



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



FACULDADE DE
MEDICINA
LISBOA

TRABALHO FINAL

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Clínica Universitária de Obstetrícia e Ginecologia

O papel do Microbioma Uterino na Fertilidade Feminina

Carolina Pureza Correia

Orientado por:

Dr. José Joaquim Domingues Nunes

Março' 2024

Resumo

Durante muito tempo, o útero foi considerado um ambiente estéril. Atualmente sabe-se que existe uma comunidade diversa de microrganismos residentes na cavidade uterina. Ao contrário do microbioma vaginal, altamente estudado e caracterizado, o microbioma uterino está apenas recentemente a suscitar interesse na comunidade científica. É considerado que este microbioma tenha um papel importante na manutenção da homeostasia uterina, e que tenha influência na atividade inflamatória e imune das células do útero.

Desta forma, alterações do microbioma uterino poderão influenciar negativamente o ambiente uterino, levando a condições patológicas, como endometrite crónica, que poderão afetar os processos fisiológicos da reprodução, como a implantação e a manutenção da gravidez. Adicionalmente, a disbiose uterina poderá estar relacionada com piores resultados nos tratamentos de procriação medicamente assistida.

Dado estimar-se que 1 em cada 6 pessoas adultas sofra de infertilidade ao longo da vida, torna-se premente otimizar as soluções que a medicina pode oferecer. Entender a composição do microbioma uterino pode abrir novos caminhos na compreensão dos mecanismos de infertilidade, e permitir novas abordagens terapêuticas a esta condição.

Este trabalho tem como objetivo rever a composição do microbioma uterino e as suas relações com o útero, assim como entender de que forma a disbiose uterina pode influenciar a fertilidade feminina e os resultados dos tratamentos de procriação medicamente assistida. Pretende-se, também, perceber se existem benefícios terapêuticos da utilização de antibióticos e probióticos em casos de disbiose uterina.

Palavras-chave: microbioma uterino; endometrite crónica; infertilidade; procriação medicamente assistida; probióticos

O Trabalho Final é da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à FMUL pelos conteúdos nele apresentados.

Abstract

For a long time, the uterus was considered a sterile environment. It is now known that there is a diverse community of microorganisms residing in the uterine cavity. Unlike the vaginal microbiome, which has been highly studied and characterized, the uterine microbiome has only recently been of interest to the scientific community. It is thought that this microbiome plays an important role in maintaining uterine homeostasis and influences the inflammatory and immune activity of uterine cells.

Thus, alterations in the uterine microbiome could negatively influence the uterine environment, leading to pathological conditions such as chronic endometritis, which could affect the physiological processes of reproduction, such as implantation and the maintenance of pregnancy. In addition, uterine dysbiosis may be related to poorer outcomes in assisted reproduction treatments.

Given that it is estimated that 1 in 6 adults suffer from infertility throughout their lives, there is an urgent need to optimize the solutions medicine can offer. Understanding the composition of the uterine microbiome could open up new ways of understanding the mechanisms of infertility and allow for new therapeutic approaches to this condition.

The aim of this study is to review the composition of the uterine microbiome and its relationship with the uterus, as well as to understand how uterine dysbiosis can influence female fertility and the results of assisted reproduction treatments. The aim is also to understand whether there are therapeutic benefits to using antibiotics and probiotics in cases of uterine dysbiosis.

Key words: uterine microbiome; chronic endometritis; infertility; assisted reproductive technology; probiotics

Índice

Resumo	1
Abstract	2
Índice	3
Lista de Abreviaturas	4
Introdução	5
Metodologia	8
Discussão	9
Caracterização do microbioma uterino	9
Microbioma uterino e recetividade uterina	11
Microbioma uterino e falha recorrente de implantação (RIF)	14
Microbioma uterino e endometrite crónica (EC)	16
Armas terapêuticas: antibióticos e probióticos	18
Desafios e limitações do estudo do microbioma uterino	21
Conclusões	24
Agradecimentos	26
Referências	27

Lista de Abreviaturas

AMPs - Peptídeos Antimicrobianos

EC - Endometrite crónica

FIV - Fertilização in Vitro

LD - *Lactobacillus* Dominante

NGS - Sequenciação de Nova Geração

NLD - Não-*Lactobacillus* Dominante

PMA - Procriação Medicamente Assistida

rRNA - Ácido Ribonucleico Ribossomal

RIF - Falha Recorrente de Implantação

Treg - Células T reguladoras

uNK - Células *natural killers* uterinas

Introdução

A microbiota humana corresponde à comunidade de microrganismos que reside nos diferentes tecidos do corpo humano, enquanto que o termo microbioma é mais abrangente, referindo-se aos seus genomas, assim como metabolitos e a sua interação com o meio (Berg et al., 2020). Sabe-se que o microbioma humano é vasto e que as suas relações com o organismo são imprescindíveis para a manutenção da homeostasia. Um exemplo disso é a microbiota intestinal, que produz enzimas e outros metabolitos que auxiliam na digestão e protege contra microrganismos patógenos, entre outras funções (Thursby & Juge, 2017). Com os desenvolvimentos na área da metagenómica, através da análise de uma amostra é possível caracterizar todo o genoma de uma comunidade de microrganismos, sem a necessidade de realização de culturas. Desta forma, tem sido possível caracterizar o microbioma humano de forma mais rápida e com menores custos (Malla et al., 2019), abrindo novas possibilidades para explorar a microbiota de locais previamente considerados estéreis (Vemuri & Herath, 2023), e permitindo avanços no estudo do microbioma que elucidam sobre as suas interações com o organismo.

O microbioma do trato genital feminino tem sido um desses alvos de estudo, para melhor se entender a sua relação com a saúde reprodutiva e a fertilidade. O trato genital feminino alberga cerca de 9% da população de microrganismos do corpo humano (Moreno & Simon, 2019), e compreende a vagina, o colo do útero, o endométrio, as trompas de falópio e os ovários. O microbioma vaginal, predominantemente composto por *Lactobacillus*, e a sua função no equilíbrio do ambiente vaginal são já conhecidos (Wee et al., 2018), contudo, o restante trato genital permanece pouco estudado.

O útero, em particular, foi considerado um local estéril durante muito tempo. Pensava-se que o muco cervical serviria de barreira à ascensão de bactérias pela vagina, no entanto, essa barreira não é totalmente impermeável (Baker et al., 2018). Acredita-se que a colonização do útero possa ocorrer através de ascensão pelo canal vaginal ou disseminação hematogénea de locais como o intestino e a cavidade oral, e que microrganismos transportados por espermatozóides ou procedimentos invasivos como a colocação de dispositivos intrauterinos, histeroscopias e técnicas de procriação

medicamente assistida (PMA), possam contribuir para esta colonização (Moreno & Simon, 2018; J. Wang et al., 2021).

Atualmente, não só se reconhece a existência do microbioma uterino, como também se tem tentado chegar a um consenso relativamente à microbiota uterina considerada “normal”. Este estudo é dificultado, dado que a recolha de material para análise do microbioma endometrial é um processo invasivo, predominantemente realizado através da via transcervical, o que resulta em estudos com uma amostra reduzida de doentes. O estudo do microbioma uterino é, na sua maioria, realizado em mulheres sujeitas a técnicas de PMA, fazendo-se a recolha de material para análise durante o procedimento (Molina et al., 2021).

Apesar de ainda não estar estabelecido qual a microbiota uterina considerada “normal”, parece poder identificar-se bactérias potencialmente patogénicas, como *Gardnerella* spp., *Streptococcus* spp., *Prevotella* spp. e *Atopobium* spp., entre outras (Lozano et al., 2021; Moreno et al., 2016). A disbiose uterina aparenta estar relacionada com processos inflamatórios e patológicos do útero, podendo estar envolvida no desenvolvimento de condições como infertilidade, cancro do endométrio, endometriose, entre outras patologias (Kaluanga Bwanga et al., 2023; Punzón-Jiménez & Labarta, 2021).

A infertilidade é definida como a incapacidade de conceber uma gravidez após 12 meses de relações sexuais regulares sem uso de métodos contraceptivos, sendo considerada um problema de saúde pública. A sua prevalência tem vindo a aumentar nas últimas décadas e, atualmente, 1 em cada 6 pessoas sofre de infertilidade (Harris, 2023). A infertilidade pode ser provocada por diferentes fatores, tanto masculinos como femininos, porém em cerca de 30% dos casos não se consegue explicar a sua causa (The Guideline Group on Unexplained Infertility et al., 2023). Os tratamentos de PMA são cada vez mais requisitados por casais a experienciar dificuldade em engravidar (Lazzari et al., 2023), com taxas de eficácia variáveis e dependentes de múltiplos fatores. Frequentemente, é necessária a realização de mais de um ciclo de tratamentos, resultando em efeitos psicológicos negativos na mulher que pretende

engravadar, para além de representar um encargo económico tanto para os sistemas de saúde como para as pessoas afetadas (W. Chen et al., 2021).

Vários estudos revelam que o processo de implantação, tanto nas tentativas de conceber uma gravidez como em técnicas de PMA, parece ser influenciado pelo microbioma uterino, e que a presença de microrganismos potencialmente patogénicos pode estar relacionada com falhas nesse processo (Gao et al., 2022). Torna-se, assim, relevante a compreensão deste microbioma, dada a dimensão de pessoas afetadas pela problemática da infertilidade e a crescente procura de tratamentos para esta condição.

Este trabalho pretende rever e compilar a informação publicada acerca da relação entre o microbioma uterino e a fertilidade, com quatro objetivos principais: 1) identificar a composição do microbioma uterino, 2) entender a relação entre o microbioma, o ambiente uterino e a fertilidade, 3) relacionar alterações da microbiota uterina com a infertilidade feminina e piores resultados nos tratamentos de PMA e 4) perceber se existe evidência para, em casos de disbiose uterina, utilizar antibióticos e/ou probióticos como adjuvantes nos tratamentos de fertilidade.

Metodologia

Foi realizada uma pesquisa no motor de busca PubMed, com as palavras-chave "*uterine microbiome*", "*uterine microbiota*", "*endometrial microbiome*", "*endometrial microbiota*", "*uterine dysbiosis*", "*endometrial dysbiosis*" e "*reproduction*", com o filtro definido para publicações em português e inglês. Surgiram 161 resultados, todos em língua inglesa, de outubro de 2012 a setembro de 2023.

Foram inicialmente excluídos 87 artigos, após a leitura do título e do *abstract*, onde se incluem artigos sobre estudos em animais, artigos que focavam apenas em patologia uterina, sem abordar o tema da fertilidade, e artigos que focavam apenas em complicações da gravidez e pós-parto. Após exclusão inicial de artigos, foram lidos na íntegra 74 artigos, dos quais foram excluídos 2 artigos por não terem *open access* e 11 artigos por não se adequarem ao tema desta revisão, após a sua leitura.

No total, foram incluídos 61 artigos nesta revisão. Foram ainda consultados artigos retirados das referências bibliográficas dos artigos incluídos neste trabalho.

Discussão

Caracterização do microbioma uterino

O microbioma uterino pode ser caracterizado de duas formas distintas: através de análise por cultura ou de análise metagenómica por sequenciação. O método de cultura é cada vez menos utilizado na análise do microbioma, dado que muitos microrganismos não podem ser identificados por cultura, não traduzindo uma correta análise da diversidade da microbiota em determinado ecossistema (Franasiak et al., 2016). Desta forma, a vasta maioria dos estudos do microbioma humano utilizam técnicas de sequenciação do genoma independentes de cultura. É, atualmente, amplamente utilizada a análise das regiões hipervariáveis do rRNA 16S, por Sequenciação de Nova Geração (NGS) para caracterização do microbioma humano, incluindo o do trato genital feminino (Punzón-Jiménez & Labarta, 2021).

A forma de recolha do material para sequenciação também varia consoante o estudo, podendo ser feita recolha de fluido endometrial e/ou biópsia de tecido endometrial. Um estudo de Y. Liu et al. comparou os dois métodos e concluiu que a análise do fluido endometrial não reflete na totalidade a composição do tecido endometrial, e que a utilização de ambos os métodos pode ser benéfica na análise do microbioma uterino (Y. Liu et al., 2018). A maioria dos estudos desta revisão utiliza amostras de tecido endometrial para análise, recolhidas a partir de cateteres de duplo lúmen, para tentar minimizar a contaminação pelo contacto da mucosa vaginal e cervical com a parte interna do cateter, que realiza a recolha da biópsia.

Para se poder tecer conclusões quanto ao papel do microbioma uterino na fertilidade, é necessário conhecer-se a composição do microbioma uterino considerada “normal” numa mulher saudável. Esta não é, no entanto, consensual entre os vários estudos, até à data. Sabe-se que o microbioma vaginal é constituído quase na totalidade por *Lactobacillus*, e vários estudos reportam que o útero dispõe de uma maior diversidade de bactérias que a vagina, apesar de apresentar uma menor biomassa microbiana (Garcia-Grau et al., 2019). Seria de esperar que a vagina tivesse uma maior comunidade de microrganismos, devido a fatores como uma maior exposição ao ambiente exterior e a contacto direto com líquido seminal durante as

relações sexuais. Diaz-Martínez et al. põe a hipótese de que este facto se deva a uma não dominância de um único género no útero, o que potencia a colonização por outras bactérias e uma comunidade mais heterogénea de microrganismos que na vagina (Diaz-Martínez et al., 2021).

Apesar de não haver um consenso, a maioria dos estudos relata uma predominância de *Lactobacillus* no microbioma uterino saudável, com percentagens de prevalência variáveis (Franasiak et al., 2016; Ichiyama et al., 2021; Lozano et al., 2023; Vomstein et al., 2022; Wee et al., 2018). Esta semelhança com o microbioma vaginal parece corroborar a teoria de translocação de microrganismos entre os dois locais (J. Wang et al., 2021). São igualmente relatados dezenas de outros microrganismos na análise de amostras uterinas, sendo que os mais comumente encontrados no útero incluem bactérias dos filos Bacteroidetes, Proteobacteria e Actinobacteria (Tomaiuolo et al., 2020). Winters et al. não reportou uma dominância de *Lactobacillus* no útero saudável, pondo mesmo em questão a existência de um microbioma uterino “normal”, dado nos seus achados ter encontrado *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, Comamonadaceae e *Cloacibacterium*, previamente reportados como possíveis contaminantes (Winters et al., 2019).

Existe, portanto, uma grande variabilidade entre os achados da microbiota uterina nos diferentes estudos. Esta pode dever-se a diferenças entre estudos dos métodos de recolha e análise, das características da população analisada, entre outras limitações que serão melhor abordadas noutra secção deste trabalho.

Para além da variabilidade de resultados entre diferentes estudos, considera-se que o microbioma uterino possa sofrer mudanças com alterações endógenas e/ou exógenas. Wang et al. demonstrou que os microbiomas uterino e vaginal sofrem alterações com o avançar da idade, relatando uma diminuição da diversidade de microrganismos com o envelhecimento (J. Wang et al., 2021). Também outro estudo reportou uma diminuição da predominância de *Lactobacillus* em mulheres mais velhas, em comparação com mulheres mais jovens (Fujii & Oguchi, 2023). Chen et al. verificou que a quantidade de bactérias nas amostras era significativamente inferior em mulheres com excesso de peso ou obesas (P. Chen et al., 2022).

As hormonas também aparentam ter influência sobre o microbioma do trato reprodutor feminino. Carosso et al. estudou os efeitos de estimulação ovárica com FSH recombinante e suplementação com progesterona no microbioma vaginal e endometrial, e concluiu que em ambos os locais a biodiversidade aumentou, 6 meses após os tratamentos (Carosso et al., 2020). Relativamente a alterações hormonais endógenas, um estudo reportou que o microbioma uterino permaneceu estável durante o ciclo menstrual, ao analisar amostras nas fases pré-recetiva e recetiva (Moreno et al., 2016). Kyono et al. também reportou uma estabilidade da microbiota uterina ao longo do ciclo menstrual (Kyono, Hashimoto, Nagai, et al., 2018). Já outro estudo contrariou esse achado, relatando um aumento da percentagem de *Lactobacillus no útero* com o avançar do ciclo menstrual da fase folicular para a fase lútea, e uma diminuição de Proteobacteria (Vomstein et al., 2022).

Foram, ainda, analisadas amostras do útero e das trompas de falópio de diferentes mulheres, e verificou-se que o microbioma dos dois tecidos da mesma mulher partilhavam mais semelhanças do que o mesmo tecido entre duas mulheres distintas (Canha-Gouveia et al., 2023). Estes dados parecem apoiar a hipótese de que cada pessoa tem um microbioma característico e individual, adaptado ao ambiente do hospedeiro, o que torna complexa a tarefa de definir um microbioma uterino “normal”.

Microbioma uterino e recetividade uterina

A implantação do embrião é considerada o passo mais crítico do processo de reprodução, e está intimamente relacionada com a recetividade uterina, definida como o período da maturação endometrial durante o qual o blastocisto pode aderir às células epiteliais do endométrio e, subsequentemente, invadir o mesmo. Para que o processo da implantação decorra sem intercorrências, é necessária uma comunicação síncrona entre o embrião e o endométrio (Sehring et al., 2022). A fase recetiva do útero ocorre entre os dias 20 a 24 de um ciclo menstrual regular, e a correta maturação uterina está dependente de diversos fatores, entre os quais a secreção de hormonas esteróides pelos ovários, a correta ativação de eventos de sinalização, e mediadores

moleculares como citocinas, fatores de crescimento, moléculas de adesão, entre outros (Achache & Revel, 2006).

A resposta imunitária a nível celular é particularmente importante nos processos de implantação e início de gravidez. É caracterizada pela ativação de macrófagos e células dendríticas, e pela libertação de células *natural killers* uterinas (uNK) e de certos subtipos de células T, como células T reguladoras (Treg). As células uNK são os linfócitos mais abundantes da interface materno-fetal e estão envolvidas na invasão do trofoblasto e no *remodeling* vascular placentar. As células Treg têm um papel muito relevante na produção de citocinas anti-inflamatórias como TGF- β e IL-10, que reduzem a rejeição do embrião pelo tecido uterino materno. A desregulação nas proporções das células imunes contribuem para um comprometimento da recetividade uterina, pelo que uma correta ativação imunitária é um passo essencial para uma implantação adequada (Sojka et al., 2019; Zhu et al., 2022).

Com o estudo do microbioma uterino surgiu a hipótese de que este poderia influenciar o ambiente uterino e a recetividade endometrial. Foi proposto que a microbiota uterina interaja com as células epiteliais endometriais, o que culmina na libertação de peptídeos antimicrobianos (AMPs) na cavidade uterina, que constituem das principais defesas contra agentes patogénicos. Pensa-se, igualmente, que as bactérias comensais interajam com as células dendríticas e macrófagos, desencadeando a resposta imune já descrita acima (Al-Nasiry et al., 2020). Os mecanismos exatos das interações entre a microbiota e o útero, bem como a forma como afetam a resposta imune materna durante a implantação ainda não são completamente compreendidos.

Moreno et al. demonstrou num estudo piloto que o microbioma uterino tem influência no sucesso ou falha da implantação. Separou os resultados da análise com base na dominância de *Lactobacillus*, dividindo a microbiota em: *Lactobacillus* Dominante (LD), quando $\geq 90\%$ das bactérias detetadas eram *Lactobacillus*, e Não-*Lactobacillus* Dominante (NLD), nas amostras em que havia $>10\%$ de outros géneros de bactérias. Ao relacionar as amostras LD e NLD de 35 pacientes a realizar Fertilização in Vitro (FIV) com os seus resultados reprodutivos, constatou que úteros

NLD se relacionaram negativamente com as percentagens de implantações, gravidez e partos bem sucedidos. Reportou, ainda, que todas as mulheres que apresentavam percentagens elevadas de *Gardnerella* spp. ou *Streptococcus* spp. não engravidaram ou tiveram um aborto, o que leva a acreditar que estas bactérias possam ser possivelmente patogénicas, e ter efeitos negativos no processo de implantação (Moreno et al., 2016).

Em 2022, Moreno et al. conduziu um outro estudo, com uma amostra maior composta por 342 mulheres com problemas de fertilidade, e reportou que a diminuição de *Lactobacillus* nas amostras e a presença de bactérias patogénicas como *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Chryseobacterium*, *Gardnerella*, *Streptococcus* e *Klebsiella* estavam associadas a menor sucesso nos *outcomes* reprodutivos. Observou, ainda, que o que pareceu interferir com a fertilidade foi a presença de agentes patogénicos, e não a depleção de certos géneros, dado que em amostras em que não foram detectadas bactérias, incluindo *Lactobacillus*, se atingiu também a gravidez. Estes dados parecem reforçar a evidência que apoia o papel das bactérias patogénicas como fator de risco na reprodução, e foi colocada a hipótese de que o principal papel de *Lactobacillus* spp. consiste em evitar a colonização da cavidade uterina por bactérias potencialmente patogénicas (Moreno et al., 2022).

O estudo de Bui et al. verificou que mulheres com gravidezes de termo apresentavam maior abundância de *Lactobacillus*, e observou, ainda, que mulheres com infertilidade secundária tinham uma menor quantidade de *Lactobacillus* e um aumento na percentagem de *Gardnerella vaginalis* no útero (Bui et al., 2023). Outro estudo de 2023 corroborou estes achados, relatando um impacto positivo de *Lactobacillus* na taxa de mulheres que engravidaram. Em oposição, relatou que a presença de bactérias das famílias *Staphylococcaceae* e *Enterobacteriaceae* estava associada a pior prognóstico da técnica de FIV (Cariati et al., 2023).

No entanto, outros estudos não obtiveram as mesmas conclusões. Diaz-Martínez et al. reportou não haver diferenças com significância estatística no microbioma vaginal e uterino entre mulheres que atingiram a gravidez e mulheres que não engravidaram, após tratamentos de PMA (Diaz-Martínez et al., 2021). Riganelli et

al. e Reschini et al. não confirmaram os achados de Moreno et al., relatando não identificar uma relação entre a presença de *Lactobacillus* e resultados positivos dos tratamentos de PMA (Reschini et al., 2022; Riganelli et al., 2020).

Outro estudo reportou que os *outcomes* reprodutivos foram comparáveis entre mulheres com endométrios eubióticos ou disbióticos. Neste estudo, foi também posta em causa a classificação de Moreno et al. em LD e NLD, com o *cut-off* de 90% de abundância de *Lactobacillus*, pelo que foi admitida disbiose uterina em mulheres com uma percentagem de *Lactobacillus* + *Bifidobacterium* spp. inferior a 80%, dada a suspeita de que *Bifidobacterium* constitua uma das bactérias comensais uterinas, e seja parte de um ambiente aceitável para implantação (Hashimoto & Kyono, 2019).

Admite-se, assim, que possa existir uma associação entre o microbioma uterino, a recetividade uterina e as taxas de implantação, não ficando claro se existe um papel positivo das bactérias do género *Lactobacillus*, com resultados discrepantes entre os diferentes estudos. Tal como apontado por Hashimoto & Kyono, parece ser necessário reavaliar a quantidade de *Lactobacillus* considerada “normal” e como tendo um impacto positivo em *outcomes* reprodutivos. A classificação proposta por Moreno et al. de amostras LD e NLD, e admitida por alguns dos estudos abordados nesta revisão, pode não traduzir uma análise dos dados obtidos que corresponda à realidade da influência da abundância de *Lactobacillus* no meio uterino. Fica por esclarecer, também, que bactérias são efetivamente consideradas possivelmente patogénicas, e quais fazem apenas parte da microbiota comensal uterina.

Microbioma uterino e falha recorrente de implantação (RIF)

Com o crescente aumento da procura de tratamentos de Procriação Medicamente Assistida (PMA), é também crescente a quantidade de falhas nestes tratamentos, com necessidade de repetir estes procedimentos mais do que uma vez. A falha recorrente de implantação (*recurrent implantation failure*, RIF) pode ser definida como a não obtenção de uma gravidez clínica após transferências de embriões múltiplas. Uma definição de 2014 especifica que a RIF se define após a transferência

falhada de quatro ou mais embriões com boa qualidade, em pelo menos 3 ciclos, numa mulher com menos de 40 anos (Coughlan et al., 2014). A gestão desta condição foca-se em dois aspetos, a qualidade do embrião e a recetividade uterina, sabendo-se que a implantação no endométrio é o evento determinante de sucesso na transferência de embriões na PMA (Fanchin et al., 1998).

Vários autores estudaram a possível relação entre o microbioma uterino e a RIF. Nos estudos prospetivos de Vomstein et al., Lozano et al. e Chen et al. foram analisadas e comparadas amostras de úteros de um grupo controlo de mulheres saudáveis e de mulheres com história de RIF, verificando-se que nos grupos controlo a quantidade de *Lactobacillus* era significativamente superior, comparativamente aos grupos de mulheres com história de RIF (P. Chen et al., 2022; Lozano et al., 2023; Vomstein et al., 2022).

Um estudo em particular pretendeu analisar a relação entre um útero disbiótico e fatores inflamatórios em mulheres com história de RIF, e verificou que as amostras do grupo de mulheres com disbiose uterina, classificado como tendo uma percentagem de *Lactobacillus* <90% (NLD), apresentaram uma maior proporção de marcadores inflamatórios como IL-1 β , IL-6, HIF-1 α e COX-2 e níveis inferiores de fatores anti-inflamatórios como IL-10 e IFG-1. Reportou, também, que a presença de *Lactobacillus* estava relacionada negativamente com concentrações elevadas de moléculas inflamatórias e que, por sua vez, a presença de microrganismos patogénicos como *Streptococcus* e *Gardnerella* se relacionaram positivamente com as concentrações de IL-1 β e IL-6. Relacionou, ainda, a presença de maiores concentrações de marcadores inflamatórios com piores *outcomes* após a transferência de embriões (Cela et al., 2022).

Já Ichiyama et al. não verificou uma clara diferença das percentagens de *Lactobacillus* entre o grupo controlo e o grupo com história de RIF. Relata, ainda, que apenas 1/3 das mulheres do grupo controlo apresentavam um útero LD de acordo com a classificação de Moreno et al. de 2016, pelo que propôs que fosse reanalisado o *cut-off* de predominância de *Lactobacillus* que pareça ter efeitos positivos nos

outcomes reprodutivos, tal como anteriormente proposto por Hashimoto & Kyono (Ichiyama et al., 2021).

Outro estudo não encontrou evidência de que a presença dominante de *Lactobacillus* no útero tenha um impacto positivo em resultados reprodutivos, e não verificou que a presença de microrganismos oportunistas afetasse a taxa de gravidez (Keburiya et al., 2022). Kitaya et al. também não verificou significância estatística na diferença de quantidades de *Lactobacillus* entre o grupo controlo e o grupo com história de RIF, mas reportou que a bactéria *Burkholderia*, considerada potencialmente patogénica, estava apenas presente no grupo com RIF (Kitaya et al., 2019).

Constata-se, novamente, uma não concordância de resultados entre os vários estudos que analisaram o microbioma de mulheres com história de RIF. Continua a parecer que, mais importante que a presença de *Lactobacillus* no microbioma uterino, a presença de bactérias potencialmente patogénicas possa estar relacionada com piores *outcomes* reprodutivos. Esta disparidade de resultados pode ser atribuída a diversos fatores, incluindo a divisão de mulheres pelos grupos de acordo com a percentagem de *Lactobacillus* presente no útero, o que, como já mencionado anteriormente, pode enviesar os resultados dos estudos.

Microbioma uterino e endometrite crónica (EC)

A endometrite crónica (EC) é uma condição caracterizada pela inflamação persistente da mucosa endometrial, sendo frequentemente assintomática, ainda pouco reconhecida e, por isso, subdiagnosticada. Em mulheres com EC, existe uma infiltração de linfócitos B no estroma do endométrio, pelo que o método de diagnóstico com maior sensibilidade e mais utilizado para identificação desta patologia é a avaliação histopatológica por imunohistoquímica para o marcador de plasmócitos CD138+, através de histeroscopia (Kitaya et al., 2018). A prevalência desta condição não está ainda bem estabelecida, com diferentes estudos a estimar uma prevalência entre 10% e 57.8%, em mulheres com história de problemas de fertilidade (Park et al., 2016).

Como já abordado anteriormente, sabe-se que uma resposta imunitária adequada a nível uterino é importante para um endométrio recetivo e uma implantação correta do embrião. Verificou-se que existe uma diminuição da expressão de IL-10 e TGF- β nas mulheres com EC, sugerindo uma disfunção das células Treg, comprometendo o processo de implantação do embrião (W. Wang et al., 2019). Li et al. demonstrou que a quantidade de células imunes no útero em mulheres com EC está aumentada, o que pode significar que esta condição esteja associada a uma desregulação da ativação da resposta imunitária (Li et al., 2020). Assim, esta condição tem vindo a ser associada a piores *outcomes* reprodutivos.

Foi sugerida a teoria de que alterações da microbiota endometrial podem despoletar processos inflamatórios, perturbar a resposta imunitária e condicionar negativamente a recetividade uterina. Pode supor-se que a endometrite crónica e o seu efeito na diminuição das taxas de implantação e gravidez estejam relacionadas com a disbiose uterina (W. Chen et al., 2021).

Y. Liu et al. procurou estabelecer uma relação entre o microbioma uterino e a endometrite crónica, pelo que comparou o microbioma entre mulheres com EC e mulheres sem EC. Verificou que no grupo de mulheres com EC a quantidade de *Lactobacillus* era muito inferior ao grupo de mulheres saudáveis, e reportou, ainda, que *Acinetobacter* foi encontrado apenas no grupo com EC (Y. Liu et al., 2019). Lozano et al. conduziu um estudo semelhante, no qual concluiu que no grupo de mulheres com EC havia uma menor dominância de *Lactobacillus*, e maior quantidades de *Ralstonia* spp. e *Gardnerella* spp., em oposição ao grupo de mulheres sem EC, que apresentavam uma dominância clara de *Lactobacillus* (Lozano et al., 2021). Em oposição, um estudo de 2023 que analisou a composição do microbioma uterino em mulheres inférteis com e sem EC, relatou uma maior prevalência de *Lactobacillus* no grupo de mulheres com EC, face ao grupo controlo saudável (Liang et al., 2023).

Outro estudo pretendeu relacionar os achados da disbiose uterina e da endometrite crónica com os *outcomes* reprodutivos por técnicas de PMA. Chen et al. reportou que, no grupo de mulheres estudadas com EC, a taxa de gravidez foi menor que no grupo de mulheres sem EC. Verificou, ainda, que bactérias oportunistas como

Actinobacteria e Fusobacteria tinham maior prevalência no grupo com EC, e aferiu que um útero disbiótico teria um impacto negativo na taxa de sucesso dos tratamentos de PMA. Curiosamente, reportou que apesar de o género mais prevalente no microbioma uterino analisado ser *Lactobacillus*, este não se relacionou com os *outcomes* reprodutivos (W. Chen et al., 2021).

Um outro estudo pretendeu investigar a relação entre a endometrite crónica provocada por disbiose uterina e as alterações no ambiente imune, em mulheres com história de RIF. Chen et al. concluiu que, no grupo de mulheres com EC, havia uma maior prevalência de *Phyllobacterium* e *Sphingomonas* e que estas bactérias estavam positivamente relacionadas com a infiltração de células B no estroma do endométrio. Verificou, ainda, que *Sphingomonas* estava diretamente relacionada com uma diferenciação anormal de células uNK (P. Chen et al., 2022).

Estes resultados parecem confirmar a existência de uma relação entre bactérias possivelmente patogénicas e mecanismos de desregulação imune e de processos inflamatórios, que possam condicionar o desenvolvimento de endometrite crónica e, conseqüentemente, resultar em piores *outcomes* reprodutivos de técnicas de PMA. Continua a verificar-se relatos de distintas bactérias como potencialmente patogénicas.

Armas terapêuticas: antibióticos e probióticos

Os antibióticos são dos fármacos mais utilizados na prática da medicina, e permitem erradicar agentes patogénicos responsáveis por infeções dos mais variados sistemas. Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que contribuem para a saúde do hospedeiro, ao melhorarem o equilíbrio da microbiota, quando administrados em doses adequadas. Os benefícios dos probióticos na saúde humana são vários, desde o seu uso para melhorar a digestão e prevenir a diarreia no trato gastrointestinal, aos seus efeitos de fortalecimento do sistema imune, nomeadamente em condições alérgicas (Bodke & Jogdand, 2022). Já os prebióticos são componentes não digeríveis que promovem o crescimento e atividade bacteriana, com benefícios para o hospedeiro.

Particularmente no trato genital feminino, têm sido estudados os efeitos da utilização de probióticos, nomeadamente em situações de disbiose vaginal, tendo sido demonstrado o benefício da utilização de *Lactobacillus* no tratamento e prevenção de vaginose bacteriana, ajudando na reposição da microflora comensal da vagina (R. Chen et al., 2022). O facto de os probióticos parecerem ter um bom perfil de segurança, com mínimos efeitos adversos, torna-os uma opção terapêutica muito atrativa (Corbett et al., 2021). Com os recentes avanços no estudo do microbioma e o provável envolvimento da disbiose uterina nos mecanismos de infertilidade feminina, tem surgido a questão de se o tratamento desta alteração da microbiota pode condicionar uma melhoria dos resultados reprodutivos nos tratamentos de PMA, e ajudar a resolver situações de infertilidade.

Um estudo de 2020 analisou 392 mulheres com história de RIF, e dividiu-as em dois grupos, com base na classificação de Moreno et al., em LD com *Lactobacillus* $\geq 90\%$ (216 mulheres) e NLD (176 mulheres). As mulheres do grupo NLD foram divididas por testes terapêuticos distintos, entre prebióticos orais (lactoferrina), probióticos orais ou vaginais (compostos por *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*), antibiótico (metronidazol), ou utilizados em combinação. A escolha de metronidazol deveu-se à elevada prevalência de *Gardnerella* no grupo NLD, pelo que foi utilizado o mesmo tratamento que na vaginose bacteriana. Uma das conclusões deste estudo foi que o tratamento em combinação com probióticos, prebióticos e metronidazol foi bastante eficaz na reposição de *Lactobacillus* no microbioma uterino, em comparação com a utilização de apenas probióticos e prebióticos. Concluiu, também, que a administração vaginal de probióticos teve mais efeito que a administração oral, sugerindo que o tratamento da microbiota vaginal é importante para o tratamento da microbiota uterina (Kadogami et al., 2020). É de notar que este estudo apenas analisou o microbioma uterino antes e após os tratamentos, sem estudar se o aumento da quantidade de *Lactobacillus* estaria relacionada com uma melhoria nos *outcomes* reprodutivos destas mulheres.

Noutro estudo, foi analisado o microbioma de mulheres a realizar FIV, e foram tratadas mulheres com úteros NLD, de acordo com a classificação de Moreno et al., com prebióticos, probióticos e antibiótico (levofloxacina). As mulheres tratadas que transitaram de um útero NLD para LD, foram adicionadas ao grupo LD. Verificou-se que

a taxa de gravidez foi mais elevada no grupo LD do que no grupo NLD, mas sem significância estatística. Observou-se, ainda, que mulheres classificadas como NLD mas que apresentavam >80% de *Lactobacillus* ou um útero com predominância de *Bifidobacterium* mostraram bons *outcomes* reprodutivos (Kyono, Hashimoto, Kikuchi, et al., 2018). Pode-se aferir que uma classificação diferente dos dois grupos de mulheres poderia ter tido resultados estatisticamente significativos quanto ao papel de um útero eubiótico nas taxas de gravidez.

Iwami et al. realizou um estudo piloto prospectivo, em que avaliou se o tratamento de mulheres com úteros NLD teve impacto nas taxas de implantação e gravidez, em mulheres com história de RIF. Foram analisados os microbiomas de 131 mulheres, e foram administrados metronidazol a mulheres com elevada prevalência de *Gardnerella* no microbioma uterino, amoxicilina e ácido clavulânico a mulheres com >10% de *Streptococcus*, e ainda probióticos a todas as mulheres com disbiose uterina ou uma biomassa muito baixa. Comparou-se os *outcomes* reprodutivos destas mulheres com os do grupo controle, composto por 64 mulheres com história de RIF, que não realizaram análise do microbioma, nem qualquer tipo de tratamento. Concluiu-se que o grupo de estudo, composto por mulheres com eubiose uterina ou disbiose sujeita a tratamento, obtiveram taxas superiores de gravidez clínica (64.5% vs. 33.3%), de gravidez de curso (48.9% vs. 32.8%, $p = 0.028$), e de partos (48.9% vs. 31.2%) (Iwami et al., 2022). Neste estudo, não foi analisado o microbioma uterino das mulheres do grupo controle nem das mulheres com disbiose após os tratamentos, pelo que é difícil tecer conclusões relativamente às composições dos microbiomas e a sua relação com os *outcomes* reprodutivos.

Outro estudo de 2022 analisou o microbioma de 141 mulheres com história de RIF, sendo que 125 mulheres apresentavam bactérias potencialmente patogénicas, tendo sido tratadas com 14 dias do antibiótico oral, de acordo com o recomendado para a bactéria predominante no microbioma. Verificou-se que as taxas de gravidez clínica e gravidez de curso foram superiores no grupo tratado com antibiótico que no grupo controle, mas sem significância estatística (50.40% vs. 37.50%, $P > 0.05$; 42.40% vs. 25%, $P > 0.05$) (Zou et al., 2022).

Também foram realizados estudos para perceber o impacto do tratamento com antibiótico de endometrite crónica nos *outcomes* reprodutivos. O tratamento preconizado para EC é realizado com antibiótico durante 14 dias, sendo comumente utilizado doxiciclina, metronidazol ou ciprofloxacina. Uma revisão sistemática e meta-análise de 2022 analisou um total de 2154 mulheres em 12 estudos, e concluiu que a taxa de gravidez e partos aumentou de forma significativa no grupo curado de EC, em comparação com o grupo sem tratamento. Os autores sugerem que deve ser realizada uma biópsia após o antibiótico, para confirmar a eficácia de tratamento e cura da EC (J. Liu et al., 2022).

Apesar de ser uma área recente de estudo, parece haver evidência de que mulheres com disbiose uterina e/ou endometrite crónica podem beneficiar de terapêutica com prebióticos, probióticos e antibióticos. Contudo, os poucos estudos realizados até à data apresentam metodologias muito heterogéneas, que dificultam uma análise comparativa dos seus resultados. Serão necessários mais estudos para perceber com certeza se a erradicação de certas bactérias patogénicas leva a uma microbiota uterina saudável, e se esta se relaciona com uma melhoria franca dos *outcomes* reprodutivos. Já a evidência de que o tratamento de endometrite crónica leva a maiores taxas de gravidez e partos aparenta ser mais robusta.

Desafios e limitações do estudo do microbioma uterino

Apesar de o estudo do microbioma uterino já ter alguns anos, a investigação sobre a sua relação com a saúde reprodutiva e mecanismos de infertilidade feminina é relativamente recente, sendo que a vasta maioria dos estudos abordados nesta revisão foram publicados nos últimos 5 anos. Isto leva a que não exista, ainda, um protocolo padrão no desenho dos estudos, com uma heterogeneidade na metodologia que dificulta a comparação de resultados.

Uma grande limitação é o tamanho das amostras dos estudos do microbioma uterino, sendo poucos os estudos com populações de acima de 200 mulheres, e havendo estudos com amostras tão baixas como 19 mulheres (Carosso et al., 2020). É

importante notar que a demografia das mulheres selecionadas é muito variável, desde diferenças nas idades, etnias, IMC, hábitos sexuais e fases do ciclo menstrual. Como abordado anteriormente, todos estes fatores podem contribuir para variações na microbiota uterina.

Neste seguimento, é também relevante mencionar que, em particular nos estudos da microbiota uterina “normal”, o grupo de estudo raramente é composto por mulheres com um útero verdadeiramente saudável. Um estudo caracterizou o microbioma de mulheres não grávidas, mas com subfertilidade (Verstraelen et al., 2016), enquanto outro estudo analisou o microbioma em mulheres que iam realizar uma transferência de embrião (Franasiak et al., 2016). Dado muitas das recolhas serem realizadas em mulheres que já iriam ser sujeitas a um procedimento invasivo, é necessário desenhar estudos em que as mulheres são recrutadas especificamente para análise do microbioma, sem terem uma patologia de base, caso se pretenda chegar a um consenso quanto ao microbioma uterino “normal”.

Relativamente aos métodos de recolha, estes também não estão uniformizados, sendo na sua maioria realizada recolha de fluido e/ou tecido endometrial através da via transcervical. Idealmente, poderiam ser utilizadas abordagens que retirassem diretamente uma amostra uterina, tarefa dificultada dado o reduzido número de cirurgias em que o útero é aberto, resultando em estudos com amostras pouco significativas. Além disso, as histerectomias são normalmente realizadas a mulheres que possuem alguma patologia uterina, não se podendo retirar conclusões sobre um útero saudável (Verstraelen et al., 2016).

Adicionalmente, existe um elevado risco de contaminação das amostras, dada a baixa biomassa de microrganismos no útero, que pode ser facilmente contaminada por bactérias ou DNA bacteriano presentes no ar, no equipamento de laboratório, ou mesmo nos reagentes utilizados nas amostras (Moreno & Simon, 2018). Um artigo de 2021 teceu recomendações para uma boa prática no que toca ao estudo do microbioma, e os autores recomendam a inclusão de controlos negativos, para detetar a presença de contaminantes (Molina et al., 2021).

Quanto aos métodos de análise, apesar de difundida a NGS como método mais eficaz, rápido e com menor custo, existe uma variabilidade entre estudos da escolha das regiões hipervariáveis analisadas do rRNA 16S, que pode ter influência nos resultados dos microrganismos obtidos. Além disso, a NGS apenas determina a presença de material genético microbial na amostra, não informando sobre a viabilidade das bactérias analisadas, nem aferindo com certeza qual a microbiota daquele ecossistema (Franasiak & Scott, 2017).

Conclusões

O estudo do microbioma uterino parece ser uma área promissora naquilo que é o entendimento dos mecanismos que levam à infertilidade feminina. Parece haver uma relação entre as bactérias comensais e os componentes do sistema imune na proteção do útero contra agentes invasivos, e uma influência das bactérias patogênicas no desencadear de processos inflamatórios e de desregulação imune, que contribuam para uma diminuição das taxas de implantação e gravidez.

Contudo, não existe ainda um consenso relativamente a qual o microbioma uterino considerado “normal”, nem a quais são efetivamente as bactérias potencialmente patogênicas, nem como se pode classificar a disbiose uterina. Acredita-se que exista uma predominância de *Lactobacillus* no útero saudável e que este tenha um papel importante na prevenção do aparecimento de microrganismos patogênicos, não havendo uma evidência robusta desta hipótese, com resultados heterogêneos nos estudos conduzidos.

A evidência da influência da endometrite crônica na infertilidade feminina é mais forte, bem como do impacto do tratamento com antibióticos desta condição nos resultados reprodutivos das técnicas de PMA. Parece, também, existir um potencial efeito positivo na utilização de prebióticos, probióticos e antibióticos nos casos de disbiose uterina, sendo este um campo de estudo ainda muito recente.

No futuro, poderá equacionar-se a análise do microbioma uterino antes da realização de técnicas de PMA. Esta análise requer um procedimento invasivo e acarreta custos, pelo que não fará sentido, à luz do conhecimento atual, realizar esta análise a todas as mulheres. No entanto, poderá ser interessante em certos casos, particularmente em mulheres com história de vários ciclos de transferência de embriões ou com um diagnóstico de endometrite crônica. Os resultados da análise, ao elucidarem quanto à composição do microbioma, e se revelarem um útero disbiótico, poderão orientar os médicos assistentes na administração de terapêutica que poderá ter efeitos benéficos e resultar, em última instância, numa maior chance de gravidez.

É, portanto, necessário realizar-se mais estudos, com um maior número de amostras e com menos fatores confundentes, para que existam resultados comparáveis, e que permitam que se compreenda inteiramente o papel do microbioma uterino na infertilidade feminina. Este maior entendimento poderá abrir novos caminhos na prevenção, diagnóstico e terapêuticas futuras da infertilidade.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a toda a gente que, direta ou indiretamente, fizeram parte do percurso que culminou na realização deste trabalho.

Ao Dr. Joaquim Nunes, por ter aceite orientar este trabalho, pelas palavras encorajadoras, confiança e apoio durante o processo de redação do trabalho e preparação da apresentação.

À minha família, sem a qual este percurso não teria sido possível. Ao avô Emílio e à avó Ana, que teriam ficado tão orgulhosos ao verem a sua neta formar-se em Medicina. Ao avô Carlos, à avó Cremilde e ao meu pai, que sentem esse orgulho todos os dias. Ao Francisco, em tudo um segundo pai para mim. À minha mãe, a minha maior apoiante, que vive as minhas conquistas como se fossem as suas, obrigada pelo apoio incondicional e por todos os sacrifícios.

À Faculdade que me formou e que me viu crescer. Aos meus padrinhos e afilhados. A todos os meus amigos, em particular à minha segunda família, Rita, Maria, Luísa, Bea, Bernas, Mariana, Junho, Baldo, Henrique e Filipe. São e serão sempre casa.

A todas as pessoas que conheci nestes 6 anos e que deixaram parte de si no meu percurso. Um obrigada não chega.

Referências

- Achache, H., & Revel, A. (2006). Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Human Reproduction Update*, *12*(6), 731–746.
<https://doi.org/10.1093/humupd/dml004>
- Al-Nasiry, S., Ambrosino, E., Schlaepfer, M., Morr , S. A., Wieten, L., Voncken, J. W., Spinelli, M., Mueller, M., & Kramer, B. W. (2020). The Interplay Between Reproductive Tract Microbiota and Immunological System in Human Reproduction. *Frontiers in Immunology*, *11*, 378. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00378>
- Baker, J. M., Chase, D. M., & Herbst-Kralovetz, M. M. (2018). Uterine Microbiota: Residents, Tourists, or Invaders? *Frontiers in Immunology*, *9*, 208.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00208>
- Berg, G., Rybakova, D., Fischer, D., Cernava, T., Verg s, M.-C. C., Charles, T., Chen, X., Cocolin, L., Eversole, K., Corral, G. H., Kazou, M., Kinkel, L., Lange, L., Lima, N., Loy, A., Macklin, J. A., Maguin, E., Mauchline, T., McClure, R., ... Schloter, M. (2020). Microbiome definition re-visited: Old concepts and new challenges. *Microbiome*, *8*(1), 103.
<https://doi.org/10.1186/s40168-020-00875-0>
- Bodke, H., & Jogdand, S. (2022). Role of Probiotics in Human Health. *Cureus*, *14*(11), e31313.
<https://doi.org/10.7759/cureus.31313>
- Bui, B. N., Van Hoogenhuijze, N., Viveen, M., Mol, F., Teklenburg, G., De Bruin, J.-P., Besselink, D., Brentjens, L. S., Mackens, S., Rogers, M. R. C., Steba, G. S., Broekmans, F., Paganelli, F. L., & Van De Wijgert, J. H. H. M. (2023). The endometrial microbiota of women with or without a live birth within 12 months after a first failed IVF/ICSI cycle. *Scientific Reports*, *13*(1), 3444. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-30591-2>
- Canha-Gouveia, A., Pérez-Prieto, I., Rodríguez, C. M., Escamez, T., Leon s-Ba os, I., Salas-Espejo, E., Prieto-Sánchez, M. T., Sánchez-Ferrer, M. L., Coy, P., & Altm e, S. (2023). The female upper reproductive tract harbors endogenous microbial profiles.

- Frontiers in Endocrinology*, 14, 1096050. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1096050>
- Cariati, F., Carotenuto, C., Bagnulo, F., Pacella, D., Marrone, V., Paolillo, R., Catania, M. R., Di Girolamo, R., Conforti, A., Strina, I., & Alviggi, C. (2023). Endometrial microbiota profile in in-vitro fertilization (IVF) patients by culturomics-based analysis. *Frontiers in Endocrinology*, 14, 1204729. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1204729>
- Carosso, A., Revelli, A., Gennarelli, G., Canosa, S., Cosma, S., Borella, F., Tancredi, A., Paschero, C., Boatti, L., Zanotto, E., Sidoti, F., Bottino, P., Costa, C., Cavallo, R., & Benedetto, C. (2020). Controlled ovarian stimulation and progesterone supplementation affect vaginal and endometrial microbiota in IVF cycles: A pilot study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 37(9), 2315–2326. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01878-4>
- Cela, V., Daniele, S., Obino, M. E. R., Ruggiero, M., Zappelli, E., Ceccarelli, L., Papini, F., Marzi, I., Scarfò, G., Tosi, F., Franzoni, F., Martini, C., & Artini, P. G. (2022). Endometrial Dysbiosis Is Related to Inflammatory Factors in Women with Repeated Implantation Failure: A Pilot Study. *Journal of Clinical Medicine*, 11(9), 2481. <https://doi.org/10.3390/jcm11092481>
- Chen, P., Jia, L., Zhou, Y., Guo, Y., Fang, C., & Li, T. (2022). Interaction between endometrial microbiota and host gene regulation in recurrent implantation failure. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 39(9), 2169–2178. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02573-2>
- Chen, R., Li, R., Qing, W., Zhang, Y., Zhou, Z., Hou, Y., Shi, Y., Zhou, H., & Chen, M. (2022). Probiotics are a good choice for the treatment of bacterial vaginosis: A meta-analysis of randomized controlled trial. *Reproductive Health*, 19, 137. <https://doi.org/10.1186/s12978-022-01449-z>
- Chen, W., Wei, K., He, X., Wei, J., Yang, L., Li, L., Chen, T., & Tan, B. (2021). Identification of Uterine Microbiota in Infertile Women Receiving in vitro Fertilization With and Without

- Chronic Endometritis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 693267.
<https://doi.org/10.3389/fcell.2021.693267>
- Corbett, G., Crosby, D., & McAuliffe, F. (2021). Probiotic therapy in couples with infertility: A systematic review. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 256, 95–100. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2020.10.054>
- Coughlan, C., Ledger, W., Wang, Q., Liu, F., Demirel, A., Gurgan, T., Cutting, R., Ong, K., Sallam, H., & Li, T. C. (2014). Recurrent implantation failure: Definition and management. *Reproductive BioMedicine Online*, 28(1), 14–38.
<https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.08.011>
- Diaz-Martínez, M. D. C., Bernabeu, A., Lledó, B., Carratalá-Munuera, C., Quesada, J. A., Lozano, F. M., Ruiz, V., Morales, R., Llácer, J., Ten, J., Castillo, J. C., Rodríguez, A., Nouni-García, R., López-Pineda, A., Moliner, B., & Bernabeu, R. (2021). Impact of the Vaginal and Endometrial Microbiome Pattern on Assisted Reproduction Outcomes. *Journal of Clinical Medicine*, 10(18), 4063. <https://doi.org/10.3390/jcm10184063>
- Fanchin, R., Harmas, A., Benaoudia, F., Lundkvist, U., Olivennes, F., & Frydman, R. (1998). Microbial flora of the cervix assessed at the time of embryo transfer adversely affects in vitro fertilization outcome. *Fertility and Sterility*, 70(5), 866–870.
[https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(98\)00277-5](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(98)00277-5)
- Franasiak, J. M., & Scott, R. T. (2017). Endometrial microbiome. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 29(3), 146–152. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000357>
- Franasiak, J. M., Werner, M. D., Juneau, C. R., Tao, X., Landis, J., Zhan, Y., Treff, N. R., & Scott, R. T. (2016). Endometrial microbiome at the time of embryo transfer: Next-generation sequencing of the 16S ribosomal subunit. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(1), 129–136. <https://doi.org/10.1007/s10815-015-0614-z>
- Fujii, S., & Oguchi, T. (2023). Age- and endometrial microbiota-related delay in development of endometrial receptivity. *Reproductive Medicine and Biology*, 22(1), e12523.

<https://doi.org/10.1002/rmb2.12523>

Gao, X. S., Laven, J., Louwers, Y., Budding, A., & Schoenmakers, S. (2022). Microbiome as a predictor of implantation. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, *34*(3), 122–132.

<https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000782>

Garcia-Grau, I., Simon, C., & Moreno, I. (2019). Uterine microbiome—Low biomass and high expectations†. *Biology of Reproduction*, *101*(6), 1102–1114.

<https://doi.org/10.1093/biolre/iory257>

Harris, E. (2023). Infertility Affects 1 in 6 People Globally. *JAMA*.

Hashimoto, T., & Kyono, K. (2019). Does dysbiotic endometrium affect blastocyst implantation in IVF patients? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *36*(12), 2471–2479.

<https://doi.org/10.1007/s10815-019-01630-7>

Ichiyama, T., Kuroda, K., Nagai, Y., Urushiyama, D., Ohno, M., Yamaguchi, T., Nagayoshi, M., Sakuraba, Y., Yamasaki, F., Hata, K., Miyamoto, S., Itakura, A., Takeda, S., & Tanaka, A. (2021). Analysis of vaginal and endometrial microbiota communities in infertile women with a history of repeated implantation failure. *Reproductive Medicine and Biology*, *20*(3), 334–344. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12389>

Iwami, N., Kawamata, M., Ozawa, N., Yamamoto, T., Watanabe, E., Mizuuchi, M., Moriwaka, O., & Kamiya, H. (2022). Therapeutic intervention based on gene sequencing analysis of microbial 16S ribosomal RNA of the intrauterine microbiome improves pregnancy outcomes in IVF patients: A prospective cohort study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *40*(1), 125–135. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02688-6>

Kadogami, D., Nakaoka, Y., & Morimoto, Y. (2020). Use of a vaginal probiotic suppository and antibiotics to influence the composition of the endometrial microbiota. *Reproductive Biology*, *20*(3), 307–314. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.07.001>

Kaluanga Bwanga, P., Tremblay-Lemoine, P.-L., Timmermans, M., Ravet, S., Munaut, C., Nisolle, M., & Henry, L. (2023). The Endometrial Microbiota: Challenges and Prospects.

Medicina, 59(9), 1540. <https://doi.org/10.3390/medicina59091540>

Keburiya, L. K., Smolnikova, V. Yu., Pripitnevich, T. V., Muravieva, V. V., Gordeev, A. B., Trofimov, D. Yu., Shubina, E. S., Kochetkova, T. O., Rogacheva, M. S., Kalinina, E. A., & Sukhikh, G. T. (2022). Does the uterine microbiota affect the reproductive outcomes in women with recurrent implantation failures? *BMC Women's Health*, 22(1), 168.

<https://doi.org/10.1186/s12905-022-01750-w>

Kitaya, K., Nagai, Y., Arai, W., Sakuraba, Y., & Ishikawa, T. (2019). Characterization of Microbiota in Endometrial Fluid and Vaginal Secretions in Infertile Women with Repeated Implantation Failure. *Mediators of Inflammation*, 2019, 1–10.

<https://doi.org/10.1155/2019/4893437>

Kitaya, K., Takeuchi, T., Mizuta, S., Matsubayashi, H., & Ishikawa, T. (2018). Endometritis: New time, new concepts. *Fertility and Sterility*, 110(3), 344–350.

<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.04.012>

Kyono, K., Hashimoto, T., Kikuchi, S., Nagai, Y., & Sakuraba, Y. (2018). 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. *Reproductive Medicine and Biology*, 18(1), 72–82.

<https://doi.org/10.1002/rmb2.12250>

Kyono, K., Hashimoto, T., Nagai, Y., & Sakuraba, Y. (2018). Analysis of endometrial microbiota by 16S ribosomal RNA gene sequencing among infertile patients: A single-center pilot study. *Reproductive Medicine and Biology*, 17(3), 297–306.

<https://doi.org/10.1002/rmb2.12105>

Lazzari, E., Potančoková, M., Sobotka, T., Gray, E., & Chambers, G. M. (2023). Projecting the Contribution of Assisted Reproductive Technology to Completed Cohort Fertility. *Population Research and Policy Review*, 42(1), 6.

<https://doi.org/10.1007/s11113-023-09765-3>

- Li, Y., Yu, S., Huang, C., Lian, R., Chen, C., Liu, S., Li, L., Diao, L., Markert, U. R., & Zeng, Y. (2020). Evaluation of peripheral and uterine immune status of chronic endometritis in patients with recurrent reproductive failure. *Fertility and Sterility*, *113*(1), 187-196.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.09.001>
- Liang, J., Li, M., Zhang, L., Yang, Y., Jin, X., Zhang, Q., Lv, T., Huang, Z., Liao, Q., & Tong, X. (2023). Analysis of the microbiota composition in the genital tract of infertile patients with chronic endometritis or endometrial polyps. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *13*, 1125640. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1125640>
- Liu, J., Liu, Z. A., Liu, Y., Cheng, L., & Yan, L. (2022). Impact of antibiotic treatment for chronic endometritis on pregnancy outcomes in women with reproductive failures (RIF and RPL): A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Medicine*, *9*, 980511. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.980511>
- Liu, Y., Ko, E. Y.-L., Wong, K. K.-W., Chen, X., Cheung, W.-C., Law, T. S.-M., Chung, J. P.-W., Tsui, S. K.-W., Li, T.-C., & Chim, S. S.-C. (2019). Endometrial microbiota in infertile women with and without chronic endometritis as diagnosed using a quantitative and reference range-based method. *Fertility and Sterility*, *112*(4), 707-717.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.05.015>
- Liu, Y., Wong, K. K.-W., Ko, E. Y.-L., Chen, X., Huang, J., Tsui, S. K.-W., Li, T. C., & Chim, S. S.-C. (2018). Systematic Comparison of Bacterial Colonization of Endometrial Tissue and Fluid Samples in Recurrent Miscarriage Patients: Implications for Future Endometrial Microbiome Studies. *Clinical Chemistry*, *64*(12), 1743–1752. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2018.289306>
- Lozano, F. M., Bernabeu, A., Lledo, B., Morales, R., Diaz, M., Aranda, F. I., Llacer, J., & Bernabeu, R. (2021). Characterization of the vaginal and endometrial microbiome in patients with chronic endometritis. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, *263*, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2021.05.045>

- Lozano, F. M., Lledó, B., Morales, R., Cascales, A., Hortal, M., Bernabeu, A., & Bernabeu, R. (2023). Characterization of the Endometrial Microbiome in Patients with Recurrent Implantation Failure. *Microorganisms*, *11*(3), 741.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11030741>
- Malla, M. A., Dubey, A., Kumar, A., Yadav, S., Hashem, A., & Abd_Allah, E. F. (2019). Exploring the Human Microbiome: The Potential Future Role of Next-Generation Sequencing in Disease Diagnosis and Treatment. *Frontiers in Immunology*, *9*, 2868.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02868>
- Molina, N. M., Sola-Leyva, A., Haahr, T., Aghajanova, L., Laudanski, P., Castilla, J. A., & Altmäe, S. (2021). Analysing endometrial microbiome: Methodological considerations and recommendations for good practice. *Human Reproduction*, *36*(4), 859–879.
<https://doi.org/10.1093/humrep/deab009>
- Moreno, I., Codoñer, F. M., Vilella, F., Valbuena, D., Martinez-Blanch, J. F., Jimenez-Almazán, J., Alonso, R., Alamá, P., Remohí, J., Pellicer, A., Ramon, D., & Simon, C. (2016). Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *215*(6), 684–703.
<https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.09.075>
- Moreno, I., Garcia-Grau, I., Perez-Villaroya, D., Gonzalez-Monfort, M., Bahçeci, M., Barrionuevo, M. J., Taguchi, S., Puente, E., Dimattina, M., Lim, M. W., Meneghini, G., Aubuchon, M., Leondires, M., Izquierdo, A., Perez-Olgati, M., Chavez, A., Seethram, K., Bau, D., Gomez, C., ... Simon, C. (2022). Endometrial microbiota composition is associated with reproductive outcome in infertile patients. *Microbiome*, *10*(1), 1.
<https://doi.org/10.1186/s40168-021-01184-w>
- Moreno, I., & Simon, C. (2018). Relevance of assessing the uterine microbiota in infertility. *Fertility and Sterility*, *110*(3), 337–343.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.04.041>

- Moreno, I., & Simon, C. (2019). Deciphering the effect of reproductive tract microbiota on human reproduction. *Reproductive Medicine and Biology*, *18*(1), 40–50.
<https://doi.org/10.1002/rmb2.12249>
- Park, H. J., Kim, Y. S., Yoon, T. K., & Lee, W. S. (2016). Chronic endometritis and infertility. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, *43*(4), 185.
<https://doi.org/10.5653/cerm.2016.43.4.185>
- Punzón-Jiménez, P., & Labarta, E. (2021). The impact of the female genital tract microbiome in women health and reproduction: A review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *38*(10), 2519–2541. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02247-5>
- Reschini, M., Benaglia, L., Ceriotti, F., Borroni, R., Ferrari, S., Castiglioni, M., Guarneri, D., Porcaro, L., Viganò, P., Somigliana, E., & Uceda Renteria, S. (2022). Endometrial microbiome: Sampling, assessment, and possible impact on embryo implantation. *Scientific Reports*, *12*(1), 8467. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-12095-7>
- Riganelli, L., Iebba, V., Piccioni, M., Illuminati, I., Bonfiglio, G., Neroni, B., Calvo, L., Gagliardi, A., Levrero, M., Merlino, L., Mariani, M., Capri, O., Pietrangeli, D., Schippa, S., & Guerrieri, F. (2020). Structural Variations of Vaginal and Endometrial Microbiota: Hints on Female Infertility. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 350.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00350>
- Sehring, J., Beltsos, A., & Jeelani, R. (2022). Human implantation: The complex interplay between endometrial receptivity, inflammation, and the microbiome. *Placenta*, *117*, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2021.12.015>
- Sojka, D. K., Yang, L., & Yokoyama, W. M. (2019). Uterine Natural Killer Cells. *Frontiers in Immunology*, *10*, 960. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00960>
- The Guideline Group on Unexplained Infertility, Romualdi, D., Ata, B., Bhattacharya, S., Bosch, E., Costello, M., Gersak, K., Homburg, R., Mincheva, M., Norman, R. J., Piltonen, T., Dos Santos-Ribeiro, S., Scicluna, D., Somers, S., Sunkara, S. K., Verhoeve, H. R., & Le Clef, N.

- (2023). Evidence-based guideline: Unexplained infertility. *Human Reproduction*, 38(10), 1881–1890. <https://doi.org/10.1093/humrep/dead150>
- Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, 474(11), 1823–1836. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160510>
- Tomaiuolo, R., Veneruso, I., Cariati, F., & D'Argenio, V. (2020). Microbiota and Human Reproduction: The Case of Female Infertility. *High-Throughput*, 9(2), 12. <https://doi.org/10.3390/ht9020012>
- Vemuri, R., & Herath, M. P. (2023). Beyond the Gut, Emerging Microbiome Areas of Research: A Focus on Early-Life Microbial Colonization. *Microorganisms*, 11(2), 239. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020239>
- Verstraelen, H., Vilchez-Vargas, R., Desimpel, F., Jauregui, R., Vankeirsbilck, N., Weyers, S., Verhelst, R., De Sutter, P., Pieper, D. H., & Van De Wiele, T. (2016). Characterisation of the human uterine microbiome in non-pregnant women through deep sequencing of the V1-2 region of the 16S rRNA gene. *PeerJ*, 4, e1602. <https://doi.org/10.7717/peerj.1602>
- Vomstein, K., Reider, S., Böttcher, B., Watschinger, C., Kyvelidou, C., Tilg, H., Moschen, A. R., & Toth, B. (2022). Uterine microbiota plasticity during the menstrual cycle: Differences between healthy controls and patients with recurrent miscarriage or implantation failure. *Journal of Reproductive Immunology*, 151, 103634. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2022.103634>
- Wang, J., Li, Z., Ma, X., Du, L., Jia, Z., Cui, X., Yu, L., Yang, J., Xiao, L., Zhang, B., Fan, H., & Zhao, F. (2021). Translocation of vaginal microbiota is involved in impairment and protection of uterine health. *Nature Communications*, 12(1), 4191. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24516-8>
- Wang, W., Zhang, H., Chen, Z., Zhang, W., Liu, X., Fang, J., Liu, F., & Kwak-Kim, J. (2019). Endometrial TGF- β , IL-10, IL-17 and autophagy are dysregulated in women with

- recurrent implantation failure with chronic endometritis. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 17, 2. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0444-9>
- Wee, B. A., Thomas, M., Sweeney, E. L., Frentiu, F. D., Samios, M., Ravel, J., Gajer, P., Myers, G., Timms, P., Allan, J. A., & Huston, W. M. (2018). A retrospective pilot study to determine whether the reproductive tract microbiota differs between women with a history of infertility and fertile women. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 58(3), 341–348. <https://doi.org/10.1111/ajo.12754>
- Winters, A. D., Romero, R., Gervasi, M. T., Gomez-Lopez, N., Tran, M. R., Garcia-Flores, V., Pacora, P., Jung, E., Hassan, S. S., Hsu, C.-D., & Theis, K. R. (2019). Does the endometrial cavity have a molecular microbial signature? *Scientific Reports*, 9(1), 9905. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46173-0>
- Zhu, N., Yang, X., Liu, Q., Chen, Y., Wang, X., Li, H., & Gao, H. (2022). “Iron triangle” of regulating the uterine microecology: Endometrial microbiota, immunity and endometrium. *Frontiers in Immunology*, 13, 928475. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.928475>
- Zou, Y., Liu, X., Chen, P., Wang, Y., Li, W., & Huang, R. (2022). The endometrial microbiota profile influenced pregnancy outcomes in patients with repeated implantation failure: A retrospective study. *Journal of Reproductive Immunology*, 155, 103782. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2022.103782>