

“O Papel do Microbioma Vaginal na Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo”

Sara Raquel Moreira

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Medicina
(mestrado integrado)

Orientador: Prof. Doutor José Alberto Fonseca Moutinho

maio de 2022

Dedicatória

Para o Fred.

Agradecimentos

Queria agradecer à minha família, em especial aos meus pais e avós, por todo o apoio dado desde sempre.

À família de amigos que formei na Covilhã, que em todos os momentos me ajudaram a crescer. Tornaram esta cidade estranha longe de casa numa segunda casa da qual nunca me vou esquecer.

À Covilhã, cidade neve, cidade dos arco-íris, cidade dos sorrisos, das lágrimas, das alegrias, das tristezas, dos desafios. Pelas paisagens, o céu, as nuvens, os trilhos, as luzes, as cores, o sol e a chuva. A cidade onde verdadeiramente cresci.

Agradeço também ao Professor Doutor José Moutinho, sem o qual nunca teria conseguido realizar esta dissertação.

À FCS-UBI, por estes anos incríveis.

Obrigada, do fundo do coração.

Resumo

A Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo é definida como a Rotura Prematura de Membranas que ocorre antes das 37 semanas de gestação. É um problema significativo na prática obstétrica, responsável por 1/3 dos partos pré-termo, e causa de morbidade e mortalidade materna e neonatal. Apesar dos vários fatores clínicos de risco identificados, apenas alguns são modificáveis, e a esmagadora maioria dos pacientes não têm fatores de risco. Consequentemente, a previsão do risco de RPM-PT e as medidas de prevenção primárias não se demonstram eficazes e não são recomendadas na prática clínica. Como o desenvolvimento das técnicas moleculares de caracterização dos microrganismos do microbioma e da sua crescente associação com inúmeras entidades patológicas, o estudo do microbioma vaginal tem suscitado interesse como fator na gênese da RPM-PT.

Esta dissertação pretende conhecer o papel do microbioma vaginal na RPM-PT, nomeadamente no que diz respeito às características do microbioma vaginal durante a gravidez, a sua influência no risco subsequente de RPM-PT, o microbioma no momento da RPM-PT, e os efeitos da antibioterapia usada em contexto de RPM-PT no microbioma vaginal. Para isso foi realizada uma pesquisa bibliográfica através da plataforma PubMed entre agosto de 2021 e abril de 2022.

Conclui-se que o microbioma vaginal com redução da dominância relativa de *Lactobacillus spp.* e aumento da diversidade de outras espécies de microrganismos está associado ao aumento do risco de RPM-PT, destacando o seu papel como um fator de risco modificável para a RPM-PT, que poderá contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens de rastreio de risco e abordagem do mesmo, contribuindo assim para melhores resultados obstétricos.

Palavras-chave

Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo; Microbioma Vaginal; Microbiota Vaginal

Abstract

Premature Preterm Rupture of Membranes is defined as the Premature Rupture of Membranes that occurs before 37 weeks of gestation. It is a significant problem in obstetric practice, responsible for 1/3 of preterm births, and a cause of maternal and neonatal morbidity and mortality. Despite the many clinical risk factors identified, only a few are modifiable, and an overwhelming majority of patients have no risk factors. Consequently, prediction of the risk of PPRM and primary prevention measures have not been implemented and have not been recommended in clinical practice. With the development of molecular techniques for characterization of microbiome microorganisms and their increasing association with numerous pathological entities, the study of the vaginal microbiome evoked interest as a factor in the genesis of RPM-PT.

This dissertation intends to understand the role of the vaginal microbiome in PPRM, mainly with regard to the characteristics of the vaginal microbiome during pregnancy, its influence on the subsequent risk of PPRM, the microbiome at the time of PPRM, and the effects of antibiotic therapy used in the context of PPRM on the vaginal microbiome. For this, bibliographic research was carried out through the PubMed platform between August 2021 and April 2022.

It is concluded that the vaginal microbiome with reduced relative dominance of *Lactobacillus spp.* and increased diversity of other species of microorganisms is associated with an increased risk of RPM-PT, highlighting its role as a modifiable risk factor for RPM-PT, which could contribute to the development of new risk screening approaches and management, thus contributing to better obstetric outcomes.

Keywords

Premature Preterm Rupture of Membranes; Vaginal Microbiome; Vaginal Microbiota

Índice

Dedicatória	iii
Agradecimentos	v
Resumo	vii
Palavras-chave	vii
Abstract	ix
Keywords	ix
Índice	xi
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Acrónimos	xv
1. Introdução	1
1.1 Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo	1
1.2 Definição de Microbiota e Microbioma	2
1.3 O microbioma, a saúde e a doença	2
1.4 O Microbioma Vaginal	4
1.4.1 A evolução do microbioma vaginal ao longo do ciclo de vida	6
1.5 O microbioma, a saúde e a doença ginecológica	7
2. Objetivos	11
3. Materiais e Métodos	13
4. Resultados e Discussão	15
4.1 O microbioma vaginal durante a gravidez	15
4.2 O microbioma vaginal e a RPM-PT	18
4.2.1 Microbioma vaginal e o risco subsequente de RPM-PT	18
4.2.2 Microbioma vaginal no momento da RPM-PT	22
4.3 Efeitos da antibioterapia no microbioma vaginal no momento da RPM-PT	24
5. Conclusão e perspetivas futuras	27
7. Referências Bibliográficas	29

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Resumo da classificação CSTs com base em Ravel et al.(13), Gajer et al.(17) e Albert et al.(18)	6
--	---

Lista de Acrónimos

AGCCs	Ácidos gordos de cadeia curta
AMPs	Antimicrobial peptides (peptídeos antimicrobianos)
BAVB	Bactérias Associadas à Vaginose Bacteriana
CST	Community State Types (Tipos de Estado da Comunidade)
DII	Doença inflamatória intestinal
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
DV	Disbiose Vaginal
HIV	Human immunodeficiency vírus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HPV	Human papillomavirus (Vírus do papiloma humano)
HSV-2	Herpes simplex virus- 2 (Vírus herpes simples -2)
Ig	Imunoglobulina
IIA	Infeção intra amniótica
IL	Interleucinas
IMCA	Invasão microbial da cavidade amniótica
ISTs	Infeções sexualmente transmissíveis
MBL	Mannose binding lectin
MV	Microbioma Vaginal
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease (doença hepática gordurosa não alcoólica)
NK	Natural Killer
NOD	NOD-like receptors
PPT	Parto pré-termo
PRRs	Pattern recognition receptors (Recetores de reconhecimento de padrões)
RPM-PT	Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo
SII	Síndrome do intestino irritável
Th	T helper
TLRs	Toll-like receptors
TNF- α	Tumor necrosis factor - α (Fator de necrose tumoral- α)
VA	Vaginite aeróbica
VB	Vaginose bacteriana

1. Introdução

1.1 Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo

Por Rotura prematura de membranas (RPM) entende-se a perda de integridade das membranas amnióticas antes do início do parto. A Rotura Prematura de Membranas Pré-Termo (RPM-PT) é definida como a RPM antes das 37 semanas de gestação.(1-3). É um problema significativo na prática obstétrica, que afeta 3-4% de todas as gravidezes e precede 40-50% de todos os partos pré-termo (PPT).(1,2,4)

Apesar dos vários fatores clínicos de risco identificados, apenas alguns são modificáveis, e a esmagadora maioria dos pacientes não têm fatores de risco.(5) Consequentemente, a previsão do risco de RPM-PT e as medidas de prevenção primárias não se demonstram eficazes e não são recomendadas na prática clínica.(5)

As principais complicações da RPM-PT incluem infecção intrauterina, complicações obstétricas, infecções feto-neonatais (corioamnionite e sépsis), morbidade (incluindo hipoplasia pulmonar, malformações esqueléticas, hemorragia intraventricular, enterocolite necrotizante) e mortalidade neonatal devido à prematuridade.(2,4,5) O prognóstico neonatal está largamente condicionado pela idade gestacional ao nascimento, uma vez que a prematuridade é fator de risco para desenvolvimento de distúrbios cardiovasculares, síndrome da dificuldade respiratória, deficiências de desenvolvimento neurológico e dificuldades de aprendizagem, em comparação com crianças nascidas a termo, para além de maior risco de doenças crônicas na idade adulta.(5,6)

Fatores comportamentais (por exemplo, tabagismo, abuso de substâncias, desnutrição e coito durante a gravidez), complicações obstétricas (por exemplo, gestação múltipla, polidrâmnios, colo do útero incompetente, sangramento gestacional, cirurgia cervical prévia e trauma pré-natal) têm sido apontados como causa de RPM-PT. Fatores ambientais (por exemplo, stress e exposição a toxinas) e predisposição genética também foram propostos. Os sinais bioquímicos do feto, incluindo sinais endócrinos que promovem a apoptose da membrana fetal, também foram implicados no início da RPM-PT.(1,3) Infecções do trato reprodutivo materno (por exemplo, Vaginose Bacteriana (VB), tricomoníase, gonorreia, clamídia e corioamnionite oculta), Também têm sido associados à RPM-PT.(1)

Com o desenvolvimento das técnicas moleculares de caracterização dos microrganismos do microbioma e da sua crescente associação com inúmeras entidades patológicas, o estudo do microbioma vaginal tem suscitado interesse como fator na gênese da RPM-PT.

1.2 Definição de Microbiota e Microbioma

A microbiota humana consiste nos cerca de 10 a 100 mil milhões de microrganismos que vivem em simbiose no corpo humano, enquanto que o microbioma se refere a todo o habitat, incluindo a junção de microrganismos e os seus genomas, e as condições do ambiente.(7–9)

A definição de microbioma mais citada atualmente descreve o microbioma num contexto ecológico, como uma comunidade comensal, simbiótica e patogénica de microrganismos que afeta ativamente várias funções do hospedeiro, incluindo o ritmo circadiano, respostas nutricionais, metabolismo, imunidade, comportamento e doenças.(10–12)

1.3 O microbioma, a saúde e a doença

O corpo humano abriga microrganismos que habitam superfícies e cavidades expostas ou conectadas ao ambiente externo.(13) Cada área do nosso corpo inclui comunidades ecológicas de espécies microbianas que existem numa relação mutualística com o hospedeiro.(13) Os tipos de organismos presentes são altamente dependentes das condições ambientais predominantes e dos fatores do hospedeiro e, portanto, variam de local para local. Além disso, eles variam entre os indivíduos e ao longo do tempo.(13) Ao longo da última década, foram feitas descobertas importantes acerca do microbioma com alterações na nutrição, imunidade, comportamento e doenças. (12) O microbioma mais estudado tem sido o microbioma intestinal.

A microbiota intestinal é uma comunidade complexa de microrganismos que vivem no trato gastrointestinal, nos humanos possui as maiores quantidades de microrganismos e o maior número de espécies em comparação com outras partes do corpo.(14) Tem muitas funções significativas, incluindo o suporte à proteção contra patógenos colonizadores das superfícies da mucosa e a criação de diferentes substâncias antimicrobianas, melhorando o sistema imunitário, desempenhando um papel vital na digestão e no metabolismo, controlando a proliferação e diferenciação de células

epiteliais, modificando a resistência à insulina e afetando a sua secreção, influenciando a comunicação cérebro-intestino, afetando assim as funções mentais e neurológicas do hospedeiro.(14) Portanto, a microbiota intestinal desempenha um papel significativo no funcionamento normal do organismo hospedeiro.(14)

Em geral, a microbiota intestinal é responsável pela metabolização dos elementos dietéticos em componentes alimentares bioativos.(14) Essas bactérias podem metabolizar hidratos de carbono não digeríveis em ácidos gordos de cadeia curta (AGCCs).(14) Esses produtos de fermentação servem como uma fonte de energia significativa para as células epiteliais intestinais e, portanto, fortalecem a barreira da mucosa.(14) Além disso, é relatado que os AGCCs têm propriedades anti-inflamatórias e quimiopreventivas promissoras, sendo por isso considerados supressores de tumor.(14)

A microbiota intestinal também desempenha um papel essencial na síntese de vitaminas como biotina, tiamina, cobalamina, riboflavina, nicotina e ácidos pantotênicos, além de vitamina B e K.(14) Para além disso, foi relatado que tem a capacidade de sintetizar alguns neuroquímicos que podem afetar o sistema nervoso central e entérico periférico.(14) Por fim, a microbiota intestinal está envolvida na síntese de ácidos biliares, colesterol e ácidos gordos conjugados.(14)

A microbiota intestinal desempenha outros papéis importantes na saúde dos hospedeiros.(14) Por exemplo, tem um impacto significativo no crescimento e desenvolvimento ósseo através dos AGCCs, que aumentam a absorção de cálcio e outros minerais, e atua também como um imunorregulador dos processos de remodelação óssea mediados por osteoclastos e osteoblastos.(14)

Outro contributo da microbiota intestinal para a saúde do hospedeiro é o eixo intestino-cérebro, definido como um sistema de comunicação bidirecional através do qual os microrganismos intestinais comunicam com o cérebro e vice-versa.(14) Este eixo correlaciona o trato gastrointestinal e o sistema nervoso central, permitindo coordenar as funções intestinais e conectar os centros emocionais do cérebro com as funções intestinais periféricas e mecanismos como o reflexo entérico, permeabilidade intestinal, ativação imune e sinalização enteroendócrina.(14)

Quando esta simbiose complexa entra em rotura, a disbiose resultante está associada ao desenvolvimento de várias doenças.(14) Dentro das doenças intestinais e hepáticas, a disbiose intestinal está relacionada com a síndrome do intestino irritável (SII),

doença inflamatória intestinal (DII), esteatose hepática e doença hepática gordurosa não alcoólica (NAFLD).(14) Está também relacionada com doenças metabólicas como obesidade e diabetes, doenças relacionadas com o sistema imunitário, como rinosinusite e conjuntivite alérgicas, eczema atópico e asma, doenças cardiovasculares e aterosclerose.(14) Existe também evidência do envolvimento da microbiota no cancro colon-retal, visto que algumas bactérias como *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis* e *Helicobacter hepaticus* potencializam a carcinogénese através da produção de compostos que resultam num grande dano ao DNA, enquanto outras bactérias, como *Fusobacterium nucleatum*, podem aumentar indiretamente a carcinogénese, mantendo um microambiente pró-inflamatório persistente.(14)

1.4 O Microbioma Vaginal

O Microbioma Vaginal (MV) saudável, na mulher de idade fértil não grávida, é tipicamente caracterizado pela dominância de uma única ou várias espécies de *Lactobacillus spp.*, tais como *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. jensenii*, *L. iners* e em menor grau por espécies como *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. mucosae*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* and *L. vaginalis*. (6,12,15) Estas bactérias produzem ácido láctico e peróxido de hidrogénio, criando um ambiente que promove ao hospedeiro proteção contra colonizações associadas com vaginose bacteriana, doença inflamatória pélvica, candidíase, infeções sexualmente transmissíveis (ISTs), HIV, HSV-2 e HPV carcinogénico.(6,9,12,15)

Alterações na composição bacteriana do microbioma vaginal podem levar a disbiose.(15) Enquanto que a eubiose vaginal é caracterizada por uma dominância benéfica de *Lactobacillus spp.*, a disbiose vaginal (DV) caracteriza-se por um crescimento excessivo de múltiplos organismos anaeróbios, mas com uma carga moderada de *Lactobacillus spp.*(16) A DV está associada a risco aumentado de resultados adversos na saúde urogenital e reprodutiva, aumenta o risco de ISTs e doença inflamatória pélvica, podendo levar a corioamnionite e outcomes adversos na gravidez, como a RPM-PT e parto pré-termo. (9,15,16)

Na Vaginose Bacteriana (VB) o microbioma vaginal apresenta uma abundância relativamente baixa de *Lactobacillus spp.* e crescimento anaeróbico polimicrobiano, incluindo espécies como *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella spp.*, *Bacteroides spp.*, *Mobiluncus spp.* e *Mycoplasma spp.*(6,12)

Para caracterizar o microbioma vaginal, o estudo realizado por Ravel e colegas(13) descreve 5 tipos distintos de Community State Types (CST), ou tipos de estado da comunidade. Quatro destes CST são dominados por *Lactobacillus spp.*: CST I dominado por *Lactobacillus crispatus*, CST II dominado por *Lactobacillus gasseri*, CST III dominado por *Lactobacillus iners*, e o CST V dominado por *Lactobacillus jensenii*.(13)

As restantes comunidades formam um grande grupo heterogéneo, o CST IV, caracterizado por uma comunidade polimicrobiana pobre em *Lactobacillus spp.* e enriquecida por uma grande proporção de bactérias anaeróbias estritas como: *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Megasphaera*, *Peptoniphilus*, *Sneathia*, *Finegoldia*, *Prevotella*, *Dialister*, *Eggerthella*, *Aerococcus*, e *Mobiluncus spp.*(13) O CST IV é assim similar, em termos de composição, com a Vaginose Bacteriana, e é predominantemente observado em mulheres negras ou hispânicas em comparação com mulheres asiáticas e caucasianas.(9) Estudos adicionais indicam que as variações étnicas e geográficas na microbiota vaginal não são completamente explicadas por fatores socioeconómicos, dietéticos, sexuais ou por higiene pessoal e destacam o potencial componente genético para a aquisição do microbioma.(9)

O CST IV foi desde então dividido em dois subgrupos: IVA, consistindo principalmente de *Bifidobacterium*, *Dialister*, *Streptococcus* e *Bacteroides*, e IVB contendo mais *Gardnerella*, *Prevotella*, *Megasphaera*, bactérias associadas à vaginose bacteriana (BAVB) e *Mobiluncus*.(17)

Mais tarde, um novo estudo realizado por Albert e colegas(18) veio confirmar as descrições anteriores e expandir as descrições dos subgrupos de CST IV. O CST IVA é notavelmente heterogéneo em relação aos outros CST, com perfis dominados por organismos como *Gardnerella subgrupo B*, *Bifidobacterium breve*, *B. dentium*, *Atopobium vaginae*, *L. gasseri*, e *E. coli*.(18) Os CST IVC e IVD são claramente dominados por *Gardnerella subgrupo A* e *C* respetivamente.(18) Para as mulheres do CST IVC, a *Gardnerella subgrupo A* foi dominante na maioria dos perfis, com populações subdominantes de *Megasphaera sp.* e *Prevotella timonensis* em várias mulheres, enquanto que no CST IVD apenas cerca de metade dos microbiomas eram dominados por *Gardnerella subgrupo C*, enquanto a outra metade tinha níveis mais baixos deste organismo e misturas codominantes de *Megasphaera sp.*, *Prevotella timonensis*, *P. amnii* e *Atopobium vaginae*.(18)

Tabela 1 - Resumo da classificação CST com base em Ravel et al. (13), Gajer et al. (17) e Albert et al. (18)

CST	Espécies dominantes
CST I	<i>Lactobacillus crispatus</i>
CST II	<i>Lactobacillus gasseri</i>
CST III	<i>Lactobacillus iners</i>
CST IV	Não dominado por <i>Lactobacillus spp.</i>
CST IVA	<i>Gardnerella</i> subgrupo B, <i>Bifidobacterium</i> , <i>Dialister</i> , <i>Streptococcus</i> e <i>Bacteroides</i> ,
CST IVB	<i>Gardnerella</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Megasphaera</i> , BAVB e <i>Mobiluncus</i>
CST IVC	<i>Gardnerella</i> subgroup A
CST IVD	<i>Gardnerella</i> subgroup C
CST V	<i>Lactobacillus jensenii</i>

1.4.1 A evolução do microbioma vaginal ao longo do ciclo de vida

A vagina contém um ecossistema dinâmico que passa por uma flutuação natural na composição do seu microbioma vaginal ao longo da vida, que é influenciado pelo ciclo menstrual, níveis de progesterona e estrogénio, conteúdo de glicogénio no epitélio vaginal, pH vaginal e respostas imunes.(15)

Inicialmente, o microbioma vaginal é estabelecido quando o recém-nascido é exposto ao trato vaginal da sua mãe (canal de parto) ou às bactérias da pele no caso dos partos por cesariana. Assim, o microbioma vaginal da recém-nascida nascida por parto vaginal, vai-se assemelhar ao microbioma vagina da mãe.(15)

À medida que o recém-nascido cresce, o epitélio vaginal fica mais fino, devido ao menor conteúdo de glicogénio, e o pH vaginal neutraliza-se, devido ao reduzido número de lactobacilos. Estas alterações fisiológicas levam a que o MV estabelecido passe por uma mudança da sua composição, em que deixa de ser dominado por *Lactobacillus spp.* para uma dominância por anaeróbios estritos (como por exemplo *Bacteroides fragilis*) ou bactérias entéricas (como a *Escherichia coli*). (15)

Com a aproximação da menarca, o aumento dos níveis de estrogênio promovem a proliferação de células do epitélio vaginal e a deposição de glicogênio.(9) À medida que o epitélio vaginal aumenta de espessura produz ácido láctico, o que leva ao aumento do glicogênio e à diminuição do pH, favorecendo a colonização por bactérias acidófilas, como os *Lactobacillus spp.*.(9) Estes metabolizam o glicogênio, produzindo isômeros de lactato que diminuem o pH da mucosa vaginal.(9) Existem poucos organismos capazes de tolerar estas condições, e desta forma os *Lactobacillus spp.* emergem como o comensal dominante na maioria das mulheres e a sua dominância persiste ao longo dos anos reprodutivos.(9)

1.5 O microbioma, a saúde e a doença ginecológica

A interação entre o hospedeiro humano e a microbiota vaginal é altamente dinâmica, os microrganismos existem numa relação simbiótica finamente sintonizada com o hospedeiro e fornecem a primeira linha de defesa contra a colonização por patógenos oportunistas.(19)

Ao longo da vida de uma mulher, a fisiologia vaginal e a sua microbiota sofrem grandes mudanças associadas a períodos reprodutivos de transição, como puberdade, gravidez e menopausa, mas também sofrem flutuações diárias da composição microbiana, que resultam de atividades e comportamentos da vida diária.(19) Durante esses períodos, a microbiota vaginal pode afetar a fisiologia reprodutiva do hospedeiro, mas também a fisiologia do hospedeiro pode afetar a composição e a função da microbiota vaginal.(19)

Os microbiomas vaginais podem diferir com base em fatores culturais, comportamentais e genéticos.(16) Foram relatados perfis de microbiota vaginal associados a raça/etnia, nível de escolaridade, uso de contraceptivos hormonais, uso de produtos de higiene feminina, sexo dos parceiros sexuais, número de parceiros sexuais, uso de preservativo, comportamentos sexuais e tabagismo. Alguns fatores, como o nível de escolaridade, provavelmente representam uma variável composta de inúmeros fatores associados a diferenças na microbiota vaginal, incluindo raça/etnia, comportamento sexual e estatuto socioeconômico.(18) Mulheres caucasianas são predominantemente colonizadas por microbiomas dominados por *L. crispatus*, enquanto que mulheres africanas e hispânicas tendem a ser colonizadas por *L. iners* ou microbiomas polimicrobianos.(16)

Um benefício adicional dos *Lactobacillus spp.* é o fornecimento de bactericidas ou genes de bacteriocina para inibir o crescimento de espécies indesejáveis.(19)

A vagina contém várias células e recetores relacionados ao sistema imunitário que ajudam a detetar o ambiente microbiano.(19) A vigilância dos microrganismos dentro do trato genital feminino é geralmente alcançada pelo reconhecimento de padrões microbianos por recetores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os Toll-like receptors (TLRs) ou o recetor Dectin-1 ou recetores do tipo NOD-like receptors (NOD).(19) Estes recetores estão presentes quer nas células epiteliais escamosas que revestem a vagina quer nas células colunares que revestem o trato genital feminino superior.(19)

A estimulação microbiana dos PRRs inicia cascatas de sinalização de citocinas e/ou quimiocinas, levando á secreção de interleucinas (IL) como as IL-1 β , IL-6, IL-8, e do fator de necrose tumoral- α (TNF- α), com a finalidade de recrutar ou ativar células Natural Killer (NK), macrófagos, linfócitos T CD4+ e CD8+ e linfócitos B.(19) Variantes genéticas dos PRRs, como o gene antagonista IL-1R, TLR4, TLR9, IL-1R2 e TNF- α podem desempenhar um papel na forma como a mulher responde a um específico desafio microbiano ou a um outcome da gravidez.(19)

Fatores adicionais que contribuem para a defesa vaginal incluem mannose binding lectin (MBL), peptídeos antimicrobianos (AMPs) vaginais e imunoglobulinas A e G (IgA, IgG).(19) A interação da MBL com as superfícies celulares microbianas leva á lise celular, enquanto que as IgA e IgG ajudam a prevenir a adesão e captação de células epiteliais vaginais, contribuído também para a neutralização e eliminação de microrganismos infecciosos da vagina.(19)

Algumas espécies associadas à microbiota vaginal não-Lactobacillus dominante podem desencadear respostas imunes e degradar a mucosa do hospedeiro, processos que aumentam a suscetibilidade a infeções e contribuem para resultados reprodutivos negativos, como infertilidade e parto prematuro.(19) Por exemplo, uma meta-análise revelou que a microbiota vaginal semelhante à VB é significativamente mais prevalente em mulheres com infertilidade tubária quando comparada com mulheres com outras causas de infertilidade, mas não está associada a taxas de conceção diminuídas.(19,20) Acredita-se também que o trabalho de parto prematuro esteja em parte associado a mudanças na composição da microbiota vaginal, principalmente associado a bactérias encontradas em CST-IV, vaginite aeróbica (VA) ou VB.(19)

Apesar das descobertas acerca do papel crucial do microbioma vaginal na saúde ginecológica e produtiva da mulher, o papel do microbioma na RPM-PT ainda não está esclarecido, pelo que me motivei a investigar o que existe na literatura sobre este assunto.

2. Objetivos

O objetivo da presente monografia é o de conhecer a atual evidência científica sobre a influência do microbioma vaginal no risco de RPM-PT, especialmente quanto a:

1. Características do microbioma vaginal durante a gravidez
2. O microbioma vaginal e o risco subsequente de RPM-PT na atual gravidez
3. O microbioma vaginal no momento da RPM-PT
4. O efeito da antibioterapia no microbioma vaginal na RPM-PT

3. Materiais e métodos

A realização desta revisão da literatura sobre o papel do microbioma vaginal na RPM-PT foi conduzida com o uso da plataforma Pubmed entre agosto de 2021 e abril de 2022. As seguintes palavras-chaves (e respectivas associações) foram usadas: “microbioma”, “microbiota”, “premature rupture of membranes”, “vaginal microbiome”, “vaginal microbiota”, “vaginal disbiosis”, “preterm premature rupture of membranes”, “PPROM”, “preterm births”, “spontaneous preterm birth”, “bacterial vaginosis”, “fetal membranes”. Foram escolhidas fontes publicadas nos últimos 10 anos, tendo em conta a sua relevância e data de publicação, só se incluindo as publicações em inglês.

Sempre que nos artigos selecionados fosse feita referência a outros artigos considerados relevantes, esses foram também considerados.

4. Resultados e Discussão

4.1 O microbioma vaginal durante a gravidez

A gravidez está associada a uma variedade de eventos fisiológicos, incluindo aumento dos níveis de hormonas esteroides sexuais, modulação da resposta imune do hospedeiro, alteração das propriedades imunes, físicas e químicas do muco cervical, bem como alterações comportamentais, como redução do consumo de álcool e cessação tabágica. Esses fatores podem levar a mudanças na estrutura e/ou composição da comunidade microbiana resultando num microbioma diferente daquele das mulheres não grávidas.(6,21)

Estudos recentes que analisam o microbioma vaginal de grávidas sugerem que a gravidez tem um efeito marcante no microbioma vaginal, levando a maior estabilidade, aumento da abundância proporcional de *Lactobacillus spp.* e redução da riqueza e diversidade em relação ao microbioma vaginal de mulheres não grávidas.(6,22)

O microbioma muda ao longo da gestação. Estas mudanças são indicadas pelos níveis de estradiol: no 1º e 3º trimestre, a resposta imune do ambiente uterino é dominada por Th1 (estado pró-inflamatório), enquanto o 2º trimestre é Th2 dominante (estado anti-inflamatório).(12) Essas mudanças temporais dentro do ambiente vaginal são demonstradas em gestações normais de termo.(12) O aumento marcado do estrogénio circulante leva à redução da diversidade bacteriana vaginal e promoção da dominância do *Lactobacillus spp.*(9,12,23) A partir das 20 semanas, o aumento da disponibilidade de glicogénio leva a uma maior proliferação de *Lactobacillus*.(12) A razão por trás desta flutuação de subpopulações, descrita como estabilidade dinâmica, é demonstrada em gravidezes de termo e pode ser atribuída maioritariamente á ausência do ciclo hormonal.(12) Fatores imunológicos também foram sugeridos, e estudos demonstraram que altos níveis de β -defensina-2 parecem desempenhar um papel protetor contra PPT.(12) Esta flora menos diversa e mais consistente está relacionada com gravidez de termo não complicadas.(9,12)

Outra observação que suporta a importância da flora vaginal é que a diversidade do microbioma é restaurada mesmo antes do parto, uma mudança que potencialmente facilita o início do parto.(12) Depois do parto, a diminuição dos níveis de estrogénio e a

passagem dos lóquios levam a um ambiente vaginal com redução de *Lactobacillus spp.* e uma comunidade reduzida em lactobacillus que pode persistir até 1 ano pós-parto.(9)

O estudo de Freitas e colegas (6) caracterizou o microbioma vaginal de mulheres com gravidezes saudáveis e com baixo risco de complicações, e comparou-o com o microbioma de mulheres saudáveis não grávidas.(6) De acordo com este estudo, não era possível distinguir o estado de gravidez através dos perfis de microbioma. No entanto, os microbiomas vaginais de mulheres com gestações saudáveis apresentaram menor riqueza e diversidade de microrganismos potencialmente patogênicos, incluindo menor prevalência de *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, mas maior carga bacteriana quando comparados a mulheres não grávidas. A abundância de *Lactobacillus spp.* também foi maior nos microbiomas de mulheres grávidas, com CSTs dominados por *Lactobacillus* (CST I, II, III e V), quando comparados com mulheres não grávidas.(6)

Estas descobertas são consistentes com estudos anteriores na literatura. Aagard et al. (24) colheram 68 amostras de 24 grávidas saudáveis (entre as 18 e as 40 semanas de gestação) , em três locais diferentes da vagina, e compararam os microbiomas vaginais com 301 amostras de 60 mulheres não grávidas. O local da vagina não afetava a estrutura da comunidade microbiana, mas tanto a diversidade quanto a riqueza geral estavam reduzidas na gravidez, com dominância de espécies de *Lactobacillus* (*L. iners*, *L. crispatus*, *L. jensenii* e *L. johnsonii*).(24)

Walther-Antônio et al. (25) obtiveram amostras de 12 mulheres grávidas caucasianas em intervalos de 8 semanas ao longo das suas gestações saudáveis. Estas amostras foram dominadas por um único gênero, *Lactobacillus*, e exibiram baixa diversidade de espécies.(25) Para a maioria das pacientes, o microbioma vaginal foi dominado por *Lactobacillus crispatus* durante toda a gravidez, 2 pacientes apresentaram dominância de *Lactobacillus iners*, e 2 mostraram uma mudança entre o primeiro e o segundo trimestre de dominância de *L. crispatus* para *L. iners*.(25) Análises comparativas também demonstraram que o microbioma vaginal durante a gravidez é caracterizado por uma dominância marcada de espécies de *Lactobacillus* tanto em mulheres caucasianas como afro-americanas.(25) Além disso, a amostragem longitudinal revela que a baixa diversidade é acompanhada por uma alta estabilidade ao longo da gravidez, em contraste com as mulheres não grávidas, que apresentam flutuações com os ciclos menstruais.(25) Vários fatores podem contribuir para a estabilidade do microbioma vaginal durante a gravidez, incluindo a ausência de flutuações cíclicas hormonais, ausência de fluxo menstrual, alterações nas secreções cervicais ou vaginais associadas ao ciclo reprodutivo e alterações na atividade sexual durante a gravidez.(25) As

principais limitações deste estudo são o pequeno tamanho da amostra e a população homogênea.(25)

Romero e colegas (26) compararam a composição microbiana vaginal de 32 mulheres não grávidas com um grupo de 22 mulheres grávidas que deram à luz a termo. Este estudo demonstrou que a microbiota vaginal das grávidas tinha maior abundância de *Lactobacillus vaginalis*, *L. crispatus*, *L. gasseri* e *L. jensenii* e menor diversidade de outras bactérias, em comparação com as mulheres não grávidas. Os CST IV-B e CST IV-A, associados com vaginose bacteriana, eram também menos frequentes entre o grupo das grávidas.(26) Os autores reportaram também maior estabilidade do microbioma durante a gravidez, quando comparado com mulheres em idade reprodutiva não grávidas.(26)

Um achado novo no estudo de Freitas et al.(6) foi a menor prevalência de *Mollicutes* e *Ureaplasma* na gravidez detectada. Os *Mollicutes* têm sido associados a parto prematuro, rutura prematura de membranas e baixo peso ao nascimento. A menor prevalência de *Mollicutes* e *Ureaplasma* é consistente com a menor riqueza e diversidade geral de espécies nos microbiomas vaginais de mulheres grávidas em relação a mulheres não grávidas.(6) Foi também detetado que as mulheres grávidas tinham maior carga bacteriana do que as mulheres não grávidas. A produção de glicogênio induzida hormonalmente pode favorecer um ambiente nutricionalmente mais rico para o crescimento bacteriano na vagina durante a gravidez. Além disso, sabe-se que a gravidez altera a quantidade e a consistência do muco, que se torna mais abundante e espesso. Assim, é possível que as mostras das gestantes carregassem mais material quando comparados às não gestantes. Além das diferenças fisiológicas associadas à gravidez e consistência do muco, outros fatores técnicos, como condições de armazenamento ou diferenças inerentes nas populações do estudo, devem ser tidos em consideração.(6)

Esses resultados proporcionam uma melhor compreensão do microbioma vaginal na gravidez, que é um passo importante para poder explorar o potencial diagnóstico do microbioma para a previsão de resultados adversos da gravidez, bem como explorar procedimentos terapêuticos alternativos por meio de intervenção microbiológica. Estabelecer uma compreensão do microbioma normal em mulheres grávidas de baixo risco é fundamental para a compreensão do microbioma de mulheres com resultados obstétricos adversos, o que nos poderá ajudar a encontrar formas de intervenção no microbioma das grávidas e a melhorar o desfecho obstétrico.(6)

4.2 O microbioma vaginal e a RPM-PT

A VB, VA e colonização do trato reprodutivo inferior com agentes patogénicos, incluindo tricomoníase, gonorreia e clamídia, têm sido associados ao aborto do 2º trimestre, RPM-PT e PPT.(9) Foi formulada a hipótese de que a colonização vaginal por bactérias patogénicas ativa o sistema imune inato da vagina, cérvix, membranas fetais e decídua, desencadeando uma cascata inflamatória que leva a stress oxidativo, influxo de células imunes, aumento de prostaglandinas e metaloproteinases, diminuição de inibidores de proteínases e indução de apoptose, provocando remodeling cervical e disrupção da arquitetura membranar, resultando na RPM-PT.(9)

Depois da rotura, a cavidade uterina, placenta e feto são expostos ao microbiota vaginal patológico, aumentando o risco de complicações obstétricas, tais como corioamnionite, funisite e colonização do recém-nascido, que se associam a agravamento do prognóstico materno e fetal.(9)

4.2.1 Microbioma vaginal e o risco subsequente de RPM-PT

Brown e colegas em 2018 (4) analisaram os microbiomas vaginais de 250 grávidas, recrutadas prospectivamente, acompanhadas entre as 8–12, 19–25, 27–30 e 32–36 semanas de gestação. Adicionalmente, um segundo coorte de 87 mulheres foi recrutado aquando da apresentação, após a ocorrência de RPM-PT.(4) Das 250 grávidas do primeiro coorte, 38 tiveram PPT, e dessas, 15 sofreram RPM-PT. (4) A análise dos microbiomas vaginais das grávidas que não sofreram RPM-PT demonstrou baixa diversidade e dominância por *Lactobacillus spp.*, sendo *Lactobacillus crispatus* e *L. iners* os mais abundantes, (30%), seguidos por *L. jensenii* (20%) e *L. gasseri* (15%).(4) Em contraste, as mulheres do primeiro coorte, que subsequentemente sofreram RPM-PT, tinham microbiomas caracterizados por dominância baixa a intermédia de *Lactobacillus spp.* e elevada diversidade de microrganismos.(4) Diferenças significativas na proporção das comunidades dominantes de *Lactobacillus spp.* permaneceram quando as análises foram ajustadas para possíveis fatores confundentes, incluindo idade materna, etnia, índice de massa corporal, tabagismo e intervenções de tratamento (cerclagem cervical ou terapia com progesterona). A disbiose vaginal, caracterizada por depleção de *Lactobacillus spp.*, estava presente em

um terço dos casos de RPM-PT, e persistia após a rotura de membranas.(4) O estudo concluiu que a composição microbiana vaginal é um fator de risco para RPM-PT subsequente e está associada a desfechos maternos e neonatais adversos a curto prazo.(4) Isto destaca a importância da microbiota vaginal como um fator de risco pré-natal potencialmente modificável para RPM-PT.(4) Apesar do tamanho reduzido do estudo, representa uma avaliação única da microbiota vaginal antes da rutura das membranas fetais.(4)

Para examinar a evolução da microbiota vaginal durante a gravidez e antes da RPM-PT em mais detalhe, os Brown et al. em 2019(27) realizaram um estudo com 1.500 mulheres, com e sem fatores de risco pré-existentes para PPT, amostradas prospectivamente a partir do primeiro trimestre de gravidez, para identificar 60 mulheres que posteriormente sofreram RPM-PT.(9,27) A composição da microbiota vaginal destas mulheres foi examinada várias vezes entre as 6 e as 36 semanas de gestação, e comparada com amostras de grávidas que tiveram parto a termo, agrupadas por idade materna, idade gestacional no momento da colheita, IMC e etnia.(27) Foram observadas abundância reduzida de *Lactobacillus spp.* e alta diversidade microbiana antes da RPM-PT em 20% e 26% das mulheres com baixo e alto risco de parto prematuro, respetivamente, mas em apenas 3% das mulheres que deram à luz a termo.(27) 97% das mulheres que deram à luz a termo tinham um microbioma vaginal com >75% de abundância de *Lactobacillus spp.*, e 83% tinham uma abundância de *Lactobacillus spp.* de acima de 98%.(27) Em contraste, as amostras obtidas antes da RPM-PT eram comparativamente reduzidas em *Lactobacillus spp.* e mais ricas e diversas.(27) Foram identificadas como sendo discriminatórias para pré-RPM-PT as bactérias dos gêneros *Prevotella*, *Peptoniphilus*, *Dialister*, *Streptococcus*, *Catonella*, *Parvimonas* e *Anaerococcus*, enquanto que *Lactobacillus spp.* foram positivamente associados ao parto a termo.(27) A RPM-PT foi associada à instabilidade da estrutura da comunidade bacteriana durante a gravidez e uma mudança para uma maior diversidade ocorrendo predominantemente durante o segundo trimestre.(27) Isso foi caracterizado pelo aumento da abundância relativa de espécies potencialmente patogênicas, incluindo *Prevotella*, *Peptoniphilus*, *Streptococcus* e *Dialister*.(27) As análises longitudinais mostraram que o parto a termo sem complicações foi associado à microbiota estável, dominada por *L. crispatus* e com riqueza reduzida, entre 12-17+6 e 24-29+6 semanas.(27) 81% das grávidas que tiveram parto a termo tinham um microbioma vaginal dominado por um único *Lactobacillus spp.*, e permaneceu estável durante toda a gravidez, sem registos de eventos de transição detetados.(27) Em contraste, a RPM-PT foi associada a um aumento significativo na riqueza entre 6-11+6

e 24'29+6 semanas.(27) Apenas 56% mantiveram um microbioma vaginal dominado por uma única espécie de *Lactobacillus*, 15% transitaram entre diferentes *Lactobacillus spp.* mantendo uma dominância global de *Lactobacillus spp.*, 22% transitaram entre uma comunidade dominada por *Lactobacillus spp.* para uma comunidade empobrecida destes, dominada por *Streptococcus*, *Prevotella*, *Atopobium* e *Megasphaera*.(27) No geral, 37% das mulheres demonstraram alguma forma de transição de uma comunidade dominante para outra antes da rotura da membrana, dentro do grupo de RPM-PT houve um número maior de indivíduos com um microbioma persistentemente desprovido de *Lactobacillus spp.*.(27) O cálculo do risco relativo de RPM-PT subsequente foi realizado com base no *Lactobacillus spp.* predominante, abundância geral de *Lactobacillus spp.* (dominante, intermediário, reduzida) e a presença de um microbioma vaginal dominado por outros gêneros bacterianos além dos lactobacilos.(27) Um microbioma vaginal reduzida em *Lactobacillus spp* foi associado ao aumento do risco relativo: 2,56 e 2,34 para 24-29+6 e 30-35+6 semanas, respetivamente.(27) As comunidades bacterianas vaginais dominadas por *Lactobacillus spp.* para além das 24 semanas foram associados com um risco relativo de RPM-PT de 0,39 às 24-29+6 semanas de gestação e 0,43 às 30-35+6 semanas.(27) Comunidades bacterianas vaginais dominadas por qualquer outra espécie que não *Lactobacillus spp.* foi associada com RPM-PT subsequente em todas as janelas de tempo gestacional, com risco relativo de 1,63, 1,28, 1,39, 2,88 e 1,8 para as 6-11+6, 12-17+6, 18-23+6, 24-29+6 e 30-36+6 semanas de gestação, respetivamente.(27) Este estudo também sugeriu um efeito da etnia na microbiota vaginal, embora os números fossem insuficientes para conclusões definitivas.(9) Cada um dos *Lactobacillus spp.* predominantes. (*L. crispatus*, *L. iners*, *L. jensenii* e *L. gasseri*) foram identificados em mulheres de etnia asiática e caucasiana, mas o *L. gasseri* não estava presente em mulheres de etnia negra.(27) Nas mulheres asiáticas ou caucasianas que tiveram parto a termo não se observou microbioma reduzido em *Lactobacillus spp.*, mas estava presente em 1/8 das mulheres negras.(27) As medidas de riqueza e diversidade foram comparáveis entre os grupos étnicos em gestações a termo, mas nas mulheres com RPM-PT subsequente houve um aumento no número de mulheres com microbioma empobrecido em *Lactobacillus spp.* em todas as etnias, mas com as comunidades mais empobrecidas em *Lactobacillus spp.* em mulheres negras.(27) Este estudo identifica a redução de abundância de *Lactobacillus spp.* e o aumento da diversidade bacteriana vaginal como fatores de risco precoce para RPM-PT e destaca a necessidade de estudos de intervenção destinados a avaliar o impacto da modificação da composição bacteriana vaginal para a prevenção do parto prematuro.

Genevese et al. (2) realizaram um estudo observacional em que analisaram o microbioma de 600 grávidas às 28 e 32 semanas de gestação. Nas mulheres em que era identificada infecção vaginal às 28 semanas, foi administrado um tratamento tópico composto por metronidazol e clotrimazol.(2) Às 28 semanas de gestação, das 600 mulheres, 325 (54,2%) tinham doença vaginal: 32,6% destas tinham vaginite bacteriana, 33,8% candidíase, e 32,4% tinham infecção mista.(2) Nas 325 mulheres observadas, o patogénico mais frequente foi *Candida albicans*, isoladamente (27,7%) ou em combinação com outros microrganismos, perfazendo 54,4% dos patogénicos isolados.(2) Os seguintes microrganismos mais encontrados foram, por ordem: *Enterococcus sp*, *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*, *Peptococcus sp* e *Candida non albicans*, que estiveram presentes respetivamente em 28,6%, 25,5%, 22,8%, 21,8% e 11,7% dos casos, principalmente em associação com outras espécies de microrganismos.(2) No grupo de mulheres sem infecção vaginal na 28^a semana de gravidez, foram registados 2 casos (0,7%) de infeções na 32^a semana de gravidez, e microbiota vaginal anormal em 128 mulheres de 275 (45,8%).(2) O número total de RPM-PT observadas no final do estudo foi de 8 em 600 (1,3%).(2) Foram registados 3 eventos (0,9%) no grupo de mulheres com infecção vaginal e/ou microbiota vaginal anormal na 28^a semana de gestação, que foram tratadas com associação tópica de metronidazol + clotrimazol.(2) No grupo de mulheres sem infecção vaginal na semana 28 e que, portanto, não necessitaram de tratamento, ocorreram 5 eventos (1,8%), não havendo diferença significativa na prevalência de eventos de RPM-PT entre os dois grupos.(2) Já no grupo de mulheres com infecção vaginal e/ou microbiota vaginal anormal na 32^a semana de gravidez, o número de eventos de RPM-PT foi significativamente maior do que em mulheres que naquela semana não apresentavam infecção vaginal e/ou microbiota vaginal anormal.(2) Foram observados 8 eventos de RPM-PT (3,7%) no primeiro grupo versus nenhum evento no segundo grupo.(2) A análise dessas 8 mulheres revelou que 5 delas sofriam de vaginite, e que os patogénicos isolados eram respetivamente *E. coli* + *Enterococcus sp*. em 2 casos, *E. coli* + *Peptococcus sp*. em 1 caso, *E. coli* + *Enterobacter sp*. em 1 caso, *G. vaginalis* + *Peptococcus sp*. no último caso.(2) Este estudo observacional mostrou a alta prevalência de infeções vaginais no terceiro trimestre de gestação e a sua associação com RPM-PT. Estima-se que a vaginite bacteriana esteja presente em 15-42% das grávidas, podendo levar a um aumento de duas a quatro vezes no risco de PPT e RPM-PT. (2)

4.2.2 Microbioma vaginal no momento da RPM-PT

Um estudo checo de Kacerovsky e colegas (28) analisou a microbiota vaginal de 61 mulheres num único momento, logo após a RPM-PT, antes da administração de antibióticos.(28) O objetivo deste estudo era analisar a microbiota de mulheres que sofreram RPM-PT e documentar associações entre a microbiota cervical, a resposta inflamatória cervical, invasão microbiana da cavidade amniótica (IMCA), corioamnionite e infecção intra amniótica (IIA).(28) A análise de agrupamento hierárquico neste estudo foi caracterizada por quatro CSTs: CST I (dominado por *Lactobacillus crispatus*) foi encontrado em 41 % das mulheres, CST III (dominado por *Lactobacillus iners*) em 21%, CST IV-A em 18% e CST IV-B em 20% das mulheres.(28) Para analisar as diferenças na resposta inflamatória cervical em relação à microbiota cervical, as concentrações de IL-6 no fluido cervical foram avaliadas. Grávidas com CSTs não dominados por *Lactobacillus* (IV-A e IV-B) apresentaram concentrações mais altas de IL-6 no líquido cervical do que mulheres com CSTs dominados por *Lactobacillus* (I e III).(28) Neste estudo, 70% das gestações com RPM-PT foram complicadas por corioamnionite histológica, que foi subdividida em 2 subgrupos: infecciosas e não infecciosas, com base na presença ou ausência de ICMA.(9,28) A combinação de ICMA e corioamnionite histológica representa um subgrupo de RPM-PT com a resposta inflamatória fetal mais acentuada.(9,28) Mulheres com CSTs não dominadas por *Lactobacillus* (CST IV-A e IV-B) tiveram concentrações de IL-6 no fluido cervical aproximadamente 2 a 2,5 vezes mais altas do que CSTs dominadas por *Lactobacillus* (CST I e III).(28) Isso significa que as CSTs não dominadas por *Lactobacillus* estão associadas a uma maior resposta inflamatória cervical, o que está de acordo com achados anteriores de que as bactérias associadas à vaginose bacteriana são capazes de acentuar a resposta às citocinas por parte das células epiteliais do trato genital inferior em relação às cepas comensais de *Lactobacilos*.(28) Neste estudo, mulheres com flora cervical dominada por *L. crispatus* (CST I) tiveram a menor incidência de ICMA, de ICMA com corioamnionite histológica e nenhuma das mulheres teve evidência de IIA.(28) O risco de IIA e inflamação parece ser muito baixo quando *L. crispatus* é a bactéria vaginal mais abundante.(28)

O estudo de Jayaprakash e colegas(29) recrutou 36 mulheres após sofrerem RPM-PT, com o objetivo de caracterizar os seus microbiomas vaginais no momento da rutura e durante o período de latência entre a RPM-PT e o parto, para determinar se o perfil microbiano vaginal prediz a duração da latência e/ou resultados perinatais.(9,29) As mulheres com RPM-PT tinham microbiomas vaginais mistos e altamente variáveis,

mas o tipo específico de perfil de microbioma na RPM-PT não se correlacionou com a duração da latência.(29) Do total de 70 amostras, apenas 13 eram dominadas por *Lactobacillus*, 81% das amostras continham *Mycoplasma* e/ou *Ureaplasma*, e todas as amostras continham *Megasphaera tipo 1* e *Prevotella spp.*(29) As mulheres com *Mycoplasma* e/ou *Ureaplasma* tiveram idades gestacionais significativamente menores no parto e recém-nascidos com menor peso, quando comparadas com mulheres *Mycoplasma* e/ou *Ureaplasma* negativas.(29) O estudo também demonstrou que a composição da microbiota vaginal mudou drasticamente durante o período de latência: em 4/5 dos casos em que o microbioma era dominado por *Lactobacillus* no momento da RPM-PT, a sua abundância proporcional diminuiu durante os momentos de latência subsequentes, e apesar da antibioterapia administrada, não houve restauração desse microbioma dominado por *Lactobacillus*.(29) Outro achado relevante foi que, de entre as mulheres com microbioma vaginal dominado por *Lactobacillus*, o mais comum foi o *L. iners*, por si só ou em combinação com *L. jensenii*. O *L. iners* está associado tanto à microbiota normal quanto à VB, e é relatado como um organismo dominante quando a microbiota vaginal está em um estado de transição, de normal para VB ou vice-versa.(29)

No estudo mencionado anteriormente de Brown e colegas em 2018 (4), do segundo corte de 87 mulheres que foi recrutado aquando da apresentação, após a ocorrência de RPM-PT, 39 foram amostradas antes de qualquer antibioterapia ter sido iniciada. Destas, quase metade tinha uma microbiota vaginal caracterizada por dominância intermédia a baixa de *Lactobacillus spp.* e alta diversidade. Essas proporções eram essencialmente idênticas às proporções observadas nas mulheres do primeiro corte que sofreram RPM-PT. No entanto, em casos individuais em que as amostras foram obtidas antes e depois da RPM-PT, cerca de metade daquelas com dominância de *Lactobacillus spp.* antes da rotura tornaram-se disbióticas após a mesma. Esses dados sugerem que, em alguns casos, o próprio evento da RPM-PT pode afetar significativamente a estrutura do microbioma, o que pode ser devido à alcalinidade e presença de peptídeos antimicrobianos no líquido amniótico. No entanto, a RPM-PT também foi associada a uma redução na carga bacteriana geral, o que pode representar a lavagem das bactérias em resposta ao evento de rotura.(4)

4.3 Efeitos da antibioterapia no microbioma vaginal no momento da RPM-PT

A gestão clínica da RPM-PT envolve um equilíbrio cuidadoso entre o prolongamento da gravidez, para permitir a maturação fetal, e o risco de infeção e resultados maternos e neonatais adversos.(9)

Um estudo de Ramsey et al. (30) questionou um total de 508 especialistas de medicina materno-fetal de 13 países, como objetivo de caracterizar variações no tratamento de mulheres com RPM-PT, no contexto das recomendações atuais para a prática clínica e prática baseada na evidência. 90% dos entrevistados usaram antibióticos para prolongamento da latência e para profilaxia para *Streptococcus do grupo B*.(30) É interessante notar, no entanto, que apenas 54% dos clínicos relataram o uso de antibióticos no cenário do RPM-PT para reduzir a morbidade neonatal.(30) Os antibióticos mais utilizados foram ampicilina/amoxicilina (88%), penicilina (70%) e eritromicina (64%).(30) A duração do uso do antibiótico variou de 24 a 48 horas (5%), a 7 dias (77%), 14 dias (6%) e 21 dias ou mais (<1%).(30) As indicações citadas combinam claramente os benefícios conhecidos do antibiótico para profilaxia de *Streptococcus do grupo B* e prolongamento da latência em mulheres com RPM-PT.(30) As descobertas divergentes dos grandes estudos randomizados podem explicar a disparidade entre as escolhas de antibioterapia demonstradas neste estudo.(30)

A eritromicina é recomendada atualmente para terapia profilática no contexto de RPM-PT pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e vários órgãos profissionais de todo o mundo.(4)

O uso generalizado de eritromicina para RPM-PT baseia-se nos benefícios na evolução neonatal a curto prazo relatados no teste ORACLE I.(31) Este estudo contou com a presença de 4826 que receberam aleatoriamente um regime antibiótico diferente: 250 mg de eritromicina, 250 mg de amoxicilina em combinação com 125 mg de ácido clavulânico, ambos, ou placebo; 4 vezes por dia durante 10 dias ou até ao momento do parto.(31) Este estudo relatou uma associação entre o uso de eritromicina com o prolongamento da gravidez por 48 horas, reduções no tratamento neonatal com surfactante, diminuição da dependência de oxigênio suplementar e redução de 2,2% na morbidade neonatal composta, uma combinação de morte neonatal, doença pulmonar crônica ou anormalidade cerebral importante.(31) A combinação de amoxicilina e ácido

clavulânico, com ou sem eritromicina, foi associado ao aumento do risco de enterocolite necrotizante.(31)

Num estudo de Baldwin e colegas(32) 12 grávidas foram amostradas antes e depois de antibioterapia (azitromicina, ampicilina e amoxicilina). Aquando da apresentação inicial da RPM-PT, antes do tratamento ser iniciado, as espécies de *Lactobacillus* encontravam-se marcadamente reduzidas, enquanto as bactérias mais abundantes à apresentação foram *Prevotella spp.* e *Peptoniphilus spp.*(32) Os investigadores relataram que o tratamento antibiótico administrado não eliminou a presença de espécies patogénicas como *Prevotella* e *Peptoniphilus*, que permaneceram até o momento do parto, e que o mesmo também não afetou significativamente a abundância relativa de *Lactobacillus*.(32)

O défice de *Lactobacillus spp.* e a permanência das espécies patogénicas conhecidas, como *Prevotella spp.* e *Peptoniphilus spp.* durante e após o tratamento antibiótico, destacam a disbiose persistente presente na RPM-PT e a necessidade de mais investigações sobre abordagens da mesma.(32)

Em contraste, no estudo de Brown (4) mencionado anteriormente, em que também analisaram o impacto do tratamento profilático com eritromicina oral na carga bacteriana do microbioma vaginal, relata que após 48 horas do tratamento houve uma mudança geral em direção à disbiose, caracterizada por uma redução na proporção de microbiota vaginal dominada por *Lactobacillus spp.* e um aumento em comunidades de tipo intermediário, que persistiu até 1 semana de tratamento. O tratamento para além de 1 semana foi associado com uma redução das comunidades intermediárias e um aumento modesto na dominância de *Lactobacillus spp.*(4) No entanto, a proporção de microbiota vaginal disbiótica permaneceu constante.(4) Uma sub-análise das mulheres com dominância de *Lactobacillus spp.* antes da exposição ao antibiótico mostrou que o tratamento com eritromicina se associou a uma mudança para a estrutura da comunidade intermediária ou disbiótica em 80% dos casos, uma diminuição significativa na abundância relativa de *Lactobacillus spp.* e ao aumento da diversidade.(4) Em contraste, em amostras colhidas de mulheres que já tinham depleção de *Lactobacillus spp.* no momento da RPM-PT, o tratamento com eritromicina foi associado a uma redução tanto na riqueza quanto na diversidade, apesar da carga bacteriana permanecer inalterada.(4) Estes resultados parecem indicar que existem 2 grupos de grávidas com RPM-PT, as que apresentam disbiose e redução da abundância de *Lactobacillus* e as que tinham dominância de *Lactobacillus* no momento da rotura, e que para o primeiro grupo o tratamento com eritromicina é

benéfico, enquanto que para o segundo pode ser prejudicial. Os resultados benéficos associados ao tratamento com eritromicina na RMP-PT são frequentemente atribuídos à sua suposta inibição da infecção vaginal ascendente, mas isso parece improvável, considerando que a concentração de eritromicina no lúmen vaginal após a dosagem oral é baixa, atingindo uma concentração inibitória média efetiva contra espécies de *Lactobacillus*, mas não contra a maioria das outras espécies conhecidas por colonizar a vagina.(4) Isso fornece uma possível explicação para a redução de *Lactobacillus spp.* e aumento da diversidade e riqueza de comunidades bacterianas observadas neste estudo, após o tratamento com eritromicina.(4) Além disso, as melhorias relatadas nos resultados neonatais e maternos após o tratamento com eritromicina para a RPM-PT podem ser atribuídas à atividade antibacteriana noutros locais do tecido gestacional, como, por exemplo, a placenta, ou por outros mecanismos de ação.(4) No entanto, o parto vaginal atua como um inóculo de alta dose para o recém-nascido que molda a composição do microbioma intestinal e vaginal infantil precoce, que está relacionado com a saúde do indivíduo a curto e longo prazo.(4) Portanto, o aumento das comunidades bacterianas vaginais em direção à disbiose imediatamente antes do parto é indesejável e pode contribuir para resultados neonatais negativos.(4)

No estudo de Genovese et al. (2) referido anteriormente, foi administrado um tratamento tópico composto por metronidazol e clotrimazol às grávidas com infecção vaginal identificada às 28 semanas de gestação. O tratamento tópico levou à erradicação da infecção e à restauração do microbioma em 72% das grávidas, o que reduziu o risco de RPM-PT para valores similares ao das grávidas sem infecção no mesmo período gestacional.(2) A frequência de RPM-PT no grupo de mulheres que tiveram infecção vaginal na semana 28 e que foram tratadas com associação tópica de metronidazol + clotrimazol não foi superior à observada no grupo de mulheres sem infecção vaginal nessa mesma semana (0,9% versus 1,8%).(2) O metronidazol e o clotrimazol são recomendados para o tratamento de infecções vaginais bacterianas e fúngicas na gravidez devido ao seu perfil de eficácia, segurança e tolerabilidade, para além de que ambos os fármacos não têm atividade contra a microbiota lactobacilar.(2) Esta última característica é bastante importante, devido ao papel protetor dos lactobacilos no microbioma vaginal na gravidez.

5. Conclusão e perspectivas futuras

A RPM-PT é um problema significativo na prática obstétrica. Apesar da presença de infecções vaginais ser um fator de risco conhecido para RPM-PT, a sua prevenção e tratamento preventivo ainda é controversa. Surge assim a hipótese de que, compreendendo o papel do microbioma vaginal na RPM-PT, talvez seja possível melhorar as estratégias de prevenção, gestão e tratamento, de forma a melhorar os resultados obstétricos e neonatais.

Através dos estudos analisados nesta dissertação, é possível concluir que as diferenças entre os microbiomas vaginais de mulheres com gravidezes saudáveis de termo e mulheres que sofrem RPM-PT prendem-se principalmente pela diminuição da dominância de espécies de *Lactobacillus spp.*, e pelo aumento da diversidade e variedade de outras espécies, afetando a resposta imune materna. Isto destaca a importância do microbioma vaginal como fator de risco pré-natal modificável para a RPM-PT, e evidencia a necessidade de estudos adicionais para avaliar mais profundamente a interação entre a microbiota vaginal e prevenção de complicações obstétricas.

No entanto, na literatura atual existem ainda poucos estudos, e os estudos existentes foram realizados com recurso a metodologias muito heterogênicas, o que impossibilita a formulação de conclusões definitivas acerca do papel dos *Lactobacillus spp.* na prevenção da RPM-PT, pelo que não existem evidências científicas suficientes para permitir a aplicação destes conhecimentos na prática clínica.

Seria então pertinente a realização de estudos multicêntricos, mais uniformizados e robustos, com maior número e diversidade de participantes, que permitam retirar conclusões mais fortes sobre o papel do microbioma vaginal como fator de risco para RPM-PT.

5. Referências Bibliográficas

1. Menon R, Richardson LS. Preterm prelabor rupture of the membranes: A disease of the fetal membranes. *Semin Perinatol*. 2017 Nov 1;41(7):409–19.
2. Genovese C, Corsello S, Nicolosi D, Aidala V, Falcidia E, Tempera G. Alterations of the vaginal microbiota in the third trimester of pregnancy and pPROM. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016;20:3336–43.
3. Ehsanipoor R. Practice Bulletin No. 172: Premature Rupture of Membranes [Internet]. Vol. 128, *Obstetrics and Gynecology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2016 [cited 2022 Mar 10]. p. e165–77. Available from: https://journals.lww.com/greenjournal/Fulltext/2016/10000/Practice_Bulletin_No__172__Premature_Rupture_of.62.aspx
4. Brown RG, Marchesi JR, Lee YS, Smith A, Lehne B, Kindinger LM, et al. Vaginal dysbiosis increases risk of preterm fetal membrane rupture, neonatal sepsis and is exacerbated by erythromycin. *BMC Med* [Internet]. 2018;16(1). Available from: www.arb-silva.de/
5. Lorthe E. Epidemiology, risk factors and child prognosis: CNGOF Preterm Premature Rupture of Membranes Guidelines. *Gynecol Obstet Fertil Senol* [Internet]. 2018;46(12):1004–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.gofs.2018.10.019>
6. Freitas AC, Chaban B, Bocking A, Rocco M, Yang S, Hill JE, et al. The vaginal microbiome of pregnant women is less rich and diverse, with lower prevalence of Mollicutes, compared to non-pregnant women. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1). Available from: www.nature.com/scientificreports
7. Ursell LK, Metcalf JL, Parfrey LW, Knight R. Defining the human microbiome. *Nutr Rev* [Internet]. 2012 [cited 2022 Mar 14];70(SUPPL. 1). Available from: https://academic.oup.com/nutritionreviews/article/70/suppl_1/S38/1921538
8. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The Human Microbiome Project [Internet]. Vol. 449, *Nature*. 2007. p. 804–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>
9. Bennett PR, Brown RG, MacIntyre DA. Vaginal Microbiome in Preterm Rupture of Membranes [Internet]. Vol. 47, *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America*. 2020 [cited 2021 Aug 2]. p. 503–21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ogc.2020.08.001>

10. Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease [Internet]. Vol. 30, Cell Research. Cell Res; 2020 [cited 2022 Mar 17]. p. 492–506. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32433595/>
11. Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MCC, Charles T, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges [Internet]. Vol. 8, Microbiome. 2020. p. 103. Available from: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.TheCreativeCommonsPublicDomainDedicationwaiver>
12. Tsonis O, Gkrozou F, Harrison E, Stefanidis K, Vrachnis N, Paschopoulos M. Female genital tract microbiota affecting the risk of preterm birth: What do we know so far? A review. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2021 Sep 16];245:168–73. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2019.12.005>
13. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SSK, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2011;108(SUPPL. 1):4680–7. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1002611107
14. Gomaa EZ. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review [Internet]. Vol. 113, Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology. Antonie Van Leeuwenhoek; 2020 [cited 2022 Apr 13]. p. 2019–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33136284/>
15. Redelinghuys MJ, Geldenhuys J, Jung H, Kock MM. Bacterial Vaginosis: Current Diagnostic Avenues and Future Opportunities [Internet]. Vol. 10, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. Front Cell Infect Microbiol; 2020 [cited 2022 Jan 9]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32850469/>
16. Tachedjian G, Aldunate M, Bradshaw CS, Cone RA. The role of lactic acid production by probiotic Lactobacillus species in vaginal health. Res Microbiol [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2022 Apr 11];168(9–10):782–92. Available from: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
17. Gajer P, Brotman RM, Bai G, Sakamoto J, Schütte UME, Zhong X, et al. Temporal dynamics of the human vaginal microbiota. Sci Transl Med [Internet]. 2012 May 2 [cited 2022 Feb 21];4(132):132ra52. Available from: [/pmc/articles/PMC3722878/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/222878/)
18. Albert AYK, Chaban B, Wagner EC, Schellenberg JJ, Links MG, Van Schalkwyk

- J, et al. A study of the vaginal microbiome in healthy Canadian women utilizing cpn60-based molecular profiling reveals distinct *Gardnerella* subgroup community state types. *PLoS One*. 2015;10(8).
19. Smith SB, Ravel J. The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. *J Physiol* [Internet]. 2017 Jan 15 [cited 2022 Mar 15];595(2):451–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27373840/>
 20. van Oostrum N, De Sutter P, Meys J, Verstraelen H. Risks associated with bacterial vaginosis in infertility patients: a systematic review and meta-analysis. [Internet]. Vol. 28, Human reproduction (Oxford, England). *Hum Reprod*; 2013 [cited 2022 Apr 13]. p. 1809–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23543384/>
 21. Gupta P, Singh MP, Goyal K. Diversity of Vaginal Microbiome in Pregnancy: Deciphering the Obscurity. Vol. 8, *Frontiers in Public Health*. Frontiers Media S.A.; 2020. p. 326.
 22. Solt I. The human microbiome and the great obstetrical syndromes: A new frontier in maternal-fetal medicine. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* [Internet]. 2015 Feb 1 [cited 2022 Jan 15];29(2):165–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25242582/>
 23. Farage MA, Miller KW, Sobel JD. Dynamics of the Vaginal Ecosystem—Hormonal Influences. *Infect Dis Res Treat* [Internet]. 2010;3:IDRT.S3903. Available from: <http://www.la-press.com>.
 24. Aagaard K, Riehle K, Ma J, Segata N, Mistretta TA, Coarfa C, et al. A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. *PLoS One* [Internet]. 2012;7(6):36466. Available from: www.plosone.org
 25. Walther-Antônio MRS, Jeraldo P, Berg Miller ME, Yeoman CJ, Nelson KE, Wilson BA, et al. Pregnancy's stronghold on the vaginal microbiome. *PLoS One* [Internet]. 2014 [cited 2022 Apr 24];9(6):98514. Available from: www.plosone.org
 26. Romero R, Hassan SS, Gajer P, Tarca AL, Fadrosch DW, Nikita L, et al. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome*. 2014 Feb 3;2(1).
 27. Brown RG, Al-Memar M, Marchesi JR, Lee YS, Smith A, Chan D, et al. Establishment of vaginal microbiota composition in early pregnancy and its association with subsequent preterm prelabor rupture of the fetal membranes.

Transl Res [Internet]. 2019;207:30–43. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.12.005>

28. Kacerovsky M, Vrbacky F, Kutova R, Pliskova L, Andrys C, Musilova I, et al. Cervical microbiota in women with preterm prelabor rupture of membranes. *PLoS One*. 2015;10(5):126884.
29. Jayaprakash TP, Wagner EC, Van Schalkwyk J, Albert AYK, Hill JE, Money DM, et al. High Diversity and Variability in the Vaginal Microbiome in Women following Preterm Premature Rupture of Membranes (PPROM): A Prospective Cohort Study. *PLoS One* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2022 Jan 9];11(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27861554/>
30. Ramsey PS, Nuthalapaty FS, Lu G, Ramin S, Nuthalapaty ES, Ramin KD. Contemporary management of preterm premature rupture of membranes (PPROM): A survey of maternal-fetal medicine providers. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191(4):1497–502.
31. Kenyon SL, Taylor DJ, Tarnow-Mordi W. Broad-spectrum antibiotics for preterm, prelabour rupture of fetal membranes: The ORACLE I randomised trial. *Lancet*. 2001 Mar 31;357(9261):979–88.
32. Baldwin EA, Walther-Antonio M, MacLean AM, Gohl DM, Beckman KB, Chen J, et al. Persistent microbial dysbiosis in preterm premature rupture of membranes from onset until delivery. *PeerJ*. 2015;2015(11).