo o crescimento de bactérias potencialmente patogénicas<sup>[34]</sup>. Pensou-se que, a nível uterino, este género bacteriano pudesse desempenhar uma função semelhante, ajudando a manter um estado eubiótico<sup>[41]</sup>. Um estudo propôs, assim, que uma microbiota LD produziria valores de pH mais baixos em comparação à microbiota NLD. Contudo, a avaliação do pH das amostras constatou uma ampla gama de valores, sem qualquer correlação com a composição bacteriana deste nicho<sup>[34]</sup>. Estes resultados sugerem que a regulação do pH endometrial pode não ser o principal mecanismo pelo qual o género *Lactobacillus* influencia a eubiose endometrial, pelo que mais estudos são necessários para entender completamente de que forma a dominância deste género favorece a implantação e o sucesso reprodutivo.

Por outro lado, a disbiose endometrial, caracterizada pela presença de bactérias patogénicas como, por exemplo, *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Chryseobacterium*, *Gardnerella*, *Streptococcus*, *Klebsiella* e *Neisseria*, foi relacionada a desfechos reprodutivos desfavoráveis<sup>[5]</sup>. De facto, Moreno *et al.* compararam os perfis endometriais de mulheres com gravidez bem-sucedida, resultando num nado-vivo, e aquelas que apresentaram resultados adversos, como gravidez bioquímica, aborto espontâneo e ausência de gravidez. Os investigadores observaram que a ausência de gravidez e a gravidez bioquímica estavam associadas a uma maior abundância dos géneros *Gardnerella*, *Klebsiella*, *Streptococcus* e *Enterococcus*. Por outro lado, o aborto espontâneo foi relacionado com o aumento da presença de *Neisseria* e *Klebsiella*<sup>[5]</sup>. Vários estudos relatam pontualmente o isolamento de outras espécies bacterianas também elas possivelmente relacionadas com maus desfechos reprodutivos, tais como: *Kocuria dechangensis*<sup>[60]</sup>; *Romboutsia*, *Psychrobacter* e *Roseiflexaceae* (correlação negativa com gravidez clínica)<sup>[55]</sup>; *Enterobacter*, *Nocardioide*s, e *Corynebacterium* (associadas a abortos espontâneos)<sup>[55]</sup>.

Além de analisar de forma isolada a dominância de *Lactobacillus* e a presença de bactérias patogénicas, pesquisas mais recentes têm explorado a interação entre estes dois fatores de maneira simultânea. Miyagi *et al.* realizaram um estudo com 35 mulheres inférteis submetidas a transferências de embriões de boa qualidade. As doentes foram divididas de acordo com a abundância de *Lactobacillus* spp.(L) e bactérias patológicas (PB), em quatro grupos: Alta L + Baixa PB, Alta L + Alta PB, Baixa L + Baixa PB e Baixa L + Alta. Os valores de corte foram de 46% para

*Lactobacillus* spp. e 18,7% para bactérias patológicas. O estudo revelou que as gestações foram significativamente mais frequentes no grupo de Alta L + Baixa PB (17/22; 77,3%), enquanto as mulheres não grávidas estavam significativamente mais presentes no grupo de Baixa L + Alta PB (5/6; 83,3%)<sup>[61]</sup>. Estes resultados corroboram a hipótese de que um ambiente endometrial dominado por *Lactobacillus* e com baixa presença de bactérias patogênicas poderá estar associado ao sucesso reprodutivo.

Apesar de vários estudos sugerirem uma associação clara entre a microbiota LD e um sucesso das técnicas de PMA, há também outros que apresentam resultados que desafiam esta relação direta<sup>[60, 62-64]</sup>. Por exemplo, Franasiak *et al.* examinaram a microbiota de 33 mulheres submetidas a FIV no momento da transferência embrionária e identificaram diferenças nas espécies microbianas presentes consoante o sucesso reprodutivo. No entanto, estas diferenças não atingiram relevância estatística<sup>[62]</sup>. De forma semelhante, Hashimoto *et al.* avaliaram o impacto da disbiose endometrial na implantação de blastocistos em 99 mulheres submetidas FIV. Os resultados revelaram que as taxas de gravidez por transferência (52,9% vs. 54,8%) e de aborto espontâneo (11,1% vs. 5,9%) foram semelhantes entre mulheres com endométrio eubiótico (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium* spp. ≥80%) e disbiótico (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium* spp. <80% com ≥20% de outras bactérias). Além disso, os perfis bacterianos endometriais das gestantes com disbiose não diferiram significativamente dos observados em casos sem gravidez<sup>[63]</sup>.

Outro estudo relevante, conduzido por Diaz-Martínez *et al.*, focou-se na diversidade microbiana (alfa e beta) de amostras endometriais recolhidas durante a fase secretória do ciclo menstrual anterior à transferência de embriões congelados. Os investigadores não detetaram diferenças estatisticamente significativas entre mulheres que alcançaram gravidez e aquelas que não obtiveram sucesso. A análise taxonómica das amostras mostrou, todavia, que as mulheres que engravidaram apresentavam maior abundância dos géneros *Lactobacillus*, *Gardnerella*, *Burkholderia* e *Anaerobacillus*. Por outro lado, os géneros *Streptococcus*, *Ralstonia*, *Prevotella* e *Delftia* foram mais prevalentes em mulheres que não engravidaram<sup>[64]</sup>.

Riganelli *et al.* avaliaram as biópsias endometriais de 34 mulheres submetidas a estimulação hormonal e constataram que não havia diferença significativa entre a microbiota endometrial entre mulheres grávidas e não grávidas. No entanto, os autores referem diferenças entre os dois grupos estudados: nas mulheres grávidas verificou-se uma ausência total do género *Lactobacillus*, predominância de *Lachnospiraceae* e *Enterobacteriaceae* e uma diversidade alfa reduzida, já nas não grávidas houve um aumento de espécies de *Lactobacillus*<sup>[60]</sup>, o que se afasta significativamente do observado nos estudos anteriores.

Há, também, relatos de casos de gravidez bem-sucedidas em mulheres com microbiota NLD que conceberam sem intervenção direcionada para a microbiota endometrial, indicando que a

ausência de dominância de *Lactobacillus* não é necessariamente um impedimento absoluto para a concepção<sup>[38, 63]</sup>.

Apesar dos avanços que houve no conhecimento do microbioma endometrial, ainda não se chegou a um consenso sobre a sua composição, como referido anteriormente, e consequentemente ainda não se conseguiu estabelecer qual a composição ideal para a implantação embrionária e para o sucesso das técnicas de PMA. Por um lado, alguns estudos apontam para uma associação entre a dominância do género *Lactobacillus* e resultados reprodutivos favoráveis<sup>[5, 34, 38, 61]</sup>, por outro, diversos estudos não suportam esta associação<sup>[60, 62, 63]</sup>. De igual forma, a presença de bactérias potencialmente patogénicas tem sido associada a diversos desfechos negativos, mas os mecanismos envolvidos permanecem pouco compreendidos.

O microbioma uterino revela-se, assim, um possível elemento importante na fertilidade, atuando em conjunto com fatores hormonais e imunológicos, pelo que são necessários mais estudos para entender melhor o papel deste microssistema, qual a sua relevância clínica e qual o seu potencial diagnóstico e terapêutico.

### **Microbioma Endometrial e Patologias Causadoras de Infertilidade**

Como supracitado, alguns estudos tem sugerido uma associação entre o microbioma endometrial e a infertilidade, no entanto, há também estudos que indicam que este possa estar associado a outras patologias ginecológicas, tais como, endometrite crónica, a endometriose, pólipos endometriais, entre outros<sup>[65]</sup>. Muitas destas doenças têm implicações clínicas conhecidas na fertilidade, pelo que perceber de que forma o microbioma endometrial influencia o desenvolvimento/progressão destas patologias poderá ser fundamental para a compreensão dos mecanismos subjacentes à infertilidade. No entanto, a relação de causalidade tem sido difícil de estabelecer, não estando claro se a disbiose uterina é causa ou consequência da doença<sup>[65]</sup> <sup>[66]</sup>

Um exemplo clássico de uma patologia associada as alterações do microbioma endometrial é a endometrite crónica (EC) que se caracteriza pela inflamação continua do endométrio, de etiologia desconhecida<sup>[39]</sup>. Acredita-se, no entanto que poderá ser causada por infeções bacterianas, desequilíbrios hormonais e distúrbios autoimunes<sup>[66]</sup>.

Vários tem sido os microrganismos associados à EC, sendo os mais comuns *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus agalactiae*, em 77,5% dos casos, seguidos por *Mycoplasma/Ureaplasma*, em 25%, e *Chlamydia* em 13%<sup>[67]</sup>. Num estudo, onde se avaliaram biopsias endometriais de mulheres inférteis com e sem EC, constatou-se que a microbiota endometrial das mulheres com EC exibiu um aumento significativo dos géneros *Anaerococcus*, *Bifidobacterium*, *Dialister*, *Gardnerella* e *Prevotella* e uma redução significativa do género

*Lactobacillus* (especialmente de *L. crispatus*), quando comparado com as mulheres sem EC (1,89% vs 80,7%)<sup>[41, 68]</sup>.

Clinicamente, a EC pode se manifestar por dor pélvica, hemorragia uterina anômala e vaginite<sup>[66]</sup>, porém, a grande maioria das mulheres afetadas é assintomática, o que faz que o seu diagnóstico seja difícil e a sua prevalência subestimada<sup>[36]</sup>. Atualmente estima-se que a prevalência de EC seja de 19% na população geral, mas que esta aumente para mais do dobro nas mulheres com infertilidade, estando consistentemente associada a desfechos obstétricos adversos como falha recorrente da implantação (RIF) e perda gestacional recorrente (RPL)<sup>[1]</sup>. Perante isto torna-se fundamental melhorar a eficácia de detecção e tratamento desta patologia de forma a melhorar os *outcomes* reprodutivos das técnicas de PMA. Apesar da etiologia multifatorial desta patologia, um estudo demonstrou que após o tratamento com antibioterapia as taxas de gravidez e de nados-vivos aumentou em mulheres com EC, o que demonstra que o microbioma poderá ter um papel importante nesta patologia<sup>[41]</sup>.

Outra patologia cuja relação com o microbioma tem sido amplamente estudada é a endometriose. Esta doença é caracterizada pela presença de glândulas e estroma endometrial fora da cavidade uterina. Clinicamente, o espectro de apresentação é muito variado e dependente da localização dos endometriomas, mas tipicamente, manifesta-se por dismenorreia, dor pélvica, dispareunia e infertilidade<sup>[1]</sup>.

Apesar de se estimar que afete 10% das mulheres em idade reprodutiva, atualmente, a sua etiologia permanece desconhecida, crendo-se ser multifatorial<sup>[36]</sup>. Recentemente, a presença de agentes patogénicos no endométrio tem emergido como novo fator predisponente ao estabelecimento da endometriose<sup>[1, 36]</sup>. Esta teoria emergiu após um estudo ter demonstrado que o sangue menstrual de mulheres com endometriose apresentava uma elevada percentagem de *E.coli*<sup>[41]</sup>.

Desde então, diversas investigações tem demonstrado que microbiota uterina das mulheres com endometriose é significativamente diferente das mulheres saudáveis<sup>[35]</sup>. De facto, verificou-se que mulheres com endometriose apresentavam um aumento significativo de colonização por *Gardnerella*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Fusobacterium*, *Prevotella* e *Propionibacterium*, bem como, uma diminuição na proporção de *Lactobacillus* na microbiota endometrial<sup>[45]</sup>.

Adicionalmente, observou-se também que mesmo as lesões ectópicas de endometriose apresentam um microbioma próprio caracterizado por concentrações reduzidas de *Lactobacillus* e elevadas de *Alishewanella*, *Enterococcus* e *Pseudomonas*, em comparação com o endométrio normal<sup>[69]</sup>. Um outro estudo descreve, ainda, a composição bacteriana do fluido de um

endometrioma ovárico, referindo que estão presentes bactérias das famílias *Staphylococcaceae* e *Streptococcaceae*<sup>[36]</sup>.

Tanto na EC, como na endometriose parece existir uma alteração do equilíbrio do microbioma endometrial, com uma redução da percentagem de *Lactobacillus* e um aumento de outros géneros potencialmente patógenos. Apesar de mais estudos serem necessários nesta área para determinar de que forma estas alterações contribuem para a progressão das doenças, há evidências crescentes de que o microbioma poderá ter um papel relevante na sua fisiopatologia e que a sua modulação poderá ter impacto em terapêuticas futuras.

### **Microbioma e Falhas Recorrentes da Implantação**

A RIF continua a ser um dos grandes desafios da Medicina da Reprodução. É definida como a incapacidade de alcançar uma gravidez clínica após a transferência de pelo menos quatro embriões de boa qualidade em, no mínimo, três ciclos, frescos ou congelados, em uma mulher com menos de 40 anos<sup>[70]</sup>. Apesar de se estimar que a sua prevalência seja de cerca de 15%, os mecanismos fisiológicos por detrás da sua patogénese mantêm-se desconhecidos<sup>[17]</sup>.

Também aqui, com os recentes avanços no estudo do microbioma do TRF, se debate se alterações neste microssistema poderão contribuir para este desfecho nas técnicas de PMA. Sabe-se que uma implantação embrionária bem-sucedida requer uma complexa sincronização entre um embrião saudável e um endométrio recetivo<sup>[17]</sup>, no entanto, este delicado equilíbrio pode ser comprometido por múltiplos fatores, especulando-se sobre o possível efeito disruptor da disbiose do TRF.

Apesar de poucos, alguns estudos tem explorado esta hipótese. Fu *et al.*, por exemplo, caracterizaram a microbiota vaginal de mulheres com RIF sem causa aparente, utilizando como controlo mulheres que alcançaram uma gravidez bem-sucedida no primeiro ciclo de FIV e observam diferenças significativas entre os dois grupos. O grupo RIF, comparativamente ao grupo controlo, apresentava maior diversidade  $\alpha$  nas amostras vaginais, caracterizada por uma diminuição da proporção de *Lactobacillus* e um aumento de outros géneros, nomeadamente bactérias anaeróbias, tais como *Gardnerella*, *Prevotella* e *Atopobium* (associados à VB) e aeróbias como *Escherichia* e *Streptococcus* (relacionados à vaginite aeróbica e infeções urinárias)<sup>[71]</sup>. De forma semelhante, um estudo subsequente, que avaliou o microbioma vaginal e endometrial de mulheres com RIF e controlos saudáveis com infertilidade por fator masculino, reforça esta mesma associação, demonstrando que mulheres com RIF apresentavam uma percentagem baixa de *Lactobacillus*, a nível vaginal (76.4% vs. 91,8%) e uma maior prevalência de *Atopobium*, *Megasphaera*, *Gardnerella*, e *Prevotella*, que o grupo controlo. No que concerne a microbiota

endometrial, a percentagem de *Lactobacillus* foi equivalente em ambos os grupos, no entanto o grupo RIF apresentou níveis superiores de *Atopobium*, *Megasphaera*, *Gardnerella*, *Prevotella*, *Enterococcus*, *Schlegella*, *Delftia*, *Burkholderia*, *Sphingobacterium*, *Dietzia*, *Micrococcus*, *Ralstonia*, *Leucobacter* e *Hydrogenophaga*, sendo estas classificadas como possíveis fatores de risco para RIF<sup>[72]</sup>. Dada o potencial risco destas bactérias e dado que algumas tem representatividade tanto na vagina como no útero, como é o caso de *Atopobium*, *Megasphaera*, *Gardnerella*, e *Prevotella*, os autores sugerem que a deteção destas bactérias no canal vaginal possa ser um biomarcador de RIF e que a sua triagem nestas doentes poderá ser promissora<sup>[72]</sup>. Curiosamente, já anteriormente Kitaya *et al.* tinha detetado níveis significativos de *Burkholderia* nas amostras vaginais de mulheres com RIF, apontando que também esta possa ser um possível biomarcador de RIF e um possível alvo terapêutico<sup>[73]</sup>.

### Microbioma e Perda Gestacional Recorrente

A RPL corresponde a duas ou mais perdas gestacionais consecutivas antes das 24 semanas de gestação e pode ser classificada como secundária ou primária, dependendo se a mulher já teve ou não uma gravidez anterior que fosse viável após as 24 semanas de gestação<sup>[74]</sup>. A prevalência exata da RPL é difícil de estimar, mas um estudo sugere que esta varie entre 1-2% quando definida como três perdas gestacionais consecutivas antes de 20 semanas<sup>[74, 75]</sup>. Atualmente, já vários fatores de risco foram identificados para esta patologia, tais como, idade materna avançada, obesidade, síndrome antifosfolipídica, anomalias uterinas, anomalias cromossómicas parentais ou embrionárias, entre outras<sup>[75, 76]</sup>, contudo, mais de metade dos casos não tem uma etiologia identificada<sup>[75]</sup>.

Têm surgido cada vez mais evidências que alterações no microbioma, tanto vaginal como endometrial, estão relacionadas com a RPL<sup>[77]</sup>. No que diz respeito à microbiota vaginal, estudos frequentemente descrevem uma associação positiva entre a presença de *Atopobium* e a RPL<sup>[75]</sup>. Este género encontra-se, de facto, em maior prevalência em mulheres com RPL<sup>[77]</sup> e, há pesquisas que sugerem que uma abundância relativa de *Atopobium* superior a 0,01% poderá ser um possível preditor de aborto espontâneo no primeiro trimestre. Foi proposto que este microrganismo possa comprometer a integridade da barreira físico-química da mucosa vaginal, desencadeando a produção de mediadores pró-inflamatórios e facilitando a proliferação de outras bactérias anaeróbias<sup>[75]</sup>. Constatou-se, também, a microbioma vaginal de mulheres com RPL inexplicada apresentava uma incidência aumentada de outras bactérias potencialmente patogénicas tais como, *Prevotella*, *Gardnerella vaginalis*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Roseburia*, *Collinsella aerofaciens* e *Arthrobacter*, quando comparada com os controlos<sup>[75, 77]</sup>.

Também, no endométrio, se observaram diferenças significativas nas mulheres com RPL quando comparadas com os controles, apresentando as primeiras, redução na abundância de *Lactobacillus spp.* e aumento da diversidade do microbioma endometrial<sup>[75]</sup>. Um estudo, conduzido por Liu *et al.*, concluiu que o fluido endometrial destas mulheres tem uma maior prevalência de *Anaerobacillus*, *Erysipelothrix* e *Hydrogenophilus*<sup>[78]</sup>, enquanto que um estudo anterior já tinha determinado que os géneros *Aliihoeflea*, *Acinetobacter*, *Staphylococcus* e *Serratia* se encontravam em maior abundância nas mulheres RPL<sup>[75]</sup>. Para além disso, um outro estudo demonstrou que as amostras endometriais, obtidas por curetagem, do grupo com RPL apresentavam um predomínio de *L. iners*, em contraste com o grupo controlo que apresentava maior abundância de *L. crispatus*, sendo que o primeiro já tinha sido associado a disbiose endometrial e a desfechos obstétricos adversos, noutras pesquisas<sup>[75]</sup>. Adicionalmente, um estudo coorte que avaliou biópsias endometriais de 67 mulheres com RPL afirmou que o aumento da abundância relativa de *Ureaplasma* na flora endometrial destas mulheres é um fator de risco independente para um aborto espontâneo e parto prematuro em gestações subsequentes, sugerindo que nestes casos seria benéfico uma intervenção terapêutica preconcepcional que diminua a prevalência deste género bacteriano<sup>[79]</sup>.

## ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Como referido anteriormente, alterações do microbioma do TRF podem influenciar tanto a fertilidade como os resultados das técnicas de PMA, tornando se assim importante investigar e debater potenciais estratégias terapêuticas para modular e restaurar este microbioma<sup>[11, 30]</sup>.

### Antibióticos

A utilização de antibióticos é uma das terapêuticas mais discutidas, dado esta já ser comumente usada para o tratamento de várias patologias ginecológicas e obstétricas, como por exemplo a VB e a CE. No entanto, o seu uso durante as técnicas de PMA, nomeadamente antes da transferência de embriões, permanece controverso, pois não é claro se este tipo de intervenção tem um impacto significativo nos desfechos reprodutivos<sup>[25, 80]</sup>.

Especula-se que a administração profilática de antibióticos por via oral, antes da transferência embrionária, possa influenciar as taxas de gravidez, ao diminuir colonização microbiana do trato reprodutor superior. No entanto, os dados disponíveis são inconsistentes. Um ensaio clínico aleatorizado demonstrou que a diminuição da colonização do TRF após a administração de doxiciclina não se correlacionava com um aumento a taxa de gravidez clínica.

Contrariamente, outros estudos relataram um aumento significativo nas taxas de implantação e gravidez clínica com a utilização de ceftriaxone e de metronidazol de forma profilática, 48 horas antes da recolha dos ovócitos<sup>[11]</sup>.

Importa destacar que, a antibioterapia, embora seja eficaz na eliminação de microrganismos potencialmente patogénicos no TRF, pode também afetar negativamente a microbiota residente e benéfica, nomeadamente o género *Lactobacillus*, dado este ser também sensível ao espectro de antibióticos utilizados<sup>[11, 80]</sup>. Perante este risco e o risco de desenvolvimento de resistências, o uso sistemático de antibióticos, neste contexto, não é atualmente recomendado<sup>[39, 63]</sup>, sendo necessário aprofundar o conhecimento sobre a composição do microbioma TRF saudável e patológico, especialmente do endometrial, de maneira a se poder identificar com maior precisão as situações em que esta intervenção possa ser eficaz<sup>[63, 65]</sup>.

### Probióticos e Prebióticos

Outra estratégia terapêutica utilizada para a modulação e restauro do microbioma do TRF são os probióticos, que correspondem a microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro<sup>[65]</sup>. Atualmente, existem no mercado diversos probióticos orais e vaginais, a maioria deles contendo as espécies *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. plantarum*, *L. reuteri* e *L. rhamnosus*<sup>[80]</sup>.

Os probióticos têm-se vindo a destacar como um possível complemento à terapêutica antibiótica, mais do que como uma terapêutica isolada<sup>[39, 80]</sup>. Com referido anteriormente, os antibióticos, embora eficazes na eliminação de agentes patogénicos, não são seletivos e podem também comprometer a flora comensal, tornando o ambiente propício à disbiose, pelo que a administração concomitante de probióticos favorece a reposição e restauro desta. No entanto, a eficácia dos tratamentos exclusivamente com recurso a probióticos é incerta, não havendo evidência direta do efeito deste tipo de tratamento nos *outcomes* reprodutivos<sup>[81]</sup>. Sabe-se, no entanto, que determinadas estirpes probióticas, nomeadamente *L. rhamnosus* e *L. fermentum*, administradas por via oral, foram eficazes em restaurar a flora vaginal em mulheres com desequilíbrios prévios, promovendo um aumento da presença de *Lactobacillus spp.*. Estes achados demonstram o potencial que este tipo de intervenção poderá ter num período pré e periconcepcional, ajudando a estabelecer um ambiente favorável à implantação<sup>[11]</sup>. Porém, ainda são necessárias mais pesquisas para elucidar quais os melhores esquemas terapêuticos e vias de administração desta estratégia terapêutica.

Por sua vez, os prebióticos são um substrato alimentar não digerível que beneficia o hospedeiro ao promover o crescimento de um grupo limitado de bactérias<sup>[11]</sup>. Um exemplo



promissor nesta área é a lactoferrina. Num estudo recente, este prebiótico foi administrado oralmente após um ciclo antibioterapia em mulheres em tratamento de infertilidade, verificando-se que após 3 meses de tratamento 67% das mulheres com microbiota NLD converteram para uma microbiota LD<sup>[82]</sup>. A lactoferrina demonstrou, também, eficácia no tratamento da VB e foi associada a melhores *outcomes* gestacionais<sup>[65]</sup>.

### Transplantes de microbianos

O transplante de microbioma vaginal surgiu, muito recentemente, como uma nova possível arma terapêutica na área da saúde reprodutiva, após o sucesso do transplante de microbiota fecal para tratar a infecção recorrente por *Clostridium difficile*<sup>[69]</sup>. Consiste, como o próprio nome indica, na transferência de fluido cervicovaginal de uma doadora saudável para uma recetora doente, com o intuito de restaurar o seu microbioma<sup>[65]</sup>. Até ao momento, apenas um estudo relatou os resultados desta técnica. Lev-Sagie *et al.* testaram o uso de TMV em doentes com VB, sintomática, recorrente e refratária ao tratamento, relatando resultados promissores e sustentados a longo prazo<sup>[65, 69]</sup>.

Acredita-se que esta técnica, para além de modelar o microbioma vaginal, poderá também vir a ser utilizada para reparar o microbioma endometrial, utilizando o conhecido mecanismo de colonização ascendente. Há também autores que idealizam a possibilidade de no futuro próximo se vir a falar de um transplante de microbiota uterina<sup>[65]</sup>.

### CONCLUSÃO

O microbioma do TRF emergiu, nos últimos anos, como um potencial fator crítico na fertilidade feminina e nos resultados das técnicas de PMA. Até à data, não existe um consenso sobre qual será a composição ideal deste microbioma, especialmente no que concerne ao microbioma endometrial, existindo ainda muitas discrepâncias nos estudos disponíveis. Torna-se, assim, difícil determinar que microrganismos são verdadeiros comensais ou patógenos e qual o seu papel na fertilidade.

No entanto, existem evidências crescentes que uma microbiota dominada pelo género *Lactobacillus* está associada a melhores desfechos reprodutivos, enquanto a presença de outras bactérias específicas parece relacionar-se com a diversas patologias ginecológicas, infertilidade, a RIF e a RPL.

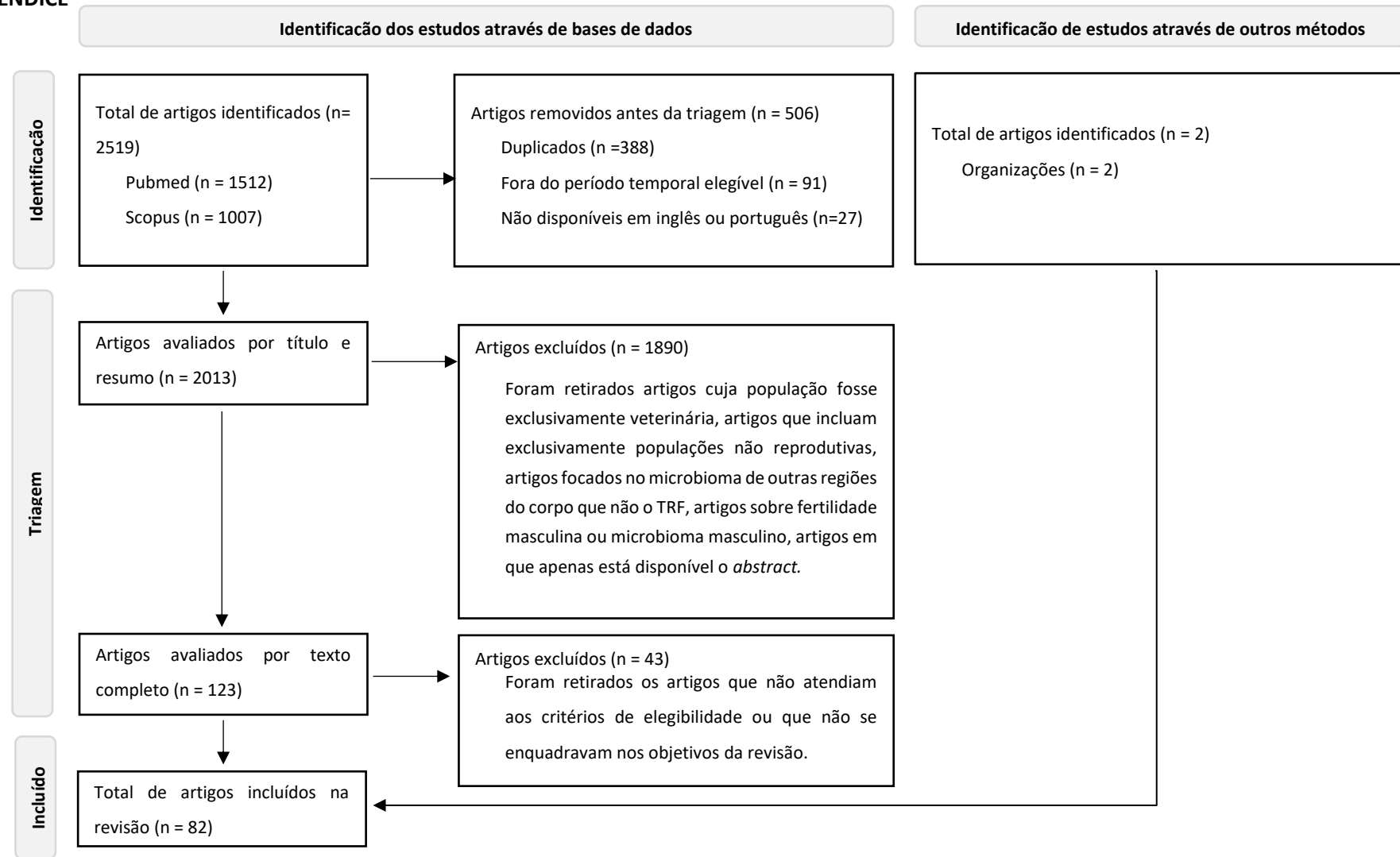
A avaliação do microbioma do TRF poderá vir a ser uma valiosa ferramenta na medicina da reprodução, tanto a nível diagnóstico como terapêutico, permitindo uma abordagem mais individualizada e centrada na doente. No entanto, atualmente, a avaliação deste microbioma não

é, rotineiramente, recomendada dada todas as divergências que rondam a sua constituição e à falta de critérios padronizados para a sua interpretação.

Diversas terapêuticas modeladoras do microbioma encontram-se em investigação, tais como a antibioterapia, os pré e probióticos e o TMV. Contudo, a evidencia clínica ainda é limitada, sendo escassos os ensaios que comprovem a sua eficácia e efetividade, pelo que a sua implementação e uso na prática médica ainda exige mais investigação.

Futuramente, é fundamental que haja uma uniformização das metodologias, desde a colheita até a análise da amostra, de forma a diminuir o risco de contaminação e a assegurar a comparabilidade entre diferentes estudos. Adicionalmente, é necessário alargar os estudos a maior número de participantes, para assegurar a significância estatística dos dados, mas também a garantir uma maior representatividade populacional e uma validade geográfica. Por fim, seria ainda de grande relevo, integrar dados de outras áreas, como a genómica e a metabolómica, para compreender melhor como estes microrganismos e os seus metabolitos interagem com os diversos processos fisiológico que ocorrem no TRF, como por exemplo a implantação embrionária.

## APÊNDICE



Anexo 1: Fluxograma da pesquisa bibliográfica.

## BIBLIOGRAFIA

1. Moreno, I. ,Franasiak J.M., *Endometrial microbiota-new player in town*. Fertil Steril, 2017. **108**(1): p. 32-39.
2. Chopra, C., Kumar V., Kumar M., Bhushan I., *Role of vaginal microbiota in idiopathic infertility: a prospective study*. Microbes Infect, 2024. **26**(4): p. 105308.
3. Green, K.A., Zarek S.M., Catherino W.H., *Gynecologic health and disease in relation to the microbiome of the female reproductive tract*. Fertil Steril, 2015. **104**(6): p. 1351-7.
4. Franasiak, J.M. ,Scott R.T., *Reproductive tract microbiome in assisted reproductive technologies*. Fertil Steril, 2015. **104**(6): p. 1364-1371.
5. Moreno, I., Garcia-Grau I., Perez-Villaroya D., et al., *Endometrial microbiota composition is associated with reproductive outcome in infertile patients*. Microbiome, 2022. **10**(1).
6. Miles, S.M., Hardy B.L., Merrell D.S., *Investigation of the microbiota of the reproductive tract in women undergoing a total hysterectomy and bilateral salpingo-oophorectomy*. Fertil Steril, 2017. **107**(3): p. 813-820.e1.
7. Cao, W., Fu X., Zhou J., et al., *The effect of the female genital tract and gut microbiome on reproductive dysfunction*. Biosci Trends, 2024. **17**(6): p. 458-474.
8. Canha-Gouveia, A., Pérez-Prieto I., Rodríguez C.M., et al., *The female upper reproductive tract harbors endogenous microbial profiles*. Front Endocrinol (Lausanne), 2023. **14**: p. 1096050.
9. Bhattacharya, K., Dutta S., Sengupta P., Bagchi S., *Reproductive tract microbiome and therapeutics of infertility*. Middle East Fertility Society Journal, 2023. **28**(1).
10. Tomaiuolo, R., Veneruso I., Cariatì F., D'argenio V., *Microbiota and human reproduction: The case of female infertility*. High-Throughput, 2020. **9**(2).
11. García-Velasco, J.A., Menabrito M., Catalán I.B., *What fertility specialists should know about the vaginal microbiome: a review*. Reprod Biomed Online, 2017. **35**(1): p. 103-112.
12. Nakama, C., Thompson B., Szybala C., et al., *The Continuum of Microbial Ecosystems along the Female Reproductive Tract: Implications for Health and Fertility*. Pathogens, 2022. **11**(11).
13. Smith, S.B. ,Ravel J., *The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology*. J Physiol, 2017. **595**(2): p. 451-463.

14. Amabebe, E. ,Anumba D.O.C., *The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of Lactobacilli*. Front Med (Lausanne), 2018. **5**: p. 181.
15. Gupta, S., Kakkar V., Bhushan I., *Crosstalk between Vaginal Microbiome and Female Health: A review*. Microb Pathog, 2019. **136**: p. 103696.
16. Kroon, S.J., Ravel J., Huston W.M., *Cervicovaginal microbiota, women's health, and reproductive outcomes*. Fertil Steril, 2018. **110**(3): p. 327-336.
17. Gao, X.S., Laven J., Louwers Y., Budding A., Schoenmakers S., *Microbiome as a predictor of implantation*. Curr Opin Obstet Gynecol, 2022. **34**(3): p. 122-132.
18. Cocomazzi, G., De Stefani S., Del Pup L., et al., *The Impact of the Female Genital Microbiota on the Outcome of Assisted Reproduction Treatments*. Microorganisms, 2023. **11**(6).
19. Koedooder, R., Mackens S., Budding A., et al., *Identification and evaluation of the microbiome in the female and male reproductive tracts*. Hum Reprod Update, 2019. **25**(3): p. 298-325.
20. Huang, B., Fettweis J.M., Brooks J.P., Jefferson K.K., Buck G.A., *The changing landscape of the vaginal microbiome*. Clin Lab Med, 2014. **34**(4): p. 747-61.
21. Günther, V., Allahqoli L., Watrowski R., et al., *Vaginal Microbiome in Reproductive Medicine*. Diagnostics, 2022. **12**(8).
22. Lehtoranta, L., Ala-Jaakkola R., Laitila A., Maukonen J., *Healthy Vaginal Microbiota and Influence of Probiotics Across the Female Life Span*. Front Microbiol, 2022. **13**: p. 819958.
23. Greenbaum, S., Greenbaum G., Moran-Gilad J., Weintraub A.Y., *Ecological dynamics of the vaginal microbiome in relation to health and disease*. Am J Obstet Gynecol, 2019. **220**(4): p. 324-335.
24. Saraf, V.S., Sheikh S.A., Ahmad A., et al., *Vaginal microbiome: normalcy vs dysbiosis*. Arch Microbiol, 2021. **203**(7): p. 3793-3802.
25. Anahtar, M.N., Gootenberg D.B., Mitchell C.M., Kwon D.S., *Cervicovaginal Microbiota and Reproductive Health: The Virtue of Simplicity*. Cell Host Microbe, 2018. **23**(2): p. 159-168.
26. Kwon, M.S. ,Lee H.K., *Host and Microbiome Interplay Shapes the Vaginal Microenvironment*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 919728.
27. Sun, N., Ding H., Yu H., et al., *Comprehensive Characterization of Microbial Community in the Female Genital Tract of Reproductive-Aged Women in China*. Front Cell Infect Microbiol, 2021. **11**: p. 649067.

28. Liptáková, A., Čurová K., Záhumenský J., Visnyaiová K., Varga I., *Microbiota of female genital tract - functional overview of microbial flora from vagina to uterine tubes and placenta*. *Physiol Res*, 2022. **71**: p. S21-s33.
29. Li, F., Chen C., Wei W., et al., *The metagenome of the female upper reproductive tract*. *Gigascience*, 2018. **7**(10).
30. Punzón-Jiménez, P., Labarta E., *The impact of the female genital tract microbiome in women health and reproduction: a review*. *J Assist Reprod Genet*, 2021. **38**(10): p. 2519-2541.
31. Winters, A.D., Romero R., Gervasi M.T., et al., *Does the endometrial cavity have a molecular microbial signature?* *Scientific Reports*, 2019. **9**(1): p. 9905.
32. Chen, C., Song X., Wei W., et al., *The microbiota continuum along the female reproductive tract and its relation to uterine-related diseases*. *Nat Commun*, 2017. **8**(1): p. 875.
33. Mitchell, C.M., Haick A., Nkwopara E., et al., *Colonization of the upper genital tract by vaginal bacterial species in nonpregnant women*. *Am J Obstet Gynecol*, 2015. **212**(5): p. 611.e1-9.
34. Moreno, I., Codoñer F.M., Vilella F., et al., *Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure*. *Am J Obstet Gynecol*, 2016. **215**(6): p. 684-703.
35. Baker, J.M., Chase D.M., Herbst-Kralovetz M.M., *Uterine Microbiota: Residents, Tourists, or Invaders?* *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 208.
36. Moreno, I., Simon C., *Relevance of assessing the uterine microbiota in infertility*. *Fertil Steril*, 2018. **110**(3): p. 337-343.
37. Verstraelen, H., Vilchez-Vargas R., Desimpel F., et al., *Characterisation of the human uterine microbiome in non-pregnant women through deep sequencing of the V1-2 region of the 16S rRNA gene*. *PeerJ*, 2016. **4**: p. e1602.
38. 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**(3): p. 297-306.
39. García-Velasco, J.A., Budding D., Campe H., et al., *The reproductive microbiome – clinical practice recommendations for fertility specialists*. *Reproductive BioMedicine Online*, 2020. **41**(3): p. 443-453.
40. Sola-Leyva, A., Andrés-León E., Molina N.M., et al., *Mapping the entire functionally active endometrial microbiota*. *Hum Reprod*, 2021. **36**(4): p. 1021-1031.

41. Toson, B., Simon C., Moreno I., *The Endometrial Microbiome and Its Impact on Human Conception*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(1).
42. Wang, J., Li Z., Ma X., et al., *Translocation of vaginal microbiota is involved in impairment and protection of uterine health*. Nat Commun, 2021. **12**(1): p. 4191.
43. Odawara, K., Akino R., Sekizawa A., et al., *Examination of clinical factors affecting intrauterine microbiota*. Reproduction and Fertility, 2021. **2**(1): p. 1-6.
44. Carosso, A., Revelli A., Gennarelli G., et al., *Controlled ovarian stimulation and progesterone supplementation affect vaginal and endometrial microbiota in IVF cycles: a pilot study*. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2020. **37**(9): p. 2315-2326.
45. Elnashar, A.M., *Impact of endometrial microbiome on fertility*. Middle East Fertility Society Journal, 2021. **26**(1).
46. Benner, M., Ferwerda G., Joosten I., van der Molen R.G., *How uterine microbiota might be responsible for a receptive, fertile endometrium*. Hum Reprod Update, 2018. **24**(4): p. 393-415.
47. Pelzer, E.S., Willner D., Buttini M., et al., *The fallopian tube microbiome: implications for reproductive health*. Oncotarget, 2018. **9**(30): p. 21541-21551.
48. World Health Organization, *Infertility prevalence estimates, 1990–2021*. 2023: World Health Organization.
49. Souza, S.V., Monteiro P.B., Moura G.A., et al., *Vaginal microbioma and the presence of Lactobacillus spp. as interferences in female fertility: A review system*. JBRA Assist Reprod, 2023. **27**(3): p. 496-506.
50. Babu, G., Singaravelu B., Srikumar R., Reddy S.V., Kokan A., *Comparative study on the vaginal flora and incidence of asymptomatic vaginosis among healthy women and in women with infertility problems of reproductive age*. Journal of Clinical and Diagnostic Research, 2017. **11**(8): p. DC18-DC22.
51. Bernabeu, A., Lledo B., Díaz M.C., et al., *Effect of the vaginal microbiome on the pregnancy rate in women receiving assisted reproductive treatment*. J Assist Reprod Genet, 2019. **36**(10): p. 2111-2119.
52. Singer, M., Borg M., Ouburg S., Morré S.A., *The relation of the vaginal microbiota to early pregnancy development during in vitro fertilization treatment-A meta-analysis*. J Gynecol Obstet Hum Reprod, 2019. **48**(4): p. 223-229.

53. Haahr, T., Humaidan P., Elbaek H.O., et al., *Vaginal Microbiota and In Vitro Fertilization Outcomes: Development of a Simple Diagnostic Tool to Predict Patients at Risk of a Poor Reproductive Outcome*. J Infect Dis, 2019. **219**(11): p. 1809-1817.
54. Koedooder, R., Singer M., Schoenmakers S., 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**(6): p. 1042-1054.
55. Wei, Q., Chen H., Zou H., et al., *Impact of vaginal microecological differences on pregnancy outcomes and endometrial microbiota in frozen embryo transfer cycles*. J Assist Reprod Genet, 2024. **41**(4): p. 929-938.
56. Haahr, T., Jensen J.S., Thomsen L., et al., *Abnormal vaginal microbiota may be associated with poor reproductive outcomes: a prospective study in IVF patients*. Hum Reprod, 2016. **31**(4): p. 795-803.
57. Villani, A., Fontana A., Barone S., et al., *Identifying Predictive Bacterial Markers from Cervical Swab Microbiota on Pregnancy Outcome in Woman Undergoing Assisted Reproductive Technologies*. Journal of Clinical Medicine, 2022. **11**(3).
58. Dube, R. ,Kar S.S., *Genital Microbiota and Outcome of Assisted Reproductive Treatment—A Systematic Review*. Life, 2022. **12**(11).
59. Rokhsartalab Azar, P., Karimi S., Haghtalab A., et al., *The role of the endometrial microbiome in embryo implantation and recurrent implantation failure*. J Reprod Immunol, 2024. **162**: p. 104192.
60. Riganelli, L., Iebba V., Piccioni M., et al., *Structural Variations of Vaginal and Endometrial Microbiota: Hints on Female Infertility*. Front Cell Infect Microbiol, 2020. **10**: p. 350.
61. Miyagi, M., Mekaru K., Tanaka S.E., et al., *Endometrial and vaginal microbiomes influence assisted reproductive technology outcomes*. JBRA Assist Reprod, 2023. **27**(2): p. 267-281.
62. Franasiak, J.M., Werner M.D., Juneau C.R., et al., *Endometrial microbiome at the time of embryo transfer: next-generation sequencing of the 16S ribosomal subunit*. J Assist Reprod Genet, 2016. **33**(1): p. 129-36.
63. Hashimoto, T. ,Kyono K., *Does dysbiotic endometrium affect blastocyst implantation in IVF patients?* J Assist Reprod Genet, 2019. **36**(12): p. 2471-2479.
64. Diaz-martínez, M.C., Bernabeu A., Lledó B., et al., *Impact of the vaginal and endometrial microbiome pattern on assisted reproduction outcomes*. Journal of Clinical Medicine, 2021. **10**(18).



65. Molina, N.M., Sola-Leyva A., Saez-Lara M.J., et al., *New Opportunities for Endometrial Health by Modifying Uterine Microbial Composition: Present or Future?* Biomolecules, 2020. **10**(4).
66. Zhang, H., Zou H., Zhang C., Zhang S., *Chronic endometritis and the endometrial microbiota: implications for reproductive success in patients with recurrent implantation failure.* Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2024. **23**(1): p. 49.
67. Al-Nasiry, S., Ambrosino E., Schlaepfer M., et al., *The Interplay Between Reproductive Tract Microbiota and Immunological System in Human Reproduction.* Front Immunol, 2020. **11**: p. 378.
68. Odendaal, J., Black N., Bennett P.R., et al., *The endometrial microbiota and early pregnancy loss.* Hum Reprod, 2024. **39**(4): p. 638-646.
69. Gholiof, M., Adamson-De Luca E., Wessels J.M., *The female reproductive tract microbiotas, inflammation, and gynecological conditions.* Front Reprod Health, 2022. **4**: p. 963752.
70. Lozano, F.M., Lledó B., Morales R., et al., *Characterization of the Endometrial Microbiome in Patients with Recurrent Implantation Failure.* Microorganisms, 2023. **11**(3).
71. Fu, M., Zhang X., Liang Y., et al., *Alterations in Vaginal Microbiota and Associated Metabolome in Women with Recurrent Implantation Failure.* mBio, 2020. **11**(3).
72. Ichiyama, T., Kuroda K., Nagai Y., et al., *Analysis of vaginal and endometrial microbiota communities in infertile women with a history of repeated implantation failure.* Reprod Med Biol, 2021. **20**(3): p. 334-344.
73. Kitaya, K., Nagai Y., Arai W., Sakuraba Y., Ishikawa T., *Characterization of Microbiota in Endometrial Fluid and Vaginal Secretions in Infertile Women with Repeated Implantation Failure.* Mediators Inflamm, 2019. **2019**: p. 4893437.
74. ESHRE Guideline Group on RPL, Bender Atik R., Christiansen O.B., et al., *ESHRE guideline: recurrent pregnancy loss: an update in 2022.* Human Reproduction Open, 2023. **2023**(1): p. hoad002.
75. Gao, X., Louwers Y.V., Laven J.S.E., Schoenmakers S., *Clinical Relevance of Vaginal and Endometrial Microbiome Investigation in Women with Repeated Implantation Failure and Recurrent Pregnancy Loss.* Int J Mol Sci, 2024. **25**(1).
76. Mori, R., Hayakawa T., Hirayama M., et al., *Cervicovaginal microbiome in patients with recurrent pregnancy loss.* Journal of Reproductive Immunology, 2023. **157**: p. 103944.

77. Vomstein, K., Krog M.C., Wrønding T., Nielsen H.S., *The microbiome in recurrent pregnancy loss - A scoping review*. J Reprod Immunol, 2024. **163**: p. 104251.
78. Liu, F.T., Yang S., Yang Z., et al., *An Altered Microbiota in the Lower and Upper Female Reproductive Tract of Women with Recurrent Spontaneous Abortion*. Microbiol Spectr, 2022. **10**(3): p. e0046222.
79. Shi, Y., Yamada H., Sasagawa Y., Tanimura K., Deguchi M., *Uterine endometrium microbiota and pregnancy outcome in women with recurrent pregnancy loss*. J Reprod Immunol, 2022. **152**: p. 103653.
80. Moreno, I., Simon C., *Deciphering the effect of reproductive tract microbiota on human reproduction*. Reproductive Medicine and Biology, 2019. **18**(1): p. 40-50.
81. Moumne, O., Hampe M.E., Montoya-Williams D., et al., *Implications of the vaginal microbiome and potential restorative strategies on maternal health: a narrative review*. J Perinat Med, 2021. **49**(4): p. 402-411.
82. Kyono, K., Hashimoto T., Kikuchi S., Nagai Y., Sakuraba Y., *A pilot study and case reports on endometrial microbiota and pregnancy outcome: An analysis using 16S rRNA gene sequencing among IVF patients, and trial therapeutic intervention for dysbiotic endometrium*. Reprod Med Biol, 2019. **18**(1): p. 72-82.

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR**

