



CATARINA ISABEL Estudo do microbioma no sémen em casos e
LOUREIRO MONTEIRO controlos de infertilidade



CATARINA ISABEL LOUREIRO MONTEIRO **Estudo do microbioma no sémem em casos e controlos de infertilidade**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, especialização em Clínica, realizada sob a orientação científica da Doutora Susana Seixas, Investigadora do Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (I3S)/ Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP) e do Doutor Bruno Neves, Professor do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, e coorientação da Doutora Sílvia Gomes, Investigadora do Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (I3S)/ Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP)

Financiado pelo Fundo Social Europeu (COMPETE-FEDER) e fundos nacionais do Ministério da Educação e Ciência (POPH-QREN) (Projeto PTDC/BEX-GMG/0242/2012)



Ao meu avô.

o júri
presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
Professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Susana Seixas
Investigadora do Grupo de Diversidade Genética do Instituto de Investigação e Inovação em Saúde (I3S)/ Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP).

Doutora Maria do Céu Fontes Herdeiro Figueiredo
Professora Auxiliar do Departamento de Patologia e Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

agradecimentos

Quero agradecer, em primeiro lugar, ao Professor Sobrinho Simões, representante de toda a instituição IPATIMUP, por ter aceite a minha entrada como aluna de mestrado.

À Doutora Luísa Pereira, que demonstrou sempre a sua disponibilidade, e a todo o grupo de Diversidade Genética do IPATIMUP, o meu grupo por mais de um ano.

Quero agradecer sobretudo e em especial, à minha orientadora, Doutora Susana Seixas, em primeiro lugar por me ter aceite no seu grupo e ter permitido que esta tese se tornasse possível. Muito obrigada por toda a preocupação, ajuda e orientação, toda a dedicação demonstrada e os conhecimentos que me passou.

Agradeço à minha coorientadora, Doutora Sílvia Gomes, pelos sempre bons e úteis conselhos e sugestões, pela ajuda no laboratório e, também, pela relação de amizade.

Agradeço igualmente ao meu Professor e orientador institucional, Doutor Bruno Neves, pela ajuda sempre que necessitei.

À Doutora Maria José Borrego, Coordenadora do Laboratório Nacional de Referência das Infecções Sexualmente Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, aos Profs. Alberto Barros e Filipa Carvalho e restantes colaboradores do Centro de Genética da Reprodução Prof. Alberto Barros, ao Prof. Vasco Almeida e à Dr^a. Isabel Damião do Centro de Procriação Medicamente Assistida, agradeço as diferentes amostras disponibilizadas para a realização deste trabalho.

A todos os meus professores e colegas do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, pelos conhecimentos e orientação no primeiro ano do Mestrado em Bioquímica.

Ao Bruno Cavadas, pela ajuda no tratamento de dados de NGS, muito obrigada. À Joana Pereira, Andreia Brandão, Sofia Marques, Andreia Sousa, Marisa Oliveira e Natália Costa pelos conselhos, preocupação e, acima de tudo, pela amizade. À Patrícia Marques e à Filipa Fonseca, companheiras de trabalho e amigas, que estiverem sempre lá quando precisei, muito obrigada.

Gostaria igualmente de agradecer aos meus amigos Clara Magalhães, Diana Pinto, Filipa Monteiro e Ana Paula Lopes. Aos de sempre, Cristiano Gomes e Cláudia Matias. À minha querida amiga Mariana Mesquita, por tudo.

Obrigada aos meus pais e irmão por me proporcionarem todas as oportunidades e condições para evoluir enquanto pessoa e estudante. Bem como a toda a minha família por acreditarem sempre que sou e posso ser cada vez melhor naquilo que faço.

Por último, mas especialmente, ao João, por todos os momentos de carinho e compreensão, pela companhia nunca cessante e por ser quem é.

Obrigada a todos.

palavras-chave

Infertilidade, microbioma, plasma seminal, doenças sexualmente transmissíveis, gene ribossomal 16S, hiperviscosidade seminal.

resumo

A infertilidade é uma condição comum que afeta cerca de 15% dos casais em idade reprodutiva, na qual os fatores masculinos, quer isoladamente ou em combinação com fatores femininos, desempenham um papel preponderante. Embora na maioria dos indivíduos a principal causa subjacente a esta patologia ainda é considerada como idiopática, é atribuído às infeções agudas e crônicas do trato genitourinário masculino uma contribuição significativa. As doenças sexualmente transmissíveis (DST) causadas por *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum* e outros agentes infecciosos, tais como vírus do papiloma humano (HPV) e vírus herpes *simplex* (HSV1-2), têm um impacto global a nível mundial e são frequentemente associadas a efeitos negativos na espermatogénese, na função dos espermatozoides e na qualidade do plasma seminal. Nas últimas décadas, vários outros microrganismos existentes no corpo humano, como parte das comunidades microbianas, têm sido associados a diversas patologias, incluindo a infertilidade masculina. Este trabalho tem, por isso, como objetivo detetar e avaliar a prevalência de reconhecidos agentes de DST, bem como de outros microrganismos com um possível efeito desconhecido em casos (asteno, oligo, teratozoospermia e hiperviscosidade) e controlos de infertilidade. Para este efeito, foram usadas técnicas de PCR para avaliar a presença/ausência de sete agentes de DST e, numa segunda fase, as regiões hipervariáveis do gene ribossomal 16S foram analisadas por clonagem e sequenciação de *Sanger* ou por sequenciação em massa de modo a identificar outros agentes infecciosos. Os resultados não mostraram diferenças significativas na prevalência de agentes de DST entre casos e controlos, no entanto, o agente *N. gonorrhoeae* foi encontrado apenas nos casos de infertilidade, com uma frequência de 2%. Os dados da sequenciação do gene 16S demonstraram a existência de uma grande comunidade de bactérias no plasma seminal, tendo sido identificados mais de 200 géneros sendo os mais prevalentes *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Peptoniphilus*, *Propionibacterium* e *Haemophilus*. Assim, os resultados atuais apoiam a existência de um nível de variabilidade microbiana inter-individual e sugerem uma diferenciação subtil do fenótipo de hiperviscosidade em relação aos controlos. Neste fenótipo, não só a prevalência do filo *Proteobacteria* está enriquecida como foram identificados microrganismos com potencial efeito patogénico *Klebsiella*, *Acinetobacter* e *Facklamia* acompanhados de uma diminuição de géneros protetores como *Lactobacillus*.

keywords

Infertility, microbiome, seminal plasma, sexual transmitted diseases, 16S ribosomal gene, seminal hyperviscosity

abstract

Infertility is a common condition that affects approximately 15% of couples trying to conceive, and where male factors, either alone or in combination with female factors, are estimated to play an important role. Although in most individuals the underlying causes of this pathology are still considered idiopathic, acute and chronic infections of male genitourinary tract are thought to have a significant contribution. Sexually transmitted diseases (STD) caused by *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum* and other infectious agents, such as human papilloma virus (HPV) and herpes simplex viruses (HSV1-2), have a global impact worldwide and are often associated with negative effects on spermatogenesis, sperm function and semen quality. In the last decades, several other microorganisms existing in the human body as part of complex microbial communities have been associated with different pathologies including male infertility. This work aims to detect and evaluate the prevalence of recognized STD agents and other unsuspected microorganisms in infertility cases (astheno, oligo, teratozoospermia and hyperviscosity) and controls. For this purpose PCR techniques were used to evaluate the presence/absence of seven STD agents and hypervariable regions of 16S ribosomal gene were analyzed by cloning and *Sanger* sequencing or by high-throughput sequencing of pooled samples to identify other infectious agents. The results showed no significant differences between the prevalence of STD agents in infertile cases and controls, nonetheless the *N. gonorrhoeae* was found only in infertility cases at a 2% frequency. The data from the 16S gene sequencing demonstrated that there is a large community of bacteria in semen. More than 200 genera were identified, whereas *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Peptoniphilus*, *Propionibacterium* and *Haemophilus* were the most abundant. Even though the current findings seem to support some level of interindividual microbiome variability, the data also suggests a subtle differentiation of the hyperviscosity phenotype from controls. Not only by the enriched frequency of the *Proteobacteria* phylum in this phenotype as well as the higher prevalence of infectious *Klebsiella*, *Facklamia* and *Acinetobacter* microorganisms and the lower abundance of *Lactobacillus* protective bacteria.

Índice

| | |
|---|-----------|
| 1. Introdução | 7 |
| 1. Infertilidade – aspetos gerais | 9 |
| 1.1. Fisiologia do sistema reprodutor masculino e composição do sémen | 9 |
| 1.1.1. Testículos e epidídimo – espermatogénese | 10 |
| 1.1.2. Composição e características do sémen | 12 |
| 1.2. Análise da qualidade do sémen | 14 |
| 1.3. Infertilidade masculina – fatores associados | 15 |
| 2. Infecções do sistema reprodutor masculino – impacto na fertilidade | 17 |
| 2.1. Processos de perda da qualidade do sémen | 18 |
| 2.2. Infecções urogenitais | 20 |
| 2.2.1. Consequências reprodutivas das infeções urogenitais de origem bacteriana | 21 |
| 2.2.2. Consequências reprodutivas das infeções urogenitais de origem viral | 23 |
| 2.2.3. Consequências reprodutivas das infeções provocadas por protozoários .. | 24 |
| 3. Microbioma na doença humana | 25 |
| 3.1. Microbioma no sistema reprodutor masculino | 26 |
| 3.1.1. Comunidades bacterianas no sémen e fenótipos de infertilidade masculina | 26 |
| 2. Objetivos | 31 |
| 3. Materiais e Métodos | 35 |
| 3.1. Amostras biológicas | 37 |
| 3.2. Extração de DNA | 37 |
| 3.3. Detecção de agentes patogénicos por <i>multiplex-PCR</i> | 38 |
| 3.3.1. Controlos positivos de agentes patogénicos | 39 |
| 3.3.2. Eletroforese de DNA em gel de poli-acrilamida | 39 |
| 3.3.3. Purificação dos produtos de PCR e Sequenciação | 40 |
| 3.4. Amplificação das regiões hipervariáveis (V3-V6) do gene 16S | 40 |
| 3.4.1. Estudo piloto do microbioma do sémen por clonagem e sequenciação | 41 |
| 3.4.1.1. Clonagem dos fragmentos 16S-f1 e 16S-f2 | 41 |
| 3.4.1.2. PCR das colónicas, sequenciação e identificação dos microrganismos | 42 |
| 3.4.2. Estudo do microbioma por técnicas de sequenciação massiva (<i>Next Generation Sequencing</i> – NGS) | 42 |
| 3.4.2.1. Purificação dos produtos PCR, formação dos <i>pools</i> e sequenciação | 43 |
| 3.4.2.2. Tratamento de dados: Identificação de grupos taxonómicos bacterianos | 43 |
| 3.4.2.3. Análise estatística | 44 |
| 4. Resultados e Discussão | 45 |
| 4.1. Detecção de agentes de DST no plasma seminal | 47 |
| 4.2. Estudo preliminar do microbioma do fluido seminal em homens saudáveis e inférteis | 55 |

| | |
|---|-----------|
| 4.3. Estudo alargado do microbioma do sémen por técnicas de sequenciação de nova geração (NGS)..... | 62 |
| 4.3.1. Composição do microbioma do sémen – filo e classe | 64 |
| 4.3.2. Composição do microbioma do sémen – género/família prevalentes em casos e controlos de infertilidade..... | 66 |
| 5. Conclusão..... | 73 |
| 6. Referências bibliográficas..... | 77 |
| 7. Anexos | 85 |
| ANEXO I – Materiais e reagentes utilizados no decorrer do trabalho | 87 |
| ANEXO II – Protocolo de extração de DNA do plasma seminal (em coluna) – DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin protocol) – QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen)..... | 88 |
| ANEXO III – Condições das reações de multiplex-PCR para deteção de agentes patogénicos no sémen..... | 89 |
| ANEXO IV – Protocolo preparação dos géis para eletroforese de DNA em poliacrilamida e em agarose..... | 90 |
| ANEXO V – Purificação DNA e reação de sequenciação | 91 |
| ANEXO VI – Protocolo clonagem com <i>kit</i> TOPO-TA Cloning | 92 |
| ANEXO VII – Estudo preliminar do microbioma do fluido seminal em homens saudáveis e inférteis..... | 94 |
| ANEXO VIII – Estudo alargado do microbioma do sémen por técnicas de sequenciação de nova geração (NGS) - Ordens, Famílias e Géneros | 95 |

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1.1. Representação esquemática do sistema reprodutor masculino - órgãos e glândulas que contribuem para a composição do sémen | 10 |
| Figura 1.2. Representação das diferentes fases da espermatogénese e locais de formação dos espermatozoides | 11 |
| Figura 1.3. Esquema representativo de um espermatozoide humano: cabeça, peça intermédia, cauda e peça final | 12 |
| Figura 1.4. Incidência global de Infecções transmitidas sexualmente (valores referentes ao ano de 2009). Casos estimados de gonorreia, sífilis; clamidíase e tricomoníase | 17 |
| Figura 1.5. Géneros de bactérias abundantes em controlos (a) e casos de infertilidade (b) | 28 |
| Figura 3.1. Esquema da organização do gene ribossomal 16S. A localização das regiões hipervariáveis é indicada a cinzento e as regiões conservadas a verde | 41 |
| Figura 4.1. Separação eletroforética em gel de poliacrilamida dos diferentes fragmentos amplificados por <i>duplex</i> e <i>multiplex</i> -PCR; (a) Deteção de <i>C. trachomatis</i> (200 pb), amostra positiva: 3; (b) Deteção de <i>U. urealyticum</i> (167 pb), amostras positivas: 4 a 6; (c) Deteção de <i>N. gonorrhoeae</i> (162 pb), amostras positivas: 4 e 5; (d) Deteção de HPV, amostra positiva: 4; R: amostra de referência. Bandas do fragmento de controlo humano <i>SERPINA1</i> a 300 pb e 190 pb..... | 48 |
| Figura 4.2. Distribuição das frequências dos quatro agentes patogénicos identificados em amostras de plasma seminal de casos de infertilidade e controlos..... | 50 |
| Figura 4.3. Percentagem de coinfeções por diferentes agentes patogénicos detetadas em casos e controlos de infertilidade. | 51 |
| Figura 4.4. Abundâncias relativas dos diferentes agentes de DST nos quatro fenótipos de infertilidade avaliados. Abundâncias totais de cada agente patogénico calculadas pela soma das abundâncias referentes a infeções simples e coinfeções | 52 |
| Figura 4.5. Distribuição dos 35 géneros bacterianos mais abundantes identificados em amostras de casos e controlos de infertilidade | 57 |
| Figura 4.6. Representação gráfica da composição das comunidades bacterianas do sémen das 10 amostras selecionadas de casos de infertilidade..... | 58 |
| Figura 4.7. Representação gráfica da composição das comunidades bacterianas do sémen das 6 amostras selecionadas de controlos de infertilidade | 58 |
| Figura 4.8. Abundância relativa dos diferentes filos bacterianos identificados no sémen dos quatro grupos amostrais (<i>pools</i>). <i>Pool C</i> : amostras controlo, <i>Pool AT</i> : amostras asteno e teratozoospermicos, <i>Pool ATO</i> : amostras asteno, terato e oligozoospermicos, <i>Pool H</i> : amostras hiperviscosos..... | 65 |
| Figura 4.9. Abundância relativa das diferentes classes bacterianas identificados no sémen dos quatro grupos amostrais (<i>pools</i>). <i>Pool C</i> : amostras controlo, <i>Pool AT</i> : amostras asteno e teratozoospermicos, <i>Pool ATO</i> : amostras asteno, terato e oligozoospermicos, <i>Pool H</i> : amostras hiperviscosos..... | 66 |

Figura 4.10. Abundância relativa dos diferentes géneros ou famílias bacterianas do plasma seminal identificados nos quatro grupos amostrais (*pools*). As famílias são apresentadas entre parêntesis. *Pool C*: amostras controlo, *Pool AT*: amostras asteno e teratozoospermicos, *Pool ATO*: amostras asteno, terato e oligozoospermicos, *Pool H*: amostras hiperviscosos. (Legenda: azul – filo *Firmicutes*, verde – filo *Proteobacteria*, roxo – filo *Actinobacteria*, laranja – filo *Bacteroidetes*, amarelo – filo *OD1*, cinza – filo *Fusobacteria*, azul-escuro – filo *Cyanobacteria*) 69

Figura AVI.1. Mapa do vetor pCRII-TOPO utilizado para a clonagem. Sequências dos *primers* utilizados no ponto AVI.B., M13 *forward* e M13 *reverse*.....93

Figura AVIII.A. Comunidades bacterianas no sêmen de indivíduos inférteis e controlos – Ordens mais abundantes. Abundância relativa (%) de cada ordem em função dos *pools*/fenótipos (Legenda: c_ Classe; o_ Ordem; f_ Família. azul – filo *Firmicutes*, verde – filo *Proteobacteria*, roxo – filo *Actinobacteria*, laranja – filo *Bacteroidetes*, amarelo – filo *OD1*, cinza – filo *Fusobacteria*, azul-escuro – filo *Cyanobacteria*) 95

Figura AVIII.B. Comunidades bacterianas no sêmen de indivíduos inférteis e controlos – Famílias mais abundantes. Abundância relativa (%) de cada família em função dos *pools*/fenótipos (Legenda: c_ Classe; o_ Ordem; f_ Família. azul – filo *Firmicutes*, verde – filo *Proteobacteria*, roxo – filo *Actinobacteria*, laranja – filo *Bacteroidetes*, amarelo – filo *OD1*, cinza – filo *Fusobacteria*, azul-escuro – filo *Cyanobacteria*) 96

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1.1. Percentagens das contribuições de cada secreção no fluido seminal e diferentes substâncias bioquímicas presentes | 13 |
| Tabela 1.2. Diferentes fatores apontados como causas mais comuns de infertilidade masculina . | 16 |
| Tabela 1.3. Agentes patogênicos associados com DST e diferentes efeitos negativos nos processos de espermatogênese e na função dos gâmetas masculinos | 19 |
| Tabela 1.4. Agentes patogênicos e seus efeitos na infertilidade | 21 |
| Tabela 1.5. Agentes patogênicos de DST mais prevalentes e patologias associadas | 24 |
| Tabela 1.6. Gêneros e espécies de microrganismos mais abundantes no sêmen | 27 |
| Tabela 3.1. Diferentes fenótipos observados nas amostras de casos de infertilidade | 37 |
| Tabela 3.2. <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR para a detecção de cada patogênico, respetivas sequências e tamanho aproximado dos fragmentos amplificados | 38 |
| Tabela 3.3. <i>Primers</i> utilizados na reação de amplificação das regiões V3-V6 do gene 16S | 41 |
| Tabela 4.1. Avaliação da consistência dos resultados das três reações de PCR para a detecção dos sete agentes patogênicos testados. Percentagem do número de amostras com resultados considerados positivos em pelo menos uma das reações de PCR e resultados considerados positivos em duas ou mais reações PCR (n=número de indivíduos amostrados) | 49 |
| Tabela 4.2. Características fenotípicas de cada uma das amostras clonadas e respetivos resultados obtidos na pesquisa de agentes bacterianos de DST | 55 |
| Tabela 4.3. Distribuição das frequências dos nove gêneros transversais a casos e controlos de infertilidade | 56 |
| Tabela 4.4. Composição dos quatro grupos amostrais (<i>pools</i>) de casos e controlos de infertilidade | 63 |
| Tabela 4.5. Distribuição da diversidade bacteriana identificada por grupo amostral (<i>pool</i>) nos diferentes níveis taxonómicos. Valores totais e superiores ao limite estabelecido de 0,1% | 64 |
| Tabela 4.6. Principais diferenças entre gêneros mais abundantes no microbioma do sêmen nos diferentes grupos amostrais | 68 |
| Tabela AI. Materiais e reagentes utilizados no decorrer do trabalho | 87 |
| Tabela AIII.1. Condições das reações de <i>duplex</i> e <i>multiplex</i> -PCR | 89 |
| Tabela AVII.1. Distribuição dos gêneros bacterianos identificados em amostras de casos e controlos de infertilidade | 94 |

Lista de Abreviaturas

- OMS – Organização Mundial de Saúde
DNA – Ácido desoxirribonucleico
PSA – Antígeno específico da próstata
LDH – Lactato desidrogenase
RNA – Ácido Ribonucleico
DST – Doença sexualmente transmissível
VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana
ROS – (*reactive oxygen species*) Espécies reativas de oxigénio
PMN – (Granulócitos) Polimorfonucleares
HPV – Vírus do papiloma humano
HBV – Vírus Hepatite B
HCV – Vírus Hepatite C
CMV – Citomegalovírus
SPC – Síndrome prostática crónica
HSV-1/2 – Vírus herpes *simplex* 1/2
PCR – (*Polymerase chain reaction*) Reação em cadeia da Polimerase
NCBI – *National Center for Biotechnology information*
pb – pares de bases
NGS – *Next Generation Sequencing*
OTU – (*Operational Taxonomic Unit*) Unidade taxonómica operacional
FSH – Hormona Folículo Estimulante
LH – Hormona Luteinizante
PG – Prostaglandinas
GC – (Conteúdo em) Guanina-Citosina
16S – gene 16S do RNA ribossomal

1. Introdução

1. Infertilidade – aspetos gerais

A infertilidade é definida clinicamente pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma doença do sistema reprodutivo caracterizada pela incapacidade de casais sexualmente ativos, em idade fértil, alcançarem uma gravidez após doze meses de atividade sexual regular, sem recurso a qualquer tipo de método contraceptivo (1,2). Esta condição é cada vez mais frequente em países industrializados e afeta cerca de 10-20% dos casais, sendo que os fatores masculinos, isoladamente ou em conjunto com fatores femininos, têm um papel preponderante em 40-50% dos casos de infertilidade (3,1). Atualmente considera-se que esta doença possa afetar 48,5 milhões de casais e que estes sejam incapazes de gerar um filho mesmo após um período mais alargado de cinco anos de atividade sexual (4,5). No continente Europeu, especificamente, calcula-se que um em cada sete casais tenha dificuldades em conceber de modo natural (6). Em Portugal, estima-se que sejam cerca de 300 mil os casais com este problema de saúde (6).

Apesar das terapias contemporâneas de reprodução medicamente assistida contribuírem para um aumento significativo das hipóteses de conceção entre casais inférteis, estas soluções tendem a ignorar ou desconsiderar um possível diagnóstico etiológico ou patofisiológico mais concreto. Uma análise da distribuição de fatores etiológicos de infertilidade masculina revela que numa percentagem elevada de pacientes a infertilidade é considerada idiopática, ou seja, de origem desconhecida (2,7).

Tradicionalmente, a definição de infertilidade baseia-se na observação de uma ou mais anomalias durante uma análise do sémen – o espermograma (8,9). Assim, na avaliação do espermograma são tidos em consideração certos valores de referência que, quando alterados, são indicativos de uma condição de infertilidade masculina. Desta forma, torna-se fundamental um maior conhecimento da anatomia e fisiologia do sistema reprodutor masculino e das diferentes contribuições de cada órgão para a composição do sémen.

1.1. Fisiologia do sistema reprodutor masculino e composição do sémen

O sémen consiste num fluido biológico que se forma no momento da ejaculação. Normalmente, cada mililitro de sémen contém mais de 20 milhões de espermatozoides (8), no entanto, a maioria do seu volume consiste em secreções das glândulas acessórias do sistema reprodutor masculino (9,10). As contribuições de cada órgão para a composição normal do sémen são díspares, sendo que cerca de 90% do volume total do ejaculado é

proveniente das vesículas seminais e da próstata e, o restante volume, é formado pelas secreções dos testículos e glândula bulbo-uretral (Figura 1.1) (10).

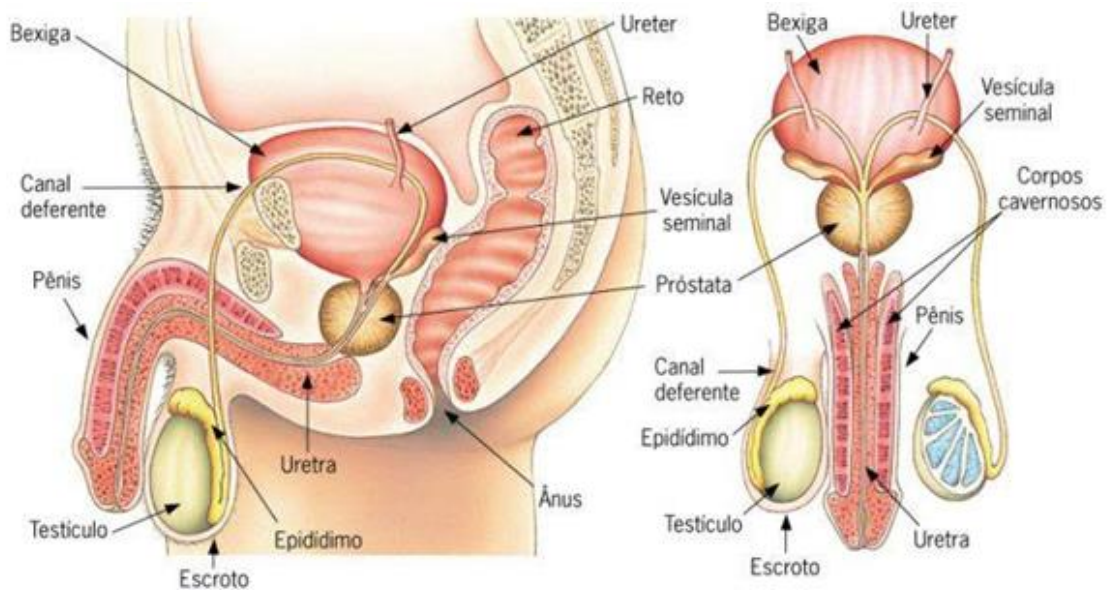


Figura 1.1. Representação esquemática do sistema reprodutor masculino - órgãos e glândulas que contribuem para a composição do sêmen.

(disponível em <http://www.alunosonline.com.br/biologia/sistema-genital-masculino.html>).

1.1.1. Testículos e epidídimo – espermatogênese

Os testículos, para além de terem uma função endócrina, são os órgãos responsáveis pela produção dos espermatozoides (espermatogênese). Na sua anatomia, são compostos por cerca de 200-300 túbulos seminíferos, entre os quais existe um tecido intersticial constituído por células de *Leydig* que, quando estimuladas pela hormona luteinizante (LH), são responsáveis pela secreção de testosterona, a principal hormona sexual masculina. Para além das células de *Leydig*, os testículos contêm ainda no interior dos túbulos seminíferos as células de *Sertoli* que suportam a espermatogênese, tanto a nível mecânico como nutricional. São estas células que sob o estímulo da testosterona e da hormona folículo estimulante (FSH) da hipófise, sintetizam proteínas (como a transferrina e a ceruloplasmina) necessárias para o desenvolvimento e diferenciação das células do epitélio germinativo do testículo (10,11).

É ao nível dos túbulos seminíferos que ocorre a espermatogênese, o processo de formação e maturação dos espermatozoides que se desenvolve a partir da puberdade, consistindo em quatro fases: multiplicação, crescimento, maturação e diferenciação (Figura 1.2). O processo tem início numa célula diploide denominada de espermatogónia e prolonga-se por cerca de 70 dias até ser completada a diferenciação dos espermatozoides.

1. Introdução

Após uma fase inicial de divisão celular (mitose), as espermatogónias passam por um período de crescimento e, à medida que se afastam da superfície do túbulo seminífero em direção ao lúmen, dão origem a células maiores, os espermatócitos I. De seguida, na fase de maturação, ocorre uma série de divisões meióticas que dão origem aos espermatócitos II (células haploides) que, por sua vez, sofrem um processo de maturação e originam os espermatídios. Estes últimos, após uma segunda fase de meiose e diferenciação, adquirem uma cauda, que completa a formação dos espermatozoides (10,12,13).

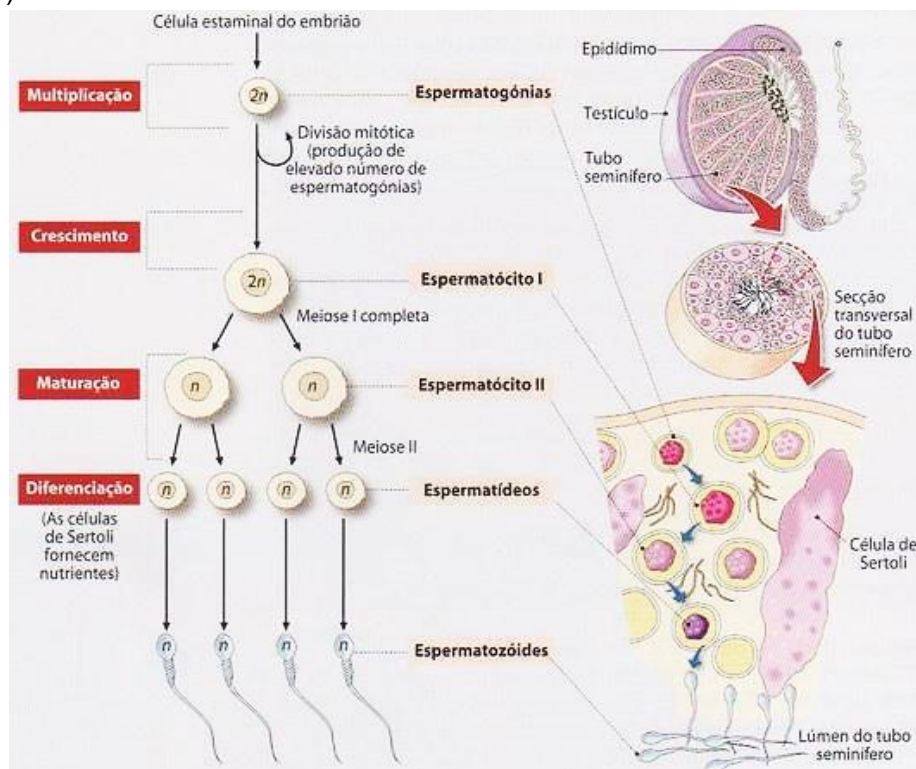


Figura 1.2. Representação das diferentes fases da espermatogénese e locais de formação dos espermatozoides.

(disponível em <https://biologianolaboratorio.files.wordpress.com/2011/10/esquema3.jpg>).

Cada espermatozoide pode ser dividido em quatro partes: cabeça, peça intermédia, cauda e peça final, todas envoltas por uma membrana plasmática única (Figura 1.3). A cabeça é constituída por um núcleo que contém o DNA nuclear condensado e uma camada superficial, o acrossoma, um invólucro protetor que contém as enzimas que auxiliam a fecundação (ex. hialuronidase e proteases, como a acrosina). A peça intermédia e a cauda são constituídas por microtúbulos que auxiliam a movimentação e que, na zona intermédia, estão rodeados por mitocôndrias que fornecem a energia para o movimento do espermatozoide (10,13).

Uma vez concluída a formação dos espermatozoides, estes são armazenados no epidídimo até ao momento da ejaculação. O epidídimo consiste num pequeno ducto na superfície de cada testículo e é nesta estrutura que os espermatozoides passam por um processo de maturação e aquisição de motilidade que lhes irá posteriormente permitir concretizar a fecundação. Após uma ejaculação, os espermatozoides e fluidos provenientes do testículo avançam do epidídimo até ao canal deferente onde encontram as secreções das vesículas seminais e da próstata, misturando-se num único fluido, o sémen ou, mais corretamente, no coágulo seminal ejaculado pela uretra (10).

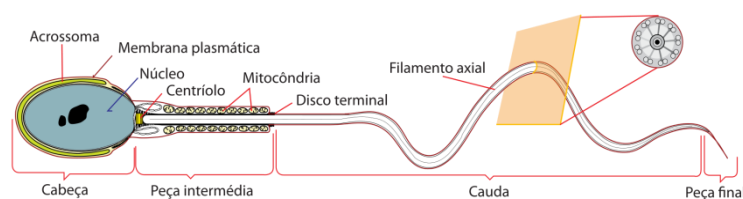


Figura 1.3. Esquema representativo de um espermatozoide humano: cabeça, peça intermédia, cauda e peça final (disponível em <https://pt.wikipedia.org/wiki/Acrossoma>).

1.1.2. Composição e características do sémen

O sémen contém diferentes substâncias com efeitos importantes na função dos espermatozoides, provenientes das secreções das glândulas acessórias do sistema reprodutor masculino, da próstata, das vesículas seminais, da glândula bulbo-uretral e dos testículos. Na tabela 1.1 estão assinaladas as percentagens das contribuições de cada glândula para a composição normal do sémen, bem como as substâncias mais importantes que as constituem (10).

Em termos de volume, as vesículas seminais são os contribuintes mais importantes para o fluido seminal, sendo responsáveis por mais de metade do volume total. As substâncias mais conhecidas presentes nesta secreção são o açúcar frutose, que fornece uma fonte de energia para os espermatozoides, as prostaglandinas (PG) e as semenogelinas (10,14). No momento da ejaculação, as semenogelinas estão envolvidas na formação de uma matriz, ou coágulo, que aprisiona e protege os espermatozoides. Cinco a 20 minutos depois dá-se a liquefação do coágulo pelo PSA e os espermatozoides adquirem motilidade, conjuntamente com a libertação de péptidos com efeito antibacteriano no plasma seminal humano (14).

O fluido proveniente da próstata constitui 10-30% do fluido seminal e contém um largo número de substâncias envolvidas na liquefação do sémen, tais como o antigénio específico da próstata (PSA), sendo igualmente enriquecido em cálcio, zinco e albumina.

As secreções provenientes da glândula bulbo-uretral, situada junto à próstata, são ricas em mucoproteínas e o seu papel é de lubrificação da uretra de modo a facilitar a ejaculação do fluido seminal (10,12,13).

Tabela 1.1. Percentagens das contribuições de cada secreção no fluido seminal e diferentes substâncias bioquímicas presentes (Adaptado de Jequier, 2011) (10).

| Fonte da secreção | % no ejaculado | Substâncias presentes |
|---|----------------|---|
| Testículos e ductos do epidídimo | 5 | Testosterona Inibina L-Carnitina LDH C ₄ Transferrina Ceruloplasmina |
| Vesículas seminais | 46-80 | Frutose Prostaglandinas Semenogelinas (Substrato para coagulação do sémen) |
| Próstata | 13-33 | Fosfatase ácida (marcador de cancro da próstata) Citratos Proteases (PSA) Hialuronidase Zinco, Cálcio, Magnésio |
| Glândula bulbo-uretral | 2-5 | Mucoproteínas Imunoglobulina G |

Considerado cada componente do ejaculado, a contribuição dos testículos, apesar de ser das mais baixas (5%), tem uma relevância superior, uma vez que o fluido, para além de incluir os espermatozoides, contém a testosterona, a hormona reguladora inibina, a enzima transferrina (transporte de ferro) e a proteína ceruloplasmina (transporte de cobre), produzidas pelas células de *Sertoli*. A enzima lactato desidrogenase (LDH C₄) também pode ser encontrada nas secreções dos testículos mas, geralmente, esta é um importante indicador de dano dos espermatozoides durante a sua passagem no epidídimo, uma vez que ela está normalmente presente no interior dos espermatozoides e só é libertada quando estes rompem (10,13).

Assim, o fluido seminal é constituído não só por espermatozoides mas por uma variedade de substâncias com funções distintas na preservação da qualidade do sémen (Tabela 1.1). Desta forma, qualquer alteração em uma ou mais secreções que constituem o sémen pode produzir efeitos nas propriedades físicas e químicas do fluido, alterando a

sua função. No estudo de casos de infertilidade é importante uma análise do sêmen que indique a possibilidade da existência de falhas no processo de síntese do fluido, de modo a inferir sobre uma possível causa de infertilidade.

1.2. Análise da qualidade do sêmen

Os fenômenos de formação e diferenciação dos espermatozoides e o seu transporte ao longo do sistema reprodutor masculino são processos sensíveis que poderão sofrer alterações por vários fatores intrínsecos ou extrínsecos ao organismo. Assim, a qualidade e quantidade do sêmen são duas medidas importantes de referência de fertilidade. Segundo a classificação da OMS, uma análise de sêmen é considerada normal quando os valores de referência apontam para um volume de ejaculado igual ou superior a 2 mililitros; pH entre 7.2-8.0; concentração de espermatozoides igual ou superior a 20 milhões por mililitro; motilidade progressiva rápida ou lenta $\geq 50\%$ ou progressiva rápida $\geq 25\%$; 4% ou mais de espermatozoides com morfologia normal e contagem de leucócitos inferior a 1 milhão por mililitro (8,9,15).

Assim, e tendo por base as recomendações da OMS, são considerados parâmetros de infertilidade os seguintes valores do espermograma que determinam diferentes fenótipos de infertilidade (8, 9,16):

- a) Astenozoospermia - ausência ou redução de motilidade: $<25\%$ de espermatozoides com motilidade progressiva rápida;
- b) Oligozoospermia - número reduzido de espermatozoides: <20 milhões/mL;
- c) Azoospermia - ausência de espermatozoides no ejaculado;
- d) Aspermia - sem ejaculado;
- e) Teratozoospermia - morfologia alterada: $<5\%$ dos espermatozoides com morfologia normal.

Estes parâmetros anormais são tidos como a maior consequência ou causa de infertilidade, no entanto, essas alterações podem ser provocadas por múltiplos fatores (17).

1.3. Infertilidade masculina – fatores associados

Apesar da causa mais comum de infertilidade masculina ser uma falha idiopática, uma percentagem significativa dos casos pode ter tratamento. A análise ao fluido seminal representa, por isso, um passo importante para avaliar e diagnosticar os diferentes casos de infertilidade masculina (18). Muitos fatores podem afetar a fertilidade, desde fatores etiológicos (idade; *stress*; dieta pobre em zinco e vitamina C); presença de toxinas no organismo (álcool; tabaco; toxinas ambientais; drogas); alguns medicamentos ou terapias que podem diminuir a capacidade de fertilização; anomalias genéticas *minor* (mutações) ou *major* (alterações cromossómicas); fatores hormonais e alterações associadas a causas testiculares, pós-testiculares ou disfunção sexual. Na tabela 1.2 são apresentadas as causas mais comuns de infertilidade masculina (4).

Dentre estas causas são vários os fatores que podem afetar a qualidade do sémen, sendo sempre recomendada a realização de um exame físico e uma avaliação urológica de modo a excluir a hipótese de anatomia ou funcionamento anormal de algum órgão do sistema reprodutor, em consequência de doenças genéticas ou endócrinas. Esta avaliação possibilita, de certa forma, estabelecer o estado clínico do paciente e determinar se existem possíveis condições que possam afetar a fertilidade, tais como, historial de doença, trauma ou cirurgia do trato genital e toma de determinados fármacos ou drogas que possam alterar a função dos órgãos reprodutores (Tabela 1.2). Fatores ocupacionais e ligados ao estilo de vida de cada paciente, tais como o facto de ser fumador, podem também resultar em alterações na qualidade do sémen e na morfologia das células reprodutivas. Alguns estudos reportaram efeitos adversos provocados pelos metabolitos do tabaco na função das células de *Leydig*. Uma revisão recente da literatura sugere também uma influência do tabaco na capacidade reprodutiva masculina causada por alterações hormonais e com repercussões na espermatogénese (13,18).

Algumas alterações estruturais do cromossoma Y, tais como deleções de determinadas regiões abrangendo genes com funções ligadas à espermatogénese, podem estar correlacionadas com situações de oligozoospermia ou azoospermia. Um exemplo é o gene *DAZ-1* (*deleted in azoospermia-1*) que pertence à família de genes *DAZ* localizado na região Yq11.223 e codifica uma proteína que se liga ao RNA e parece ter um papel importante na espermatogénese (18). A Síndrome de *Klinefelter*, caracterizada por um cariótipo XXY, é também uma causa genética comum de infertilidade masculina, correspondendo a 5-6% dos casos de infertilidade e a 10% dos casos de azoospermia. Neste sentido, são geralmente efetuados testes citogenéticos e/ou moleculares que permitam discriminar estas anomalias *major* de outros fatores de origem desconhecida em

1. Introdução

indivíduos com concentração do esperma inferior a 10 milhões de espermatozoides por mililitro (19).

Tabela 1.2. Diferentes fatores apontados como causas mais comuns de infertilidade masculina. (Adaptado de Brookings *et al.* 2013, Anawalt 2013) (4,19).

| Fatores gerais | Causas pós-testiculares | Medicamentos |
|-----------------------------------|----------------------------------|---|
| Idade | | Esteroides |
| Obesidade | Obstrução do epidídimo | Quimioterapia |
| Stress | Obstrução adquirida (vasectomia) | Fenitoína |
| Dieta pobre em zinco e Vitamina C | Ejaculação retrógrada | Cimitadina |
| | | Sulfasalazine |
| Fatores hormonais | Anomalias cromossômicas | Toxinas |
| Disfunção no hipotálamo | Defeitos genéticos no cr. Y | Álcool |
| Hiperprolactinemia | Microdeleções no cr. Y | Tabaco e drogas recreativas |
| Hiperplasia adrenal congênita | Síndrome de <i>Klinefelter</i> | Uso de esteroides anabólicos |
| Hipogonadismo primário | Número anormal de cromossomas - | Toxinas ambientais (radiação, mercúrio, metais pesados, pesticidas) |
| Hipotireoidismo | Translocação Robertsoniana | |
| Fatores testiculares | Disfunção sexual | Infeções genitais |
| Idiopático | Disfunção erétil | Prostatite |
| Varicocele | Ejaculação prematura | Uretrite |
| Trauma | Incapacidade de ejacular | Orquite com atrofia |
| Cancro testicular | | |

Para além das causas de infertilidade masculina referidas anteriormente, existem ainda outras em que o mecanismo exato de disfunção não é conhecido e onde as inflamações do trato reprodutor podem ter um papel importante no desenvolvimento da doença. Este tipo de inflamações está associado com a redução da qualidade do sémen através de vários mecanismos, tais como o aumento do *stress* oxidativo (17,20,21).

De acordo com estudos recentes, 15-20% dos homens inférteis são afetados por infeções no sémen que podem estar associadas a parâmetros anormais do espermograma e a fenótipos de oligozoospermia, astenozoospermia e teratozoospermia. Algumas investigações centradas na análise de amostras de sémen de homens seguidos em clínicas de fertilidade confirmam que, de facto, um número significativo de homens com diferentes fenótipos de infertilidade apresenta algum tipo de infeção, mesmo que assintomática. Assim, estes estudos recentes têm vindo a debruçar-se sobre a análise do microbioma do trato genital masculino em toda a sua extensão, desde a uretra, testículos

e glândulas acessórias, através da avaliação do sêmen ou urina, de modo a compreender melhor o impacto de diferentes microrganismos na saúde humana e na fertilidade masculina (22,23,24).

2. Infecções do sistema reprodutor masculino – impacto na fertilidade

O sêmen é um importante veículo de transmissão de microrganismos responsáveis pelo desenvolvimento de doenças sexualmente transmissíveis (DST). Estas doenças surgem por vezes como infeções assintomáticas ou não diagnosticadas por apresentarem uma sintomatologia ligeira que facilmente pode passar despercebida. Em 2000, a OMS reconheceu o papel das infeções do trato reprodutor, agudas ou crónicas, como um importante fator na infertilidade humana com possíveis implicações para a saúde individual e pública (1).

Com a exceção das infeções causadas pelo vírus da imunodeficiência humana (VIH), as quatro infeções com maior prevalência e com tratamento disponível atualmente são: a tricomoníase (*Trichomonas vaginalis*), clamídiase (*Chlamydia trachomatis*), sífilis (*Treponema pallidum*) e gonorreia (*Neisseria gonorrhoeae*), que em conjunto representam 80% das infeções sexualmente transmissíveis a nível mundial. Por ano, estima-se que cerca de 500 milhões de indivíduos sejam infetados por pelo menos um destes agentes infecciosos (Figura 1.4) (1,5,7).

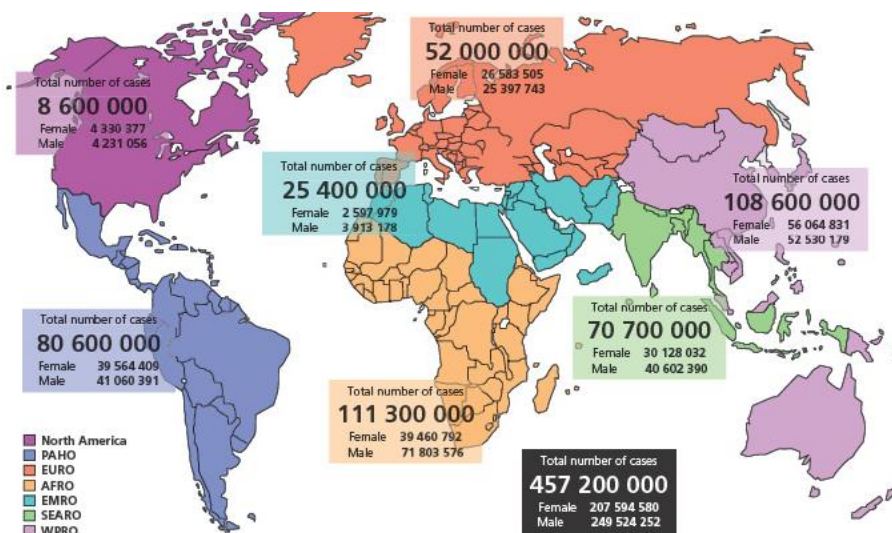


Figura 1.4. Incidência global de Infecções transmitidas sexualmente (valores referentes ao ano de 2009). Casos estimados de gonorreia, sífilis; clamídiase e tricomoníase (23).

De acordo com as recomendações da OMS (8), uma infecção do sistema urogenital é considerada quando se registam os seguintes parâmetros no sémen: (i) bacteriospermia significativa ($\geq 10^3$ bactérias/ml de ejaculado); (ii) deteção de *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* ou *U. urealyticum*; e (iii) leucocitospermia significativa, ou seja, uma concentração anormalmente elevada de leucócitos no sémen ($\geq 10^6$ leucócitos positivos/ml de ejaculado) (5,23). Situações de bacteriospermia e leucocitospermia foram ambas associadas com a infertilidade masculina através de múltiplos mecanismos que incluem a deterioração da espermatogénese, o desequilíbrio da função dos espermatozoides e a obstrução/disfunção do sistema genital (25). Mais concretamente, a bacteriospermia define uma situação em que estirpes de bactérias patogénicas colonizam o sistema urogenital, podendo desencadear sinais e alterações que podem permanecer assintomáticos durante um certo período de tempo (23). Calcula-se que cerca de 70% das amostras de sémen estejam geralmente contaminadas por diferentes géneros de bactérias não patogénicas, o que sugere que nem sempre situações de bacteriospermia signifiquem necessariamente uma infecção genital (26). Por sua vez, os casos de leucocitospermia têm uma prevalência que varia entre 2-40%, dependendo da população em estudo e, nestas situações, pode ocorrer uma perda de função dos espermatozoides (27).

Embora um número elevado de leucócitos no sémen possa ser globalmente aceite como um bom indicador de infertilidade, em alguns casos a leucocitospermia não está diretamente correlacionada com a presença de bactérias patogénicas, nem diretamente correlacionada com o grau de infeção (5,26). Estudos recentes apontam para que 15-20% dos homens inférteis sejam afetados por infeções do sémen, no entanto, existe ainda alguma controvérsia no que diz respeito à identificação de DST como uma causa comum de infertilidade masculina, apesar do facto de certas infeções bacterianas afetarem reconhecidamente não só a função dos espermatozoides bem como toda a espermatogénese (22,28).

2.1. Processos de perda da qualidade do sémen

Os processos infecciosos e inflamatórios desencadeados no sistema reprodutor masculino podem por si só provocar uma deterioração da espermatogénese e afetar a fertilidade masculina através de múltiplos mecanismos (Tabela 1.3). Dependendo da concentração dos agentes infecciosos, as células reprodutivas podem sofrer processos de aglutinação e adesão a bactérias. Estas interações entre bactérias e espermatozoides podem provocar alterações da função das glândulas acessórias, através de danos

causados pelos flagelos e *pili* dos microrganismos nas membranas plasmáticas das células das glândulas genitais. Adicionalmente, a bacteriospermia significativa pode ainda alterar a disponibilidade e função dos componentes do sémen por estar associada com processos de apoptose, perda de motilidade e reduzida capacidade de fertilização dos espermatozoides (5,25).

Tabela 1.3. Agentes patogénicos associados com DST e diferentes efeitos negativos nos processos de espermatogénese e na função dos gâmetas masculinos (Adaptado de Gimenes *et al.* 2014) (29).

| Fase afetada | Efeito negativo associado | Agente patogénico responsável |
|-----------------|---|---|
| Espermatogénese | Ligação às células de <i>Sertoli</i> Impedem início da espermatogénese | HPV HSV-1 |
| | Ligação às células da linha germinativa – impedem diferenciação | Vírus Hepatite B VIH HSV-1 Citomegalovírus |
| Espermatozoides | Ligação ao acrossoma e dano no DNA – perda de função | Vírus Hepatite B e C HPV HSV-2 <i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Ureaplasma spp.</i> VIH |
| | Ligação à peça intermédia – perda de motilidade | <i>Chlamydia trachomatis</i> <i>Mycoplasma genitalium</i> VIH |

HPV – vírus do papiloma humano; HSV- vírus herpes *simplex*; VIH – vírus da imunodeficiência humana

A aglutinação dos espermatozoides tem sido ainda correlacionada com uma menor capacidade reativa do acrossoma, alterações da morfologia e com uma subsequente perda de função reprodutiva (30). Por outro lado, a simples presença de diferentes microrganismos no sistema reprodutor masculino pode, através de mecanismos de resposta à infeção (imunidade inata), afetar a função e integridade dos espermatozoides, das quais se destaca a produção de citocinas (moléculas envolvidas na sinalização da resposta imune) e formação de espécies reativas de oxigénio (ROS), que incluem quer a produção de peróxido de hidrogénio (H₂O₂) quer a formação de radicais livres de oxigénio (21,25,31). Os leucócitos encontrados no fluido seminal, num processo de resposta inata, são essencialmente macrófagos e granulócitos polimorfonucleares (PMN) capazes de provocar danos nos espermatozoides pela geração de ROS e indução de apoptose (20,26). Concretamente, as ROS têm efeitos adversos na capacidade antioxidante do sémen e na estrutura da membrana celular dos espermatozoides, na sequência da peroxidação dos

lípidos da membrana plasmática que podem levar à sua destruição e a um aumento do índice de fragmentação do DNA nuclear do espermatozoide (5,20,21).

Outras alterações associadas com os processos infecciosos são consequência da proliferação bacteriana que conduz à produção de uma série de toxinas e produtos metabólicos capazes de alterar a composição do sémen. A diminuição na disponibilidade de alguns elementos essenciais para a manutenção das propriedades antioxidantes, como o zinco e o selênio, é também um fator de indução de apoptose e perda de qualidade do sémen (25,30).

Outro mecanismo proposto admite que as infecções induzam uma resposta imune através de células T e anticorpos contra elementos bacterianos. No entanto, estas células T e anticorpos podem igualmente reconhecer alguns componentes celulares dos espermatozoides e provocar danos mediados pela resposta imune. Concretamente, os espermatozoides podem partilhar alguns elementos antigénicos com espécies de bactérias frequentemente encontradas no sistema geniturinário que, em caso de uma infeção mais generalizada, podem induzir uma resposta imune inespecífica em que os anticorpos interagem não só com as bactérias infecciosas bem como com os flagelos dos espermatozoides, reduzindo a sua motilidade (31,32).

2.2. Infecções urogenitais

As infeções urogenitais são fatores etiológicos importantes na infertilidade masculina e um número razoável de patogénicos sexualmente transmissíveis têm sido apontados como agentes deste tipo de infeções (26,71). No entanto, nem todos os patogénicos que são transmitidos por via sexual se manifestam em doenças urogenitais e nem todas as infeções urogenitais são exclusivamente originadas por via sexual (33). No conjunto de todas as infeções urogenitais, aquelas que são crónicas ou se mantêm por tratar por longos períodos de tempo, têm em geral uma maior associação com infertilidade do que as infeções agudas ou transitórias, mesmo apesar de, em muitos casos, os agentes etiológicos exatos causadores das infeções permanecerem desconhecidos (7,34).

Conforme referido anteriormente, entre as DST mais comuns provocadas por bactérias destacam-se a gonorreia, clamídiase e a sífilis. Para além destas, algumas DST podem ser provocadas por diferentes vírus e incluem doenças que podem ser prevenidas mas que não têm atualmente tratamento eficaz. Estas compreendem o vírus da imunodeficiência humana (VIH), o vírus do papiloma humano (HPV), o vírus hepatite B e C (HBV/HCV), o citomegalovírus (CMV) e o vírus do herpes *simplex* (HSV). A tricomoníase,

provocada pelo protozoário *Trichomonas vaginalis*, é também considerada uma DST na qual podem ser associadas manifestações clínicas que variam entre uretrite, úlceras genitais e prostatite, (Tabelas 1.4 e 1.5) (26,33).

Tabela 1.4. Agentes patogênicos e seus efeitos na infertilidade (Adaptado de Ochsendorf, 2008) (7).

| Doença | Agente patogênico | Relevância na infertilidade |
|-------------------------|-------------------------------|--|
| Bactérias | | |
| Gonorreia | <i>Neisseria gonorrhoeae</i> | Masculina, feminina |
| Clamídiase/Uretrite | <i>Chlamydia trachomatis</i> | Masculina, feminina |
| Uretrite | <i>Ureaplasma urealyticum</i> | Altera motilidade dos espermatozoides |
| Sífilis | <i>Treponema pallidum</i> | Co-factor para transmissão de VIH |
| Vírus | | |
| SIDA | VIH | Masculina |
| Infeção assintomática | HSV e HPV | Afeta qualidade do sêmen, Astenozoospermia |
| Protozoários | | |
| Uretrites e prostatites | <i>Trichomonas vaginalis</i> | Masculina, feminina |

2.2.1. Consequências reprodutivas das infecções urogenitais de origem bacteriana

Os agentes patogênicos associados com a infertilidade podem ter diferentes implicações consoante os locais e mecanismos de infecção: (a) as infecções sistêmicas, agudas ou crônicas, podem resultar em infertilidade temporária ou permanente; desregulação da função testicular e da espermatogénese ou disfunção hormonal; (b) infecções nos testículos provocam, em geral, alterações na produção dos espermatozoides; (c) infecções das glândulas acessórias e da uretra têm um impacto negativo na função reprodutiva e fertilidade, podendo em alguns casos afetar a estrutura e função dos espermatozoides, bem como todo o processo de espermatogénese (4,28,35). No estudo de Ivanov *et al.* (2009) foi feita uma avaliação da microflora do fluido seminal de homens saudáveis e de homens que sofriam de síndrome prostática crónica (SPC), concluindo-se que uma larga parte das infecções crónicas da próstata é provocada por bactérias constituintes do microbioma do fluido seminal, geralmente desconsideradas como infecciosas (36). A presença de DNA de agentes de DST foi também correlacionada anteriormente com uma diminuição da concentração e da motilidade dos espermatozoides,

no entanto, cada agente possui características que lhe podem conferir diferentes efeitos patogénicos ao nível do sistema urogenital com relevância no estudo da infertilidade masculina (7,71).

No que diz respeito às espécies de bactérias patogénicas, o seu impacto negativo deve-se, em particular, ao efeito que têm na redução da motilidade e alteração da função normal dos espermatozoides. Dentre as espécies de bactérias que interagem com os espermatozoides e alteram a sua morfologia e/ou função destacam-se: *Ureaplasma urealyticum*, *Chlamydia trachomatis* e *Mycoplasma genitalium*, que provocam uretrites em aproximadamente 70% dos homens infetados (26,28).

As uretrites por *C. trachomatis* podem ainda ser agravadas por inflamações da próstata, como é o caso da prostatite crónica em que apenas 10% dos homens infetados apresenta um quadro clínico de doença crónica. Em múltiplos estudos independentes verificou-se que indivíduos com infeção por *C. trachomatis* apresentam alterações nos parâmetros do espermograma e conseqüente deterioração da qualidade do sémen, como baixa concentração de esperma, motilidade reduzida e morfologia alterada. Estas alterações estão associadas a fenótipos de oligozoospermia, astenozoospermia e teratozoospermia (4,27,26,33,34). Num outro estudo, Hosseinzadeh *et al.* (2004) fez uma avaliação dos parâmetros do sémen de homens com infeções assintomáticas verificando-se que pacientes positivos para *C. trachomatis* apresentam uma maior concentração de leucócitos no ejaculado. No entanto, não foram observadas quaisquer diferenças significativas entre casos e controlos no que se refere à motilidade e concentração dos espermatozoides (37).

A gonorreia (infeção por *N. gonorrhoeae*) manifesta-se por uma inflamação da uretra e próstata que permanece como assintomática em cerca de 10% dos homens infetados e pode surgir em conjunto com infeções por outros patogénicos como a *Chlamydia* (33,38). Se a infeção não for tratada adequadamente, o quadro clínico pode evoluir para uma obstrução do epidídimo que, no caso de ser bilateral, resulta numa situação de azoospermia (4).

As espécies *U. urealyticum* e *M. genitalium*, apesar de colonizarem naturalmente a uretra, têm sido reconhecidas como agentes de DST responsáveis por vários tipos de infeções genitais com efeitos etiológicos importantes na infertilidade masculina (39,40). Concretamente, no que diz respeito ao microrganismo *U. urealyticum*, trata-se de uma espécie comensal do sistema urogenital inferior de homens e mulheres sexualmente ativos (28) que em situações infeciosas alteram várias características do sémen tais como a viscosidade, pH, concentração (oligozoospermia), motilidade (astenozoospermia),

densidade e morfologia dos espermatozoides (teratozoospermia) (41). Esta espécie tem ainda um potencial redutor no ejaculado que torna o esperma mais vulnerável a danos peroxidativos. Para além disso, os géneros de *Ureaplasma* têm ainda a capacidade de produzir fosfolipases A e C que influenciam alterações na composição lipídica das membranas, provocando perda de integridade e aumento da permeabilidade membranar com efeitos deletérios para o DNA dos espermatozoides (7,32).

Em relação a *M. genitalium*, este agente patogénico é sugerido como um fator de risco no desenvolvimento de processos inflamatórios no sistema urogenital, sendo uma causa importante de uretrites em 25% dos casos, apesar de se apresentar frequentemente associado a um quadro clínico assintomático (42,43). O *M. genitalium* tem capacidade de se ligar aos espermatozoides, causando aglutinação do esperma e perda de mobilidade, sendo assim associado a casos de astenozoospermia (44).

2.2.2. Consequências reprodutivas das infeções urogenitais de origem viral

A relevância de infeções crónicas virais como fator etiológico de infertilidade masculina tem sido pouco explorada, no entanto, alguns vírus transmitidos sexualmente são capazes de causar lesões no sistema reprodutivo. Entre eles destacam-se: os vírus do herpes *simplex* 1 e 2 (HSV-1/2); o citomegalovírus (CMV) e o vírus do papiloma humano (HPV). Para além do risco de transmissão horizontal, estes vírus podem ainda provocar alterações no estado geral de saúde do indivíduo pelo efeito da internalização do material genético vírico (DNA ou RNA) e, indiretamente, pelo tratamento dos pacientes com antivirais e antirretrovirais que podem igualmente induzir danos ao nível testicular (35).

Embora ainda exista pouca informação sobre as repercussões das infeções por HPV na fertilidade, alguns estudos apontam para uma influência negativa nos parâmetros do sêmen, no processo de fertilização e na taxa de abortos espontâneos. A maioria das infeções por HPV são latentes, ou seja, não são diagnosticadas e são geralmente consideradas como transientes e sem consequências clínicas por não apresentarem sintomas (33). De acordo com a maior ou menor associação com o cancro cervical, o HPV tem sido subdividido em grupos genotípicos de alto e baixo risco e estudos recentes, sugerem que os subtipos mais agressivos do vírus possam também induzir alterações na mobilidade e morfologia dos espermatozoides, com um possível papel em casos de astenozoospermia e teratozoospermia (45). Para além disso, o vírus parece alojar-se na zona equatorial da cabeça ou cauda dos espermatozoides, podendo diminuir a função e capacidade do acrossoma e impedir a fusão dos gâmetas na altura da fecundação. Os genótipos que têm sido diretamente relacionados com casos de infertilidade são HPV-45,

-52, -18, -59 e -16. No entanto, de um modo geral, todos os parâmetros de qualidade do sêmen parecem sofrer algum tipo de alteração pelo HPV, mesmo que mínima ou sem efeito direto na fertilidade (35,45).

À semelhança do HPV, também a informação sobre o vírus HSV do tipo 1 e 2 é limitada mas, de acordo com um estudo de Monavari *et al.* (2013) o seu DNA vírico tem sido detetado com alguma frequência entre inférteis (1). Além disso, a presença do vírus HSV-1/2 parece estar associada a uma diminuição da função da próstata e do epidídimo e a perda de qualidade do fluido seminal, particularmente em situações de oligozoospermia e astenozoospermia (1,35). Em comparação com outros agentes patogénicos, apesar da percentagem de positivos para o vírus ser relativamente mais baixa, os seus efeitos nos parâmetros de qualidade do esperma parecem ser mais graves e irreversíveis (4,46).

2.2.3. Consequências reprodutivas das infeções provocadas por protozoários

Um dos protozoários causadores de DST é *T. vaginalis*, agente responsável pela tricomoníase, uma infeção que afeta o epitélio escamoso do sistema genital e tende a ser assintomática, embora em cerca de 30% dos casos possa causar uretrites. A relação entre *T. vaginalis* e a infertilidade é controversa mas alguns estudos relatam associações entre a infeção provocada por este agente e a reduzida viabilidade dos espermatozoides em situações de teratozoospermia (4,33).

Tabela 1.5. Agentes patogénicos de DST mais prevalentes e patologias associadas. (Adaptado de Gimenes *et al.* 2014) (29).

| Patogénico de DST | Local de infeção e patologia associada | | | | | Danos nos espermatozoides | | | |
|-----------------------|--|------------------|------------|-------------|------------|---------------------------|-------------------------|------------|------------|
| | Uretra | Vesícula seminal | Próstata | Epidídimo | Testículos | Dano no DNA | Contagem espermatozoide | Mobilidade | Morfologia |
| Bactérias | | | | | | | | | |
| <i>Neisseria g.</i> | Uretrite | Vesiculite | Prostatite | Epididimite | Orquite | - | Diminuída | - | - |
| <i>Chlamydia t.</i> | Uretrite | - | Prostatite | Epididimite | Orquite | + | Oligo | Asteno | Terato |
| <i>Ureaplasma u.</i> | Uretrite | - | Prostatite | Epididimite | - | + | Oligo | Asteno | Terato |
| <i>Mycoplasma g.</i> | Uretrite | - | Prostatite | - | - | - | - | Asteno | - |
| Vírus | | | | | | | | | |
| HPV | DNP | - | - | DNP | DNP | + | Oligo | Asteno | Terato |
| HSV | - | - | Prostatite | Epididimite | DNP | - | Diminuída | Asteno | - |
| Protozoários | | | | | | | | | |
| <i>Trichomonas v.</i> | Uretrite | - | Prostatite | Epididimite | DNP | - | Possível ausência | - | Terato |

Legenda: (-) organismo não detetado ou sem alteração; (+) com alteração; DNP – organismo detetado mas sem patologia associada; Oligo – oligozoospermia; Terato – teratozoospermia; Asteno – astenozoospermia.

3. Microbioma na doença humana

O microbioma é definido como a comunidade de microrganismos comensais, simbióticos e/ou patogénicos, que coexistem num nicho ecológico como um qualquer órgão de um ser vivo (23). Nos últimos anos, o estudo do microbioma humano tem vindo a despertar um interesse crescente na comunidade científica pelo seu impacto na saúde e suscetibilidade à doença.

O corpo humano e os seus diferentes órgãos apresentam populações significativas de bactérias, como é o caso da cavidade oral, pele, nasofaringe, os sistemas urogenital e respiratório e outras regiões anteriormente consideradas como estéreis. Nestes locais, os microrganismos podem estar presentes por longos períodos de tempo, sendo considerados endémicos, ou podem, pelo contrário, ser transientes (47). De um modo geral considera-se que cada zona do corpo comporta diferentes comunidades de espécies microbianas que coexistem no hospedeiro numa relação mutualista ou comensal e em que as diferentes espécies de microrganismos são altamente dependentes das condições ambientais e de fatores intrínsecos ao hospedeiro (48).

Neste âmbito, os recentes avanços científicos e tecnológicos têm possibilitado o estudo do corpo humano como um superorganismo resultante da interação entre o organismo humano *per se* e as diversas comunidades de microrganismos que o colonizam. De facto, muitos aspetos do bem-estar humano parecem ser influenciados pelo microbioma, como acontece, por exemplo, com o sistema reprodutor feminino em que o microbioma vaginal parece desempenhar um papel importante na prevenção de doenças urogenitais. Esta proteção é, em larga parte, conferida por bactérias produtoras de ácido láctico, maioritariamente do género *Lactobacillus* (47). Neste caso concreto, o efeito de proteção está correlacionado com a diminuição do pH induzida pela produção de ácido, pela libertação de componentes bacteriostáticos e bactericidas e por exclusão competitiva de outras espécies de microrganismos (48).

Neste contexto, a sequenciação do gene 16S do RNA ribossomal representa uma importante ferramenta molecular no estudo do microbioma humano, dada a ampla capacidade de discriminação de diferentes famílias e/ou géneros de bactérias dentro de uma única comunidade bacteriana (49). Concretamente, o gene 16S contém nove regiões hipervariáveis (V1-V9) que, pela sua larga diversidade e divergência da sequência de DNA, permitem realizar uma identificação de múltiplos microrganismos, sendo a sua análise globalmente utilizada na caracterização do microbioma humano e de outras comunidades de bactérias. Mais especificamente, as regiões hipervariáveis do gene 16S são delimitadas por segmentos conservados que possibilitam a amplificação de sequências alvo por técnica

de PCR (*polimerase chain reaction*) através da utilização de *primers* universais (50). A título de exemplo, esta metodologia foi já previamente aplicada aos estudos do microbioma da pele, cavidade oral, tratos gastrointestinal e vaginal, a qual revelou, em todos os casos, uma diversidade surpreendente de comunidades bacterianas. Por sua vez, acredita-se que estes microbiomas possam estar alterados numa diversidade de condições patológicas como a obesidade, doenças inflamatórias do intestino, doença de Crohn e vaginose bacteriana (51).

3.1. Microbioma no sistema reprodutor masculino

Como descrito anteriormente, diversas análises microbiológicas do sémen e também da urina têm sido aplicadas no contexto da infertilidade masculina, tendo-se verificado, em múltiplas circunstâncias, a presença de infeções por diferentes microrganismos patogénicos (16,23). Assim, de forma a melhor compreender o impacto das diferentes infeções do sistema urogenital na infertilidade masculina, foram já realizados alguns estudos do microbioma do plasma seminal, quer no que se refere a espécies bacterianas residentes comensais, quer a espécies patogénicas transitórias (16).

Embora os poucos estudos existentes no sistema reprodutor masculino apontem para uma contaminação bacteriana mais frequente nos indivíduos inférteis que nos controlos, permanece por esclarecer se a presença de um determinado microrganismo no sémen pode ser encarada como uma verdadeira infeção e como um fator de risco diretamente implicado na infertilidade masculina ou se, contrariamente, a presença de certos microrganismos poderá, em determinados casos, ser um fator tolerado, ou até protetor, da função reprodutiva do homem (3,16).

3.1.1 Comunidades bacterianas no sémen e fenótipos de infertilidade masculina

Atualmente, os microrganismos encontrados no sistema urogenital masculino têm sido associados com padrões alterados do espermograma, especialmente no que diz respeito à motilidade, função mitocondrial e integridade do DNA. Em estudos anteriores foram identificados através de metodologias experimentais (culturas bacterianas e sequenciação do gene 16S) diversos microrganismos (Tabela 1.6), dentro dos quais se incluem as espécies: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *U. urealyticum*, *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*, *M. hominis*, *Candida albicans* e *T. vaginalis*, alguns dos quais reconhecidos como agentes de DST (ver secção 2) (16). No entanto, diversos estudos

reportam ainda a presença de outros géneros de bactérias no fluido seminal sem, contudo, estabelecer uma causa-efeito na qualidade do sémen, ou no seu papel patofisiológico, no contexto das infeções transmitidas por via sexual e na infertilidade masculina (16,52). Na tabela 1.6 são enumerados os microrganismos com maior prevalência em amostras de sémen, provenientes de diferentes estudos independentes (3,16,23,25,51,53-55). Salienta-se que alguns destes microrganismos parecem ter um papel negativo nos parâmetros do espermograma e, foram por isso correlacionados com fenótipos de infertilidade, enquanto outros julga-se coexistirem na flora do sistema reprodutor podendo, por vezes, estar correlacionados com o desenvolvimento de infeções oportunistas (3,16,44).

Numa publicação recente, Weng *et al.* (2014) realizaram uma avaliação das comunidades bacterianas presentes no sémen, por sequenciação do gene 16S, na qual identificam os géneros *Lactobacillus*; *Pseudomonas*; *Prevotella*; *Gardnerella*; *Rhodanobacter*; *Streptococcus*; *Finnegoldia* e *Haemophilus* como os mais abundantes (3).

Tabela 1.6. Géneros e espécies de microrganismos mais abundantes no sémen (3,16,25,53,54,55).

| Espécies/Géneros de bactérias mais comuns no sémen | | |
|--|---------------------------------|------------------------------|
| <i>Peptoniphilus</i> | <i>Corynebacterium sp.</i> | <i>Streptococcus sp.</i> |
| <i>Veillonella sp.</i> | <i>Staphylococcus sp.</i> | <i>Pseudomonas sp.</i> |
| <i>Prevotella bivia</i> | <i>S. aureus</i> | <i>Haemophilus</i> |
| <i>Bacteroides ureolyticus</i> | <i>S. haemolyticus</i> | <i>Bacillus sp.</i> |
| <i>Anaerococcus</i> | <i>Campylobacter</i> | <i>Gardnerella vaginalis</i> |
| <i>Clostridiales</i> | <i>Enterococcus sp.</i> | <i>Pasteurella</i> |
| <i>Finnegoldia</i> | <i>Lactobacillus</i> | <i>E. coli</i> |
| <i>Prevotella</i> | <i>Bifidobacterium sp.</i> | <i>Sarcina</i> |
| <i>Varibaculum</i> | <i>Clostridium bifermentans</i> | <i>Actinomyces sp.</i> |

Conforme sistematizado na figura 1.5, as principais diferenças observadas por Weng *et al.* entre o grupo controlo (indivíduos sem alterações no espermograma) e os casos de infertilidade (pacientes com alterações no espermograma), concentram-se na maior abundância relativa dos géneros *Lactobacillus*, *Gardnerella*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus* nos controlos, e dos géneros *Prevotella*, *Finnegoldia*, *Corynebacterium* e *Haemophilus* nos casos de infertilidade. De acordo com este estudo, o género *Lactobacillus* parece representar uma maior proporção do microbioma e as diferenças de frequência entre os dois grupos são apontadas como correlacionadas com um possível papel probiótico do género *Lactobacillus*, capaz de manter a qualidade do sémen e prevenir a

proliferação de géneros oportunistas como *Prevotella*, *Haemophilus* e *Pseudomonas*. Para além destas conclusões, o mesmo estudo revelou ainda associações entre a presença de diferentes géneros e determinados parâmetros do sémen, como o volume de ejaculado e a concentração e morfologia dos espermatozoides, sugerindo que a qualidade do sémen está altamente correlacionada com a existência de certas comunidades bacterianas (3).

A. Controlos

B. Casos

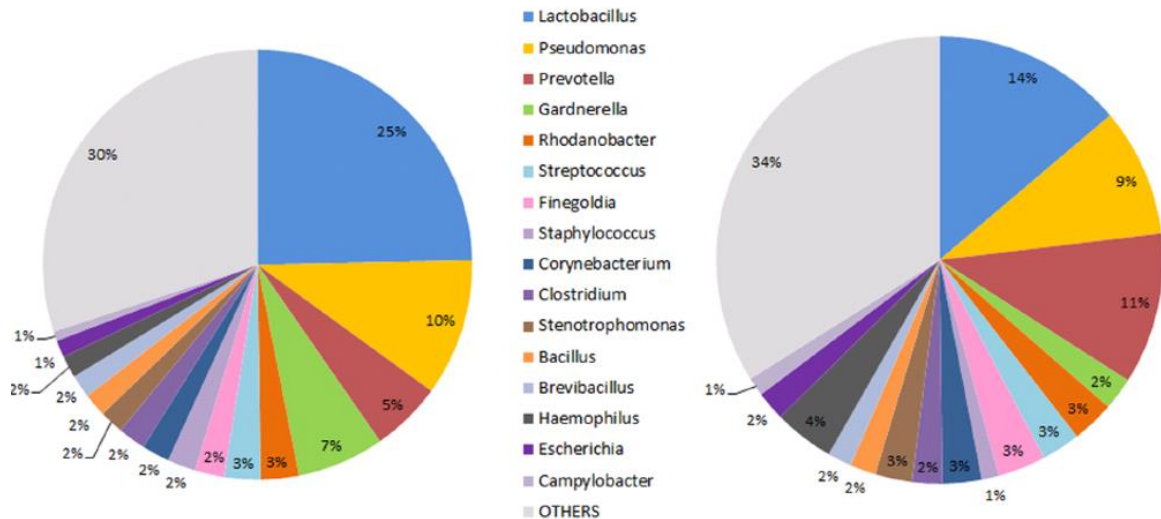


Figura 1.5. Géneros de bactérias mais abundantes em controlos (a) e casos de infertilidade (b) (Adaptado de Weng *et al.* 2014) (3).

Genericamente, estes e outros estudos realizados para o sistema urogenital masculino parecem indicar os géneros *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Finegoldia*, *Gardnerella*, *Pseudomonas*, diferentes espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa, algumas bactérias anaeróbicas (*Bacteroides sp*, *Bifidobacterium sp* e *Propionibacterium sp*) e espécies de *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, como os mais abundantes nas comunidades do sémen em geral, podendo alguns destes organismos estar envolvidos na proteção contra o efeito adverso de outros géneros de bactérias (3,16,25,32,53-55).

De um modo geral, os diferentes estudos parecem apontar para uma composição variável das comunidades bacterianas, que pode diferir de indivíduo para indivíduo e entre grupos populacionais (3,16,32). Na grande maioria dos casos desconhece-se a origem dos géneros de bactérias encontrados no sémen e se estes são transientes ou persistentes. Sabe-se, no entanto, que algumas das bactérias encontradas no sémen foram também isoladas de comunidades bacterianas vaginais, o que indica uma provável transmissão por via sexual e uma preponderante influência dos parceiros na composição do microbioma seminal (16,23).

A relação causa-efeito entre a contaminação do sémen, o desenvolvimento de infecções bacterianas e a infertilidade masculina continua como um tópico em debate, dificultada pela observação de determinados géneros de bactérias em amostras de sémen de homens inférteis em proporções semelhantes às verificadas em casos controlos, tornando complexa a significância clínica da presença de bactérias no sémen. Contudo, foi já demonstrado que a simples presença de bactérias não residentes com efeitos patogénicos pode, de alguma forma, comprometer a qualidade dos parâmetros do espermograma, sendo que a maioria dessas bactérias com efeito negativo são originárias do sistema urinário dos pacientes ou são transmitidas por via sexual (23,52).

| 2. Objetivos

2. Objetivos

Avaliar a prevalência dos principais agentes de doenças sexualmente transmissíveis (DST) *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, herpes vírus *simplex* 1 e 2 (HSV1/2), *Ureaplasma urealyticum* e vírus do papilloma humano (HPV), em casos de infertilidade, com diversas alterações dos parâmetros seminais (número, motilidade, morfologia dos espermatozoides e viscosidade) e controlos.

Obter uma descrição detalhada das comunidades bacterianas presentes no plasma seminal em indivíduos Portugueses e identificar outros microrganismos, que não associados com DST, possivelmente correlacionados com os diferentes fenótipos de infertilidade, asteno, oligo, teratozoospermia e hiperviscosidade.

3. Materiais e Métodos

3.1. Amostras biológicas

A amostragem do presente estudo compreendeu um total de 175 amostras de plasma seminal de indivíduos portugueses, recolhidas em duas clínicas de reprodução médica assistida (Centro de Genética da Reprodução Prof. Alberto Barros e Centro de Procriação Medicamente Assistida). Todas as amostras foram recolhidas com consentimento informado e acompanhadas por um registo de alguns parâmetros do espermograma, nomeadamente: parâmetros de liquefação, viscosidade, número de espermatozoides, motilidade e morfologia. Indivíduos cujo espermograma não apresentava alterações em qualquer um destes parâmetros foram considerados como controlos, pelo contrário, os pacientes com alterações desses mesmos parâmetros foram agrupados em diferentes fenótipos de infertilidade. Assim, a amostragem inclui 145 casos inférteis com fenótipos de oligozoospermia, astenozoospermia, hiperviscosidade e/ou teratozoospermia, e 30 amostras controlos (Tabela 3.1).

Tabela 3.1. Diferentes fenótipos observados nas amostras de casos de infertilidade.

| Fenótipo | Definição* | % Casos inférteis (n=145) |
|-------------------------|--|---------------------------|
| Astenozoospermia | Motilidade reduzida <25% motilidade rápida ou progressiva lenta | 64,8% (94) |
| Oligozoospermia | Baixa concentração de espermatozoides <20 milhões/mL | 40,7% (59) |
| Hiperviscosidade | Filamento > 2 cm | 38,6% (56) |
| Teratozoospermia | Morfologia alterada/anormal <5% espermatozoides normais | 63,5% (92) |

* valores de referência da OMS (8,9)

3.2. Extração de DNA

A extração de DNA (genómico humano, microbiano e vírico) foi realizada diretamente a partir de 200 µL de amostra de plasma seminal através de um *kit* comercial “QIAamp DNA mini *kit*” (Qiagen), conforme protocolo de extração de DNA de fluidos corporais (Protocolo detalhado de extração de DNA em anexo - ver anexo II).

Após a extração, a qualidade e quantidade do DNA foram avaliadas por métodos de espectrofotometria (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis).

3.3. Detecção de agentes patogénicos por *duplex* e *multiplex*-PCR

Na deteção dos agentes patogénicos *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma genitalium*, vírus herpes *simplex* -1 e -2 (HSV-1; HSV-2) e vírus do papiloma humano (HPV), foram utilizadas técnicas de PCR e adaptadas as condições previamente descritas na literatura (22,28,38). Na tabela 3.2 são reportadas as sequências dos *primers* e tamanhos dos produtos de amplificação das reações de PCR para cada um dos agentes patogénicos analisados.

Tabela 3.2. *Primers* utilizados nas reações de PCR para a deteção de cada patogénico, respetivas sequências e tamanho aproximado dos fragmentos amplificados.

| Agente Patogénico | Sequência do <i>primer</i> (5'-3') | Produto PCR (pb) | |
|--|--|--|-----|
| HPV (Husman <i>et al.</i> 1995) | GP5 - TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC GP6 - GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC | 150 | |
| <i>Chlamydia</i> (Abusarah <i>et al.</i> 2013) | Fw - CTAGGCGTTTGTACTCCGTCA Rv - TCCTCAGGAGTTTATGCACT | 200 | |
| <i>Ureaplasma</i> (Mahony <i>et al.</i> 1997) | U8 - GATCCAACCTGGATAGGACGG U9 - GAGATAATGATTATATGTCAGGATCA | 167 | |
| <i>Mycoplasma</i> (Gimenes <i>et al.</i> 2014) | Fw - ACCTTGATGGTCAGCAAACTT Rv - CCTTTGATCTCATTCCAATCAGTA | 193 | |
| HSV-1 (Gimenes <i>et al.</i> 2014) | Fw - CTGTGGTGTTTTTGGCATCA Rv - GGTTGTGGAGGAGACGTTG | 123 | |
| HSV-2 (Gimenes <i>et al.</i> 2014) | Fw - CATGGGGCGTTTGACCTC Rv - TACACAGTGATCGGGATGCT | 249 | |
| <i>Neisseria</i> (Gimenes <i>et al.</i> 2014) | Fw - CGGCAGCATTCAATTTGTT Rv - AAAAAGCCGCCATTTTTGTA | 162 | |
| Fragmentos Controlo | <i>SERPINA1</i> (Graham <i>et al.</i> 1990) | A3 – TTCCAAACCTTCACTACCCCTGGTGATG A4 - GGGCCTCAGTCCCAACATGGCTAAGAGG | 300 |
| | <i>SERPINA1</i> (Graham <i>et al.</i> 1990) | S7 - ATCAGCCTTACAACG PIE5ZR - GAGACTTGGTATTTTGTTCATC | 190 |

Tendo em conta as temperaturas de hibridação descritas para a amplificação de cada fragmento, o tamanho previsto e a sua separação em gel de poliacrilamida (eletroforese de DNA, referido na secção 3.3.2), as reações de PCR foram agrupadas em duas reações *multiplex* e três reações *duplex*. As reações de PCR em *duplex* compreenderam a deteção de HPV, *Ureaplasma* ou *Chlamydia*, conjuntamente com um fragmento controlo de amplificação do genoma humano (*SERPINA1*), com cerca de 300 pb (A3,A4) no caso das reações da *Chlamydia* e *Ureaplasma* e um fragmento de 190 pb (S7,PIE5Z-R) no caso do HPV. As reações *multiplex*-PCR foram otimizadas para detetar, em simultâneo, *Neisseria*

com HSV-2 ou *Mycoplasma* com HSV-1, usando o fragmento controlo de amplificação do genoma humano de 300 pb. Nas reações de PCR para detecção de HPV, *Ureaplasma* e *Mycoplasma* + HSV-1, foi utilizado um *kit* comercial “2x KAPA Taq ReadyMix” (KapaBiosystems), enquanto que para a detecção da *Chlamydia* e *Neisseria* + HSV-2 utilizou-se um outro *kit* comercial “Qiagen Multiplex PCR kit” (Qiagen) específico para reações de amplificação múltipla (*multiplex*-PCR). Em algumas das reações foi necessária a adição de 0,4 µL de Cloreto de Magnésio (MgCl₂), para uma concentração final de 3 mM, ou a adição de solução Q[®] (Qiagen) de modo a facilitar a amplificação dos fragmentos em amostras de DNA em que as moléculas correspondentes aos agentes patogénicos se esperariam encontrar em concentrações muito baixas. Em qualquer uma das reações de PCR, as temperaturas e tempos de desnaturação, hibridação e extensão foram otimizadas tendo em conta as características dos *primers*. Por cada amostra de DNA, cada reação, *multiplex* ou *duplex*, foi realizada em triplicado de forma a reduzir o número de falsos negativos e apurar a consistência dos resultados. As condições de PCR para cada uma das reações bem como as temperaturas e ciclos usados no termociclador estão descritas no anexo III.

3.3.1. Controlos positivos de agentes patogénicos

Para controlar as reações de PCR para cada um dos agentes patogénicos testados foram utilizadas amostras de DNA positivas. Estas amostras, com a exceção do HPV, foram fornecidas pela Doutora Maria José Borrego (Coordenadora do Laboratório Nacional de Referência das Infecções Sexualmente Transmissíveis do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge). Os controlos para *Chlamydia* (L2-434) e *Neisseria* eram amostras de DNA de estirpes de referência e os controlos para os restantes patogénicos correspondiam a DNA extraído de amostras biológicas (exsudados ou urinas) positivas. O controlo para HPV foi obtido por extração do DNA das células humanas HeLa (cérvis carcinoma associado com HPV18) através da utilização do mesmo *kit* referido no ponto 3.2 e partindo de uma suspensão das células previamente mantidas em cultura.

3.3.2. Eletroforese de DNA em gel de poliacrilamida

Todos os produtos de PCR foram separados por electroforese em gel de poliacrilamida 9% e visualizados através de uma coloração com nitrato de prata (protocolo de preparação do gel no anexo IV-A). As amostras em que se verificou a amplificação do fragmento de interesse foram consideradas como positivas, pelo contrário, as amostras em que apenas foi detetado o controlo humano foram consideradas como negativas. Todos os

resultados positivos e/ou negativos foram analisados e comparados mediante a presença no gel dos produtos de PCR resultantes da amplificação das amostras controle para cada um dos agentes patogénicos.

3.3.3. Purificação dos produtos de PCR e Sequenciação

Após a visualização no gel de poliacrilamida das bandas correspondentes aos diferentes agentes patogénicos, os casos positivos foram selecionados para sequenciação de forma a validar a presença daquele agente específico. Assim, para a reação de sequenciação, os produtos de PCR inicialmente considerados como possíveis positivos foram purificados por centrifugação em coluna com a resina *Sephacryl S-300 High Resolution* (GE Healthcare) e, posteriormente, utilizados na reação de PCR de sequenciação com o *kit ABI BigDye® Terminator cycle sequencing - versão 3* (Applied Biosystems) e um dos *primers* correspondentes (*forward* ou *reverse*, Tabela 3.2).

Após a reação de PCR de sequenciação, os produtos foram novamente purificados em colunas, desta vez com a resina *Sephadex G-50 Fine DNA Grade* (GE Healthcare), sendo posteriormente adicionados 10 µL de formamida (Hi-Di Applied Biosystems) a cada uma das amostras purificadas por centrifugação (protocolo detalhado disponível no anexo V). A análise eletroforética capilar dos produtos foi efetuada num sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram comparadas com as existentes na base de dados do NCBI, através da ferramenta *BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e posteriormente alinhadas através do programa *Geneious versão 5.2* (<http://www.geneious.com/download>). No final da análise, só foram considerados como positivos aqueles casos cuja presença do agente patogénico no sémén foi confirmada por alinhamento com uma sequência de referência.

3.4. Amplificação das regiões hipervariáveis (V3-V6) do gene 16S

De forma a obter uma visão mais global das comunidades bacterianas presentes nas amostras de indivíduos inférteis e controlos, foi realizada uma abordagem primária centrada no gene ribossomal 16S e não direcionada para um patogénico específico, como realizado na primeira fase do estudo.

As regiões hipervariáveis V3 a V6 do gene ribossomal 16S (Figura 3.1) foram amplificadas com *primers* descritos na literatura (50) (Tabela 3.3) em dois fragmentos distintos, um fragmento com cerca de 460 pb que abrange a região V3-V4 (fragmento 16S-f1) e outro de 550 pb que compreende às regiões V4-V6 (fragmento 16S-f2).

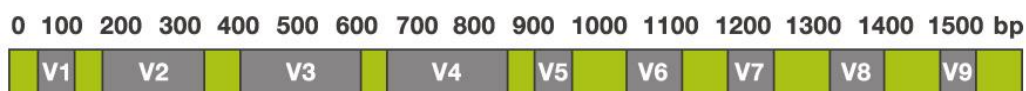


Figura 3.1. Esquema da organização do gene ribossomal 16S. A localização das regiões hipervariáveis é indicada a cinzento e as regiões conservadas a verde. (disponível em <http://www.alimetrics.net/en/index.php/dna-sequence-analysis>).

O protocolo otimizado para a amplificação das regiões V3-V6 consistiu numa mistura de reação com volume final de 15 μ L, contendo “2x *KAPA Taq ReadyMix*” (KapaBiosystems); cada um dos *primers* a 0,5 μ M (Tabela 3.3) e 3 μ L de DNA. As condições para o PCR de amplificação compreenderam:

- no caso do fragmento 16S-f1: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos de 37 ciclos - 94°C por 1 minuto, hibridação a 55°C e extensão a 72°C um minuto - com extensão final a 72°C por 20 minutos;
- no caso do fragmento 16S-f2: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos de 44 ciclos - 94°C por 1 minuto, hibridação a 45°C e extensão a 72°C um minuto - com extensão final a 72°C por 20 minutos.

Tabela 3.3. *Primers* utilizados na reação de amplificação das regiões V3-V6 do gene 16S (50).

| | |
|---------------------------------|--|
| 16S-f1 V3-V4 (464 pb) | S-D-Bact-0341-b-S-17 CCTACGGGNGGCWGCAG S-D-Bact-0785-a-A-21 GACTACHVGGGTATCTAATCC |
| 16S-f2 V4-V6 (550 pb) | S-D-Bact-0564-a-S-15 AYTGGGYDTAAAGNG S-Univ-1100-a-A-15 GGGTYKCGCTCGTTR |

3.4.1 Estudo piloto do microbioma do sêmen por clonagem e sequenciação

Com esta abordagem pretendeu-se avaliar a diversidade de géneros bacterianos dentro de cada amostra e entre casos e controlos de infertilidade. Nesta fase foram apenas investigadas 10 amostras de indivíduos inférteis e 6 amostras controlos, selecionados independentemente da presença ou ausência de algum dos patogénicos analisados na primeira abordagem (secção 3.3).

3.4.1.1. Clonagem dos fragmentos 16S-f1 e 16S-f2

Após a amplificação dos dois fragmentos do gene 16S nas amostras previamente selecionadas (10 casos e 6 controlos), os produtos correspondentes foram clonados com

o *kit* TOPO-TA *Cloning* (Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante (protocolo detalhado de clonagem disponível no anexo VI). Sumariamente, os dois fragmentos foram inseridos num vetor pCRII-TOPO (Life Technologies) e posteriormente utilizados na transformação de células bacterianas competentes TOP10 (Life Technologies). Após a dispersão e crescimento das bactérias em meio LB, verificou-se a existência de colónias das quais foram selecionadas 20-24 por cada caso ou controlo para posterior análise.

3.4.1.2. PCR das colónicas, sequenciação e identificação dos microrganismos

A inserção dos fragmentos de interesse foi confirmada com *primers* específicos do vetor (M13 *forward* e *reverse*, anexo VI-C) que emparelham aproximadamente 100 pb a jusante ou montante do local de inserção do fragmento do gene 16S. A confirmação de inserção dos fragmentos foi efetuada em gel de agarose 1,5% (120V/1h). Apenas seguiram para sequenciação os produtos positivos para a inserção do fragmento (tamanho \approx 700 pb). A sequenciação foi realizada com um dos *primers* do vetor M13 (*forward* ou *reverse*) e como descrito anteriormente (secção 3.3.3). As cerca de 20-24 sequências obtidas por amostra individual foram analisadas e tratadas de modo a excluir as regiões correspondentes ao vetor e seguidamente, a ferramenta *online SILVA 16S* (<http://www.arb-silva.de/aligner/>) foi utilizada para o alinhamento e identificação (Família e/ou Género) dos microrganismos presentes nas diferentes amostras.

3.4.2. Estudo do microbioma por técnicas de sequenciação massiva (*Next Generation Sequencing* - NGS)

Nesta abordagem pretendeu-se obter uma visão mais abrangente da composição das comunidades microbianas do sémen, através da sequenciação de um conjunto alargado de casos e controlos de infertilidade. Neste sentido foram selecionadas 89 amostras de casos inférteis com diferentes parâmetros seminais alterados (número, motilidade e morfologia dos espermatozoides e viscosidade seminal) e 29 controlos.

As condições para a amplificação das regiões V3-V6 para NGS foram adaptadas a partir do protocolo enunciado no ponto 3.4, utilizando os mesmos *primers* da tabela 3.3. No entanto, o volume final foi de 25 μ L, consistindo em 12,5 μ L de “2x KAPA Taq ReadyMix” (KapaBiosystems); 2,5 μ L da solução de *primers* correspondente ao fragmento, fragmento 1 – a 0,5 μ M ou fragmento 2 a 0,7 μ M, 6 μ L de água ultra-pura (Ambion®, LifeTechnologies)

e 4 μL de DNA. Em relação aos ciclos de amplificação, as condições usadas foram as mesmas do ponto 3.4. Após a amplificação, os produtos de PCR foram separados por electroforese em gel de agarose 1,5% (120V/1h).

3.4.2.1. Purificação dos produtos PCR, formação dos *pools* e sequenciação

Uma vez confirmada a amplificação das regiões hipervariáveis do gene ribossomal 16S em todas as 118 amostras, os produtos de PCR foram purificados por centrifugação em coluna com a resina *Sephacryl S-300 High Resolution* (GE Healthcare), de forma a remover todos os elementos que pudessem comprometer a quantificação do DNA (protocolo disponível no anexo V-A). Neste passo foi utilizado novamente um método de quantificação do DNA por espectrofotometria (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis).

Posteriormente, foram criados quatro *pools* (Tabela 4.4) para cada um dos fragmentos amplificados, 16S-f1 e 16S-f2, um primeiro que combinou 29 amostras dos controlos, um segundo e um terceiro que agruparam 27 e 35 casos divididos, respetivamente, pela ausência ou presença de alteração do número de espermatozoides, e um quarto *pool* que agregou 27 casos com alteração da viscosidade. Tendo em conta as concentrações obtidas foram combinados os respetivos volumes de cada amostra de forma a atingir os parâmetros necessários para a análise, uma concentração mínima de 5 ng/ μL num volume total de 40 μL . No final, oito amostras foram entregues ao serviço de sequenciação do IPATIMUP para processamento num Sequenciador Ion PGM™ System (Life Technologies™).

Brevemente, numa fase inicial, este processamento consistiu na reavaliação das concentrações de DNA dos oito *pools* (quatro para o 16S-f1 e quatro para o 16S-f2), para de seguida, preparar os quatro *pools* finais em condições equimolares de modo a produzir quatro bibliotecas para sequenciação num único *chip*. Para obter uma boa cobertura por amostra e por base, a sequenciação foi efetuada num *Ion 316 chip*, com capacidade de gerar até 3 milhões de sequências, o que corresponde neste caso a uma cobertura aproximada de 800 vezes.

3.4.2.2. Tratamento de dados: Identificação de grupos taxonómicos bacterianos

No processamento dos resultados da sequenciação massiva foram utilizadas as ferramentas *USEARCH*, *UCHIME* e *QIIME* e a base de dados *Greengenes* (56-59). Em

resumo, inicialmente foi realizado um controlo de qualidade às sequências através da ferramenta *USEARCH* (56), a qual permitiu o agrupamento de sequências com leituras únicas, as quais foram descartadas. Os restantes agrupamentos que passaram esta fase foram submetidos a uma avaliação relativa à existência de sequências quiméricas através da ferramenta *UCHIME* (57). Após esta segunda triagem, os agrupamentos remanescentes foram novamente analisados pelo *USEARCH* de modo a identificar as diferentes unidades taxonómicas (OTU) com um mínimo de 97% de identidade. De seguida a classificação taxonómica das OTUs foi realizada através da ferramenta *QIIME* (58) e da base de dados microbianos *Greengenes* (59).

3.4.2.3. Análise estatística

A avaliação da significância estatística dos resultados foi feita através dos testes estatísticos utilizados em estudos semelhantes e que melhor se adaptavam aos dados deste estudo, nomeadamente teste Z, usado na primeira parte do estudo para comparar as frequências dos agentes patogénicos entre casos e controlos, ou teste *Wilcoxon*, usado nos resultados do microbioma.

4. Resultados e Discussão

Neste estudo, foram avaliadas um total de 175 amostras de plasma seminal de indivíduos portugueses que recorreram a clínicas de reprodução médica assistida. As amostras foram classificadas de acordo com a existência de parâmetros alterados no espermograma, tendo sido definidos quatro fenótipos de infertilidade: oligozoospermia, quando se verificou uma redução do número de espermatozoides; astenozoospermia, em situações de motilidade inferior aos valores de referência; teratozoospermia, em casos de alteração da morfologia dos espermatozoides e hiperviscosidade, quando o sémen apresentou níveis de viscosidade anormais (Tabela 3.1).

Numa perspetiva geral, cerca de 38% dos indivíduos foram classificados como hiperviscosos, 40% como oligozoospermicos, 64% como astenozoospermicos e cerca de 63% como teratozoospermicos. No entanto, é importante salientar que os diferentes parâmetros alterados não são mutuamente exclusivos e, por isso, uma percentagem considerável dos casos avaliados apresenta duas ou mais alterações dos parâmetros seminais e, por esta razão, várias amostras foram incluídas em mais do que um fenótipo de infertilidade. Os indivíduos sem alterações do espermograma, ou seja, com valores entre os critérios estabelecidos como referência pela OMS (8,9), foram agrupados como controlos.

4.1. Detecção de agentes de DST no plasma seminal

Numa primeira fase do estudo foi efetuada uma pesquisa, nas amostras de sémen de casos e controlos, dos seguintes agentes patogénicos reconhecidos como causadores de doenças sexualmente transmissíveis (DST): *Chlamydia trachomatis*; *Neisseria gonorrhoeae*; *Ureaplasma urealyticum*; *Mycoplasma genitalium*; vírus herpes *simplex*-1 e -2 (HSV-1; HSV-2) e vírus do papiloma humano (HPV).

O diagnóstico destes agentes de DST é frequentemente realizado através de técnicas de PCR que, comparativamente com os métodos de culturas bacterianas, para além de ser um processo pouco moroso que não requer procedimentos invasivos para a colheita da amostra, tem a capacidade de detetar a presença de agentes patogénicos mesmo que a sua representatividade na amostra seja diminuta (28,69,73). Neste trabalho, após a amplificação da região alvo de cada agente patogénico por técnicas de PCR, foi realizada uma primeira avaliação por separação eletroforética em gel de poliacrilamida, na presença de outros produtos de PCR de amostras de referência de cada agente de DST. Na figura 4.1 são apresentados alguns exemplos de géis de poliacrilamida, com resultados positivos e negativos, para cada uma das reações de *duplex* e *multiplex*-PCR realizadas.

Apesar deste tipo de técnica utilizar *primers* específicos para cada agente patogénico, nem sempre os resultados obtidos foram os mais precisos, deste modo, e de forma a reduzir o possível impacto de fatores internos e externos que pudessem afetar a reação de PCR, a amplificação das diferentes regiões alvo foi realizada em triplicado (Tabela 4.1).

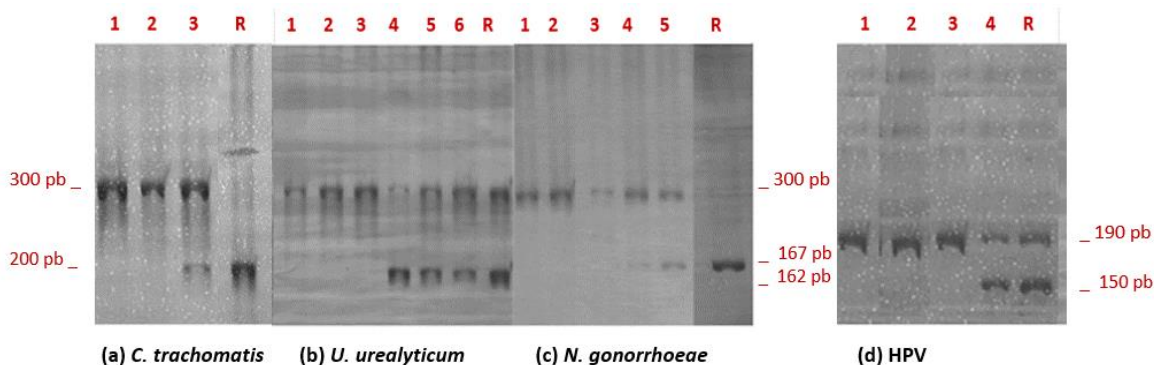


Figura 4.1. Separação eletroforética em gel de poliacrilamida dos diferentes fragmentos amplificados por *duplex* e *multiplex*-PCR; (a) Detecção de *C. trachomatis* (200 pb), amostra positiva: 3; (b) Detecção de *U. urealyticum* (167 pb), amostras positivas: 4 a 6; (c) Detecção de *N. gonorrhoeae* (162 pb), amostras positivas: 4 e 5; (d) Detecção de HPV, amostra positiva: 4; R: amostra de referência. Bandas do fragmento de controlo humano *SERPINA1* a 300 pb e 190 pb.

Numa primeira abordagem, foram considerados como resultados positivos todas as amostras que, na separação eletroforética em gel de poliacrilamida, apresentavam uma banda de mobilidade equivalente à amostra de referência para cada um dos agentes patogénicos (Figura 4.1). No entanto, conforme se pode verificar pelos valores globais da tabela 4.1, o número de positivos é largamente variável entre as reações de PCR realizadas exatamente sob as mesmas condições. Basicamente, estas variações refletem a falta de consistência do método e a importância de desenvolver outras estratégias experimentais que permitam comprovar, com maior fiabilidade, a presença/ausência de determinado agente patogénico em cada uma das amostras. Neste caso, foi realizada uma validação dos potenciais casos positivos através da sequenciação dos produtos de PCR obtidos em todos os casos em que foi possível visualizar, no gel de poliacrilamida, uma banda bem definida com tamanho aproximado à banda de referência (R).

No final desta validação, estabeleceu-se como resultado positivo apenas as amostras que, após sequenciadas e alinhadas, apresentavam uma elevada similaridade com uma sequência de referência do agente patogénico testado. Uma larga proporção de amostras consideradas inicialmente como possíveis positivos não apresentou qualquer sequência com similaridade ao agente patogénico em causa e foram, por isso, consideradas posteriormente como negativas (falsos positivos).

Tabela 4.1. Avaliação da consistência dos resultados das três reações de PCR para a detecção dos sete agentes patogênicos testados. Percentagem do número de amostras com resultados considerados positivos em pelo menos uma das reações de PCR e resultados considerados positivos em duas ou mais reações PCR (n=número de indivíduos amostrados).

| Agente patogénico | Inférteis (n=145) | | Controlos (n=30) | |
|-------------------|-------------------|--------------|------------------|-------------|
| | Total Positivos | ≥2 Positivos | Total Positivos | ≥2Positivos |
| <i>Chlamydia</i> | 74% | 23% | 73% | 33% |
| <i>Ureaplasma</i> | 13% | 10% | 10% | 10% |
| <i>Neisseria</i> | 9% | 1% | 3% | 0% |
| HSV-2 | 22% | 0% | 27% | 0% |
| <i>Mycoplasma</i> | 4% | 0% | 17% | 3% |
| HSV-1 | 7% | 1% | 0% | 0% |
| HPV | 89% | 52% | 100% | 63% |

No final desta avaliação, para os casos de infertilidade, verificou-se que cerca de 57% dos indivíduos (n=83) apresentavam pelo menos um resultado positivo, enquanto os restantes 62 indivíduos (43%) não demonstraram a existência de qualquer infeção provocada pelos agentes de DST testados. Nos controlos, o número de indivíduos positivos correspondeu a 53% (n=16).

Apenas os agentes patogénicos *C. trachomatis*, *N. gonorrhoeae*, *U. urealyticum* e HPV foram confirmados nas amostras de plasma seminal, em infeções simples ou em coinfeção, ou seja, em infeção conjunta de dois agentes patogénicos. Os vírus HSV-1 e HSV-2 não foram detetados em nenhuma amostra dos dois grupos, tal como o microrganismo *M. genitalium*. Nos controlos, contrariamente aos casos de infertilidade não foi detetada a presença do agente *N. gonorrhoeae*.

Na figura 4.2 estão representadas as frequências finais de cada agente patogénico nos casos e controlos de infertilidade. Os agentes *C. trachomatis* e HPV mostram níveis de prevalência equivalentes em casos e controlos (27-30%), não sendo observada qualquer diferença significativa.

Em relação à frequência de *U. urealyticum*, apesar de mais prevalente em casos de infertilidade (13%) do que nos controlos (10%), os valores não transmitem a significância necessária para afirmar uma associação direta com a infertilidade. Por sua vez, a presença de *N. gonorrhoeae* em apenas 2% (n=3) dos casos de infertilidade contra a sua ausência em controlos, também não permite estabelecer uma correlação direta entre este agente patogénico e a infertilidade. No entanto, apesar de esta diferença não ser estatisticamente

significativa ($p=0,21476$), este patogénico parece evidenciar uma tendência para ocorrer apenas em casos de infertilidade.

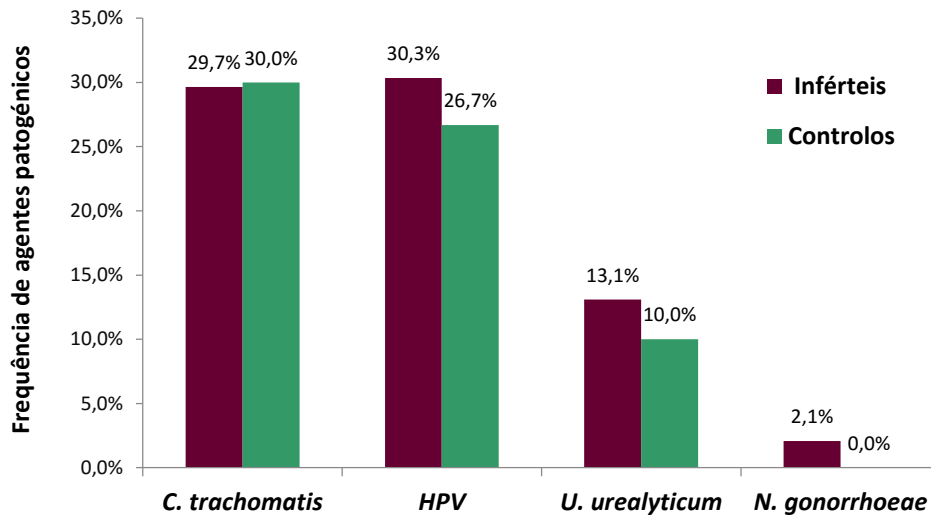


Figura 4.2. Distribuição das frequências dos quatro agentes patogénicos identificados em amostras de plasma seminal de casos de infertilidade e controlos.

No geral, os valores obtidos neste estudo para os agentes *C. trachomatis*, HPV e *U. urealyticum* não suportam uma associação com a infertilidade, uma vez que nessa condição seria de esperar uma diminuição acentuada da percentagem de amostras positivas nos controlos.

Na abordagem conjunta dos agentes de DST, cerca de 18% ($n=26$) dos casos e 13% ($n=4$) dos controlos apresentavam coinfeções por dois agentes patogénicos (Figura 4.3). Nos casos de infertilidade a coinfeção mais frequente foi por *C. trachomatis* e HPV (CT+HPV) com 9% ($n=13$), seguida por *U. urealyticum* e HPV (UU+HPV) com aproximadamente 6% ($n=8$) e, por último, *C. trachomatis* e *U. urealyticum* (CT+UU) com 2% ($n=3$). Quanto aos controlos, *C. trachomatis* + HPV foi igualmente a combinação mais frequente mas apenas detetada em três indivíduos, seguida pela coinfeção *C. trachomatis* e *U. urealyticum* presente num único indivíduo.

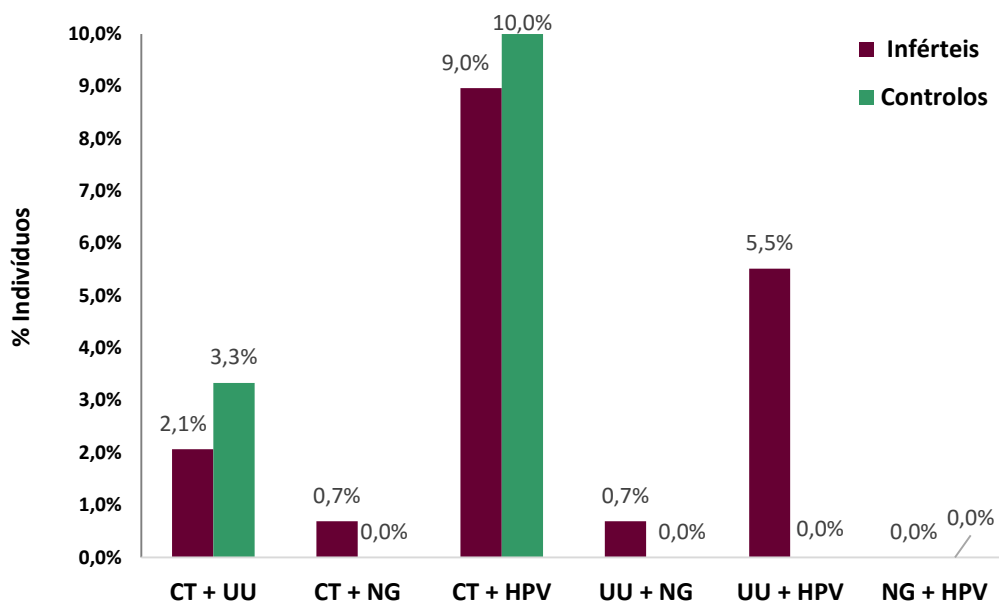


Figura 4.3. Percentagem de coinfeções por diferentes agentes patogênicos detetados em casos e controlos de infertilidade.

Neste estudo foi ainda testada a hipótese de uma possível correlação entre a presença destes microrganismos e as alterações dos parâmetros do sêmen, uma vez que a infeção por estes agentes de DST e a associação com fenótipos específicos de infertilidade tem sido estabelecida por vários estudos semelhantes (26,41,60). É importante referir que não se trata de uma associação a fenótipos puros uma vez várias amostras foram incluídas em mais do que um grupo de fenótipos de infertilidade.

Nos quatro fenótipos de infertilidade avaliados, teratozoospermia, astenozoospermia, oligozoospermia e hiperviscosidade, os agentes HPV e *C. trachomatis* apresentam prevalências entre 25-34%, muito próximas das observadas nos controlos (Figura 4.2), não sendo consequentemente registada qualquer diferença significativa. No entanto, salienta-se a prevalência ligeiramente aumentada de HPV em casos de hiperviscosidade (Figura 4.4). Os restantes agentes patogênicos detetados nas amostras de plasma seminal, *U. urealyticum* e *N. gonorrhoeae*, apresentam pequenas variações entre fenótipos, aparentando, contudo, serem mais prevalentes em condições de astenozoospermia e oligozoospermia, respetivamente. Assim, numa primeira análise geral dos resultados, a presença dos agentes *C. trachomatis* e HPV não parece suportar um possível efeito em diferentes fenótipos de infertilidade, contrariamente ao observado em estudos anteriores (22,28).

4. Resultados e Discussão

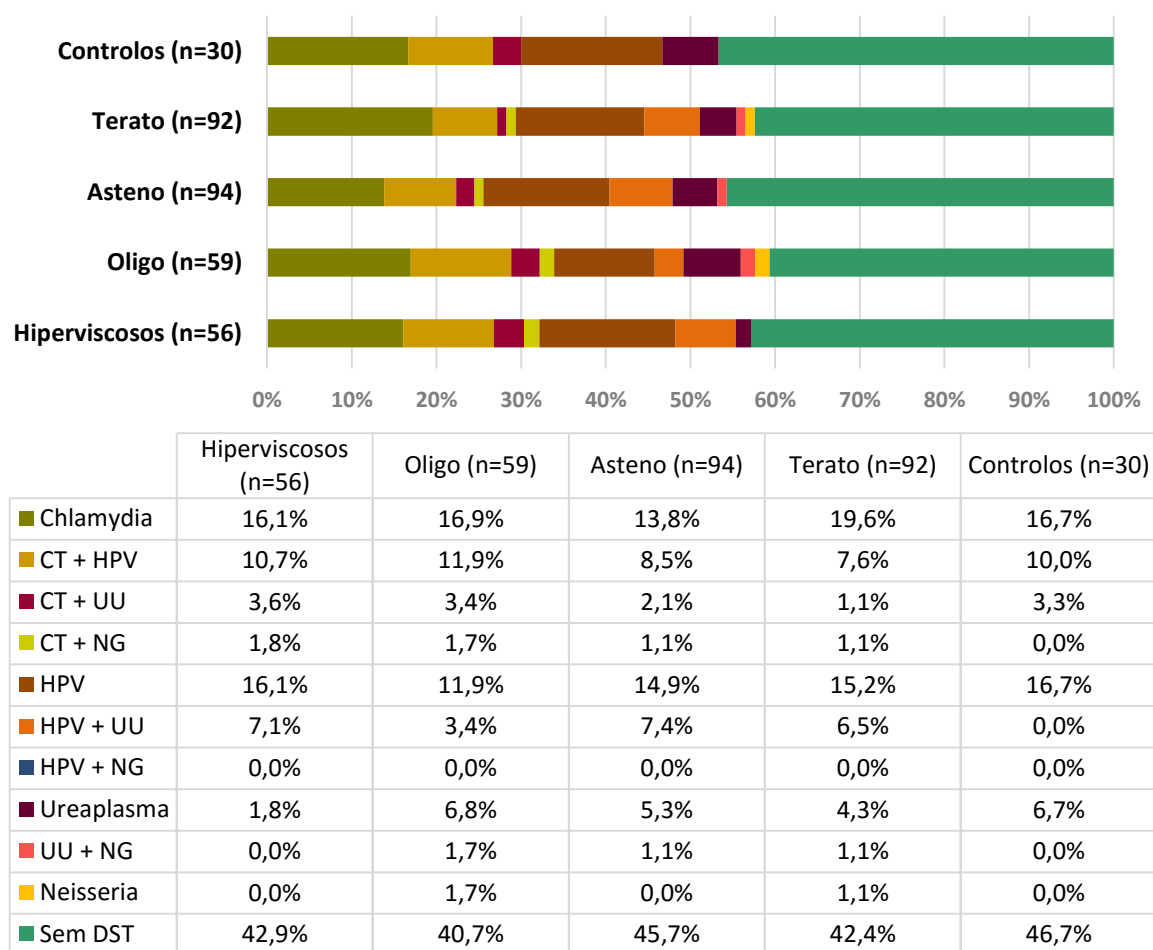


Figura 4.4. Abundâncias relativas dos diferentes agentes de DST nos quatro fenótipos de infertilidade avaliados. Abundâncias totais de cada agente patogénico calculadas pela soma das abundâncias referentes a infeções simples e coinfeções.

De facto, a infeção por *C. trachomatis*, apesar de ser uma das DST mais prevalentes na Europa, com cerca de 380.000 casos registados no ano de 2013, o seu papel exato na saúde reprodutiva masculina é ainda pouco claro (6,8,9). Alguns estudos realizados em populações asiáticas e europeias associam a presença desta bactéria com uma baixa qualidade do sémen, uma vez que indivíduos com infeções por *Chlamydia* tendem a apresentar alterações no número, motilidade e morfologia de espermatozoides (4,26,27,33,34,37,39). Apesar destas evidências apontarem *C. trachomatis* como um dos principais agentes de DST com papel na infertilidade, os resultados aqui apresentados contrariam essa hipótese dado que não foram registadas quaisquer diferenças entre casos e controlos, nem mesmo quando efetuada uma partição por fenótipo de infertilidade. Esta disparidade dos resultados observados face ao descrito na literatura pode dever-se a vários fatores, entre os quais se destacam a possível existência de diferentes estirpes, mais ou menos virulentas, que podem alterar o padrão de sintomas da infeção e os efeitos na capacidade reprodutiva e, ainda, a possibilidade da prevalência de *C. trachomatis* no

sémen ser residual e não desencadear uma propagação da infecção que provoque alterações dos parâmetros seminais (22,60). Para além disso, as infeções por *C. trachomatis* são muitas vezes apontadas como assintomáticas, impedindo uma deteção precoce da infecção, o que pode igualmente explicar a sua elevada prevalência em indivíduos controlos que, até à data, possam não ter tido manifestações da infecção, apesar da presença da bactéria (22,37).

Por outro lado, as infeções por HPV são normalmente consideradas como temporárias e desconhece-se qual o período de incubação do vírus e as consequências permanentes na capacidade reprodutiva que podem advir desta infecção (22). Numa apreciação dos resultados obtidos, apesar do vírus ser ligeiramente mais prevalente nos casos de infertilidade, e em particular no fenótipo de hiperviscosidade, não é possível estabelecer em que medida esta ocorrência poderá ter realmente um efeito negativo na fertilidade dos indivíduos infetados, uma vez que não é observada uma significância estatística. No entanto, estudos anteriores sugerem uma correlação com alterações da viscosidade e motilidade dos espermatozoides (35,45).

As infeções por *U. urealyticum* são também reconhecidas por desencadear alterações da função dos espermatozoides com efeitos na fertilidade (41,70). De acordo com outros estudos (7,32,41,61), os casos positivos para *Ureaplasma* tendem a ser mais frequentes em indivíduos com número de espermatozoides diminuído e motilidade alterada. Para este agente patogénico, embora os dados obtidos apontem para um ligeiro aumento da sua prevalência no fenótipo de oligozoospermia, este aumento não é suficiente para garantir uma possível relação causa-efeito entre a infecção por *U. urealyticum* e infertilidade.

Apesar de existirem ainda poucos estudos que tenham avaliado a relação entre a infecção por *N. gonorrhoeae* e a infertilidade masculina, o estudo atual, pela presença exclusiva deste agente em casos de infertilidade, pode sugerir uma associação deste agente com esta patologia. Em concordância com as prevalências descritas na literatura (6), nomeadamente em países Europeus onde foram identificados cerca de 50 mil casos de gonorreia em 2013, seria de esperar que o número de casos positivos fosse superior ao observado (2%), no entanto, esta menor prevalência pode dever-se ao simples facto de a infecção produzir sintomas graves que são facilmente identificados e tratados, impedindo a progressão da doença (22). Mesmo assim, a infecção parece ser mais comum nos indivíduos com oligozoospermia, reforçando a hipótese levantada anteriormente de que a bactéria *N. gonorrhoeae* pode afetar a produção de espermatozoides através de alterações

nos testículos ou no epidídimo que se refletem no número de espermatozoides disponíveis no plasma seminal (26).

Em síntese, a análise das prevalências dos agentes de DST no sêmen de casos e controlos, contrariamente ao que seria de esperar, não demonstra qualquer associação significativa com a infertilidade. O agente *Neisseria gonorrhoeae* é o único que mostra uma ocorrência exclusiva em casos, mas a sua prevalência é também relativamente baixa.

Conforme referido anteriormente, muitos autores atribuem às infeções urogenitais uma importante causa de infertilidade idiopática (22,28,44,52,60), no entanto, os resultados obtidos neste estudo parecem contrariar este facto. Uma possível explicação pode dever-se à amostragem que, para os controlos, é bastante mais limitada em relação aos casos de infertilidade. Outro fator que poderá influenciar a ausência de significância estatística prende-se com os níveis de infeção dos diferentes agentes patogénicos no sêmen dos indivíduos. Se a presença de determinado agente for apenas residual, o método de PCR, pela sua elevada sensibilidade, pode permitir a sua identificação, mesmo que o agente patogénico não seja responsável por uma infeção grave com implicações resultantes na qualidade do sêmen. O facto de os agentes de DST poderem encontrar-se em concentrações residuais no sêmen pode também explicar as limitações observadas no método experimental utilizado que, para além de não permitir uma avaliação quantitativa dos agentes de DST, verificou-se ser pouco reprodutível.

4.2. Estudo preliminar do microbioma do fluido seminal em homens saudáveis e inférteis

O conhecimento do microbioma humano e o seu papel na avaliação do estado de saúde e do desenvolvimento de diferentes patologias tem vindo a despertar um interesse crescente na comunidade científica. Assim, de forma a estabelecer uma possível associação entre a infertilidade masculina e a presença de microrganismos patogénicos, para além daqueles reconhecidos como principais agentes de DST, numa segunda fase do estudo foi realizada uma avaliação das comunidades microbianas do sémen num pequeno subgrupo de casos e controlos. Neste sentido foram selecionadas 10 amostras de indivíduos inférteis e 6 controlos para análise do microbioma através da amplificação do gene 16S, subsequente clonagem e sequenciação. Na tabela 4.2 estão apresentadas as principais características das amostras investigadas neste estudo piloto.

Tabela 4.2. Características fenotípicas de cada uma das amostras clonadas e respetivos resultados obtidos na pesquisa de agentes bacterianos de DST.

| Grupo | Características fenotípicas das amostras e prevalência de agentes de DST | | | | | | | | | |
|-----------|--|------------|-----------------|-------------|----------|--------|----------------------|-----------------|--------|-----------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| Inférteis | A T + CT | A T O - | A T O H + UU | A H + CT | A O - | H - | T O H + CT, UU | A H + CT, UU | T - | T + UU |
| Controlos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | | | | |
| | - | + CT | + CT | + UU | + CT | - | | | | |

A: astenozoospermia; T: teratozoospermia; O: oligozoospermia; H: hiperviscosidade; - DST negativos; + DST positivo; CT – *C. trachomatis*; UU – *U. urealyticum*.

Na caracterização dos taxa bacterianos presentes no plasma seminal, foi realizada a amplificação de dois segmentos do gene 16S, abrangendo as regiões hipervariáveis V3-V4 e V4-V6, respetivamente. Após a clonagem dos dois fragmentos foram sequenciadas entre 20 a 24 colónias por cada amostra e as respetivas sequências foram alinhadas contra as sequências de referência depositadas numa base de dados de diferentes microrganismos (SILVA 16S: <http://www.arb-silva.de/aligner/>).

De um modo geral, os resultados mostram uma diversidade de géneros bacterianos no sémen muito superior àquela registada na primeira fase do estudo. No total, foram identificados 35 géneros de bactérias, em que apenas nove foram detetados como transversais aos dois grupos, sendo os mais prevalentes: *Enterococcus*, *Peptoniphilus* e *Shigella* (Tabela 4.3), todos eles já identificados em estudos anteriores de caracterização

do microbioma seminal (3,16,25). Contudo, de um modo geral, tal como representado na figura 4.5, os controlos tendem a exibir um número de géneros superior, com 24 géneros no total das seis amostras analisadas, em contraste com apenas 20 géneros presentes em 10 casos de infertilidade (géneros identificados e respetivas frequências no anexo VII).

Tabela 4.3. Distribuição das frequências dos nove géneros transversais a casos e controlos de infertilidade.

| Género | Inférteis | Controlos |
|----------------------|-----------|-----------|
| <i>Enterococcus</i> | 46,2% | 25,6% |
| <i>Anaerococcus</i> | 5,6% | 1,6% |
| <i>Peptoniphilus</i> | 3,6% | 4% |
| <i>Streptococcus</i> | 5,1% | 1,6% |
| <i>Shigella</i> | 8,2% | 8% |
| <i>Campylobacter</i> | 0,5% | 4,8% |
| <i>Fingoldia</i> | 1,5% | 4% |
| <i>Varibaculum</i> | 0,5% | 0,8% |
| <i>Veillonella</i> | 1% | 12,8% |
| Outros géneros | 27% | 35% |

Numa análise global, e como indicado na figura 4.5, os géneros mais prevalentes no grupo de inférteis são: *Enterococcus* (46%), *Haemophilus* (8,7%), *Shigella* (8,2%), *Anaerococcus* (5,6%) e *Streptococcus* (5%). Os restantes géneros identificados nos casos apresentam frequências inferiores a 5% e perfazem apenas 20% do microbioma. Ainda em relação aos casos, em cerca de 4% das sequências não foi possível chegar à identificação do género. Considerada a baixa frequência, estas sequências foram agrupadas como uma única categoria, designada por “outros”. Neste caso, apenas o indivíduo 5 apresentou sequências inseridas neste grupo.

Em relação aos controlos, por outro lado, os géneros mais abundantes são: *Enterococcus* (25,6%), *Veillonella* (12,8%), *Morganella* (8,8%), *Shigella* (8%), *Corynebacterium* (5,6%) e *Campylobacter* (4,8%). Cerca de 34% do microbioma dos controlos é constituído por géneros de baixa abundância (<5%) e, à semelhança dos casos de infertilidade, foi incluída uma categoria de sequências agrupadas para as quais não foi possível obter a informação sobre o respetivo género, correspondendo a 5% do microbioma.

4. Resultados e Discussão

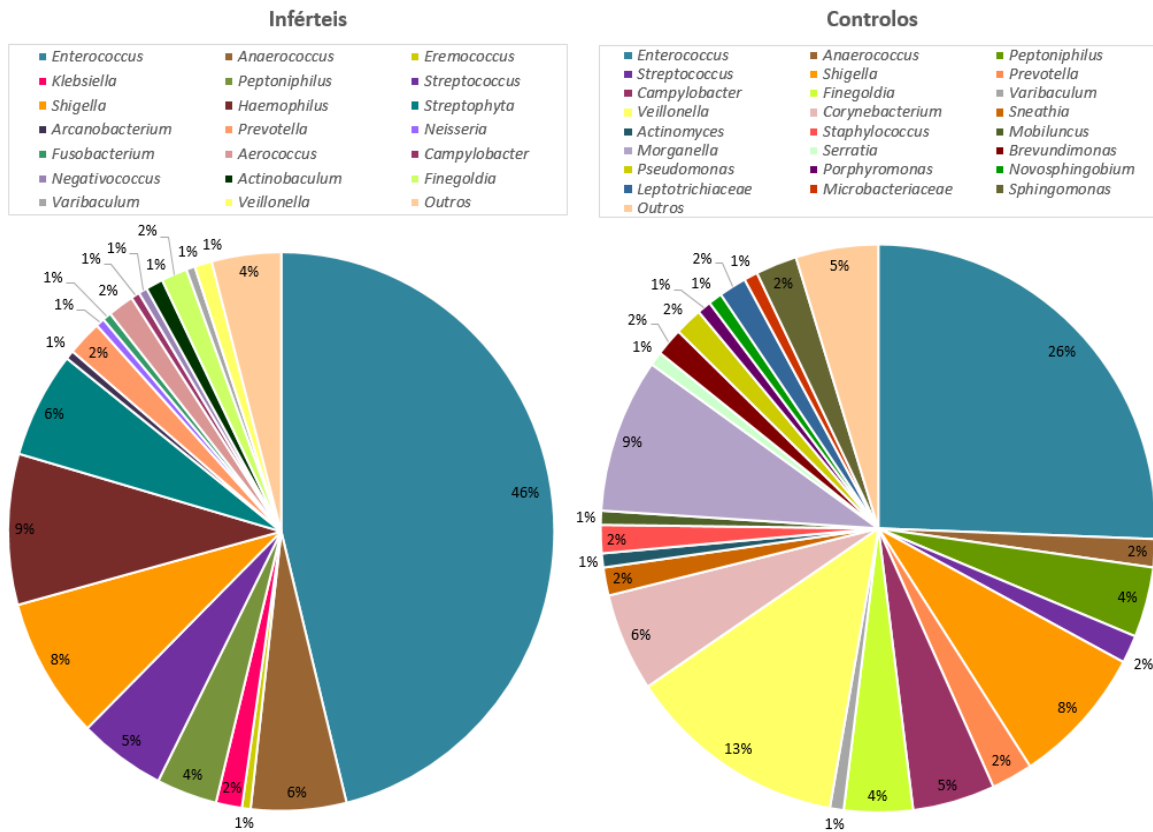


Figura 4.5. Distribuição dos 35 gêneros bacterianos mais abundantes identificados em amostras de casos e controlos de infertilidade.

Por outro lado, na análise individual das 16 amostras, verificou-se uma elevada variabilidade de gêneros, não só entre casos e controlos de infertilidade, mas também entre amostras do mesmo grupo. Nas figuras 4.6 e 4.7, cada amostra individual é representada por uma barra onde é caracterizada a abundância relativa de cada género identificado.

Nos casos de infertilidade, o género *Enterococcus* é, sem dúvida, um dos mais prevalentes, sendo comum a sete dos indivíduos analisados, no entanto, a sua abundância relativa é largamente variável entre amostras (20-90%). Relativamente ao género *Haemophilus*, a sua elevada prevalência parece dever-se, em grande parte, praticamente a um único indivíduo, o qual apresenta uma frequência relativa de mais de 80%. Já o género *Shigella*, com a terceira maior prevalência nos inférteis, apresenta frequências relativas de 20-30% em três das 10 amostras analisadas. Quanto aos géneros encontrados com frequências individuais de aproximadamente 1-2% nos inférteis, a sua presença parece ser devida quase em exclusividade à ocorrência em amostras únicas. Um caso particular corresponde ao género identificado como *Streptophyta* apenas na amostra 4 que, apesar de pertencer ao reino Plantae, em circunstâncias esporádicas pode ser também detetado em comunidades colonizadores do organismo humano (62,63).

4. Resultados e Discussão

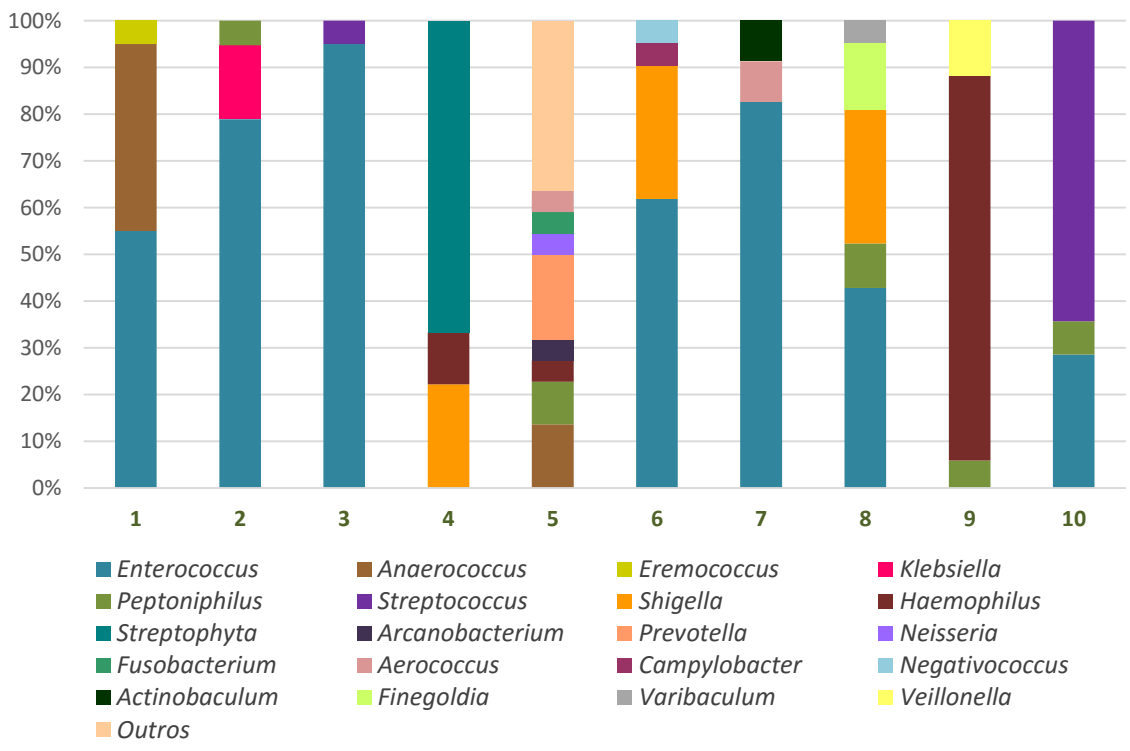


Figura 4.6. Representação gráfica da composição das comunidades bacterianas do sémen das 10 amostras selecionadas de casos de infertilidade.

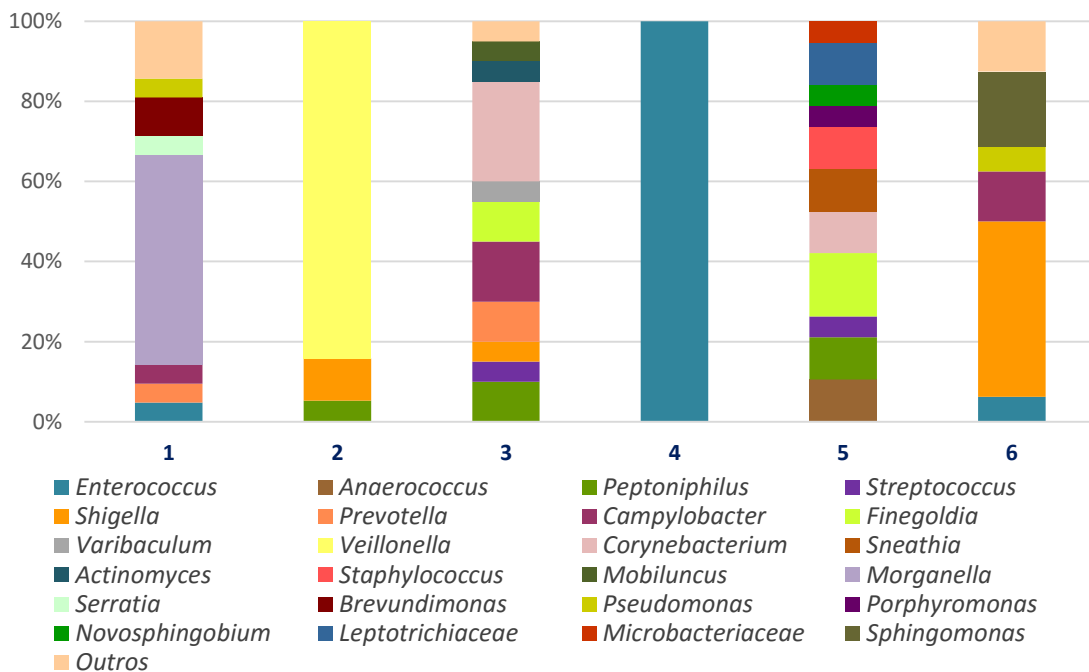


Figura 4.7. Representação gráfica da composição das comunidades bacterianas do sémen das 6 amostras selecionadas de controlos de infertilidade.

No que se refere às amostras controlos, os resultados da clonagem e sequenciação do gene 16S apontam para a existência de diferenças consideráveis entre os indivíduos, sobressaindo uma tendência para um número superior de géneros por indivíduo neste grupo. Enquanto nos casos de infertilidade, com exceção do indivíduo 5, cada amostra apresenta entre dois a cinco géneros distintos, nos controlos esse intervalo estende-se para três a 12 géneros por amostra. A única exceção nos controlos é a amostra 4 que apenas apresenta o género *Enterococcus*. Se por um lado a amostra 4 pode explicar a elevada frequência do género *Enterococcus* nos controlos, os indivíduos 3 e 5, com uma elevada diversidade taxonómica, justificam a prevalência de múltiplos géneros com frequências relativamente baixas neste grupo (1-2%).

A concordância deste estudo com o anterior (secção 4.1) é extremamente limitada, dado que os agentes de DST, *Chlamydia trachomatis* e *Ureaplasma urealyticum*, presentes em algumas das amostras analisadas (Tabela 4.2), não foram de todo detetados pelo método de clonagem e sequenciação do gene 16S. Por outro lado, a amostra 5 que não revelou anteriormente qualquer resultado positivo para agentes de DST, na avaliação do gene 16S, revelou, embora numa frequência relativamente baixa (1%), a presença do género *Neisseria*. Este fenómeno ilustra as dificuldades inerentes à identificação de agentes patogénicos no sémen por abordagens metodológicas distintas e, demonstra ainda, a existência de diferentes graus de abrangência em ambos os estudos.

Na primeira fase, através de técnicas de PCR com *primers* específicos foram identificados géneros e/ou espécies particulares nos casos e controlos de infertilidade, mas é possível que o DNA destes agentes de DST se encontre em concentrações muito baixas no sémen, o que poderá explicar, à partida, a baixa reprodutibilidade observada entre réplicas. Pelo contrário, na análise do gene 16S, o uso de *primers* universais com correspondência a zonas de elevada conservação, comuns a múltiplas bactérias, possibilita uma visão mais alargada da composição das comunidades bacterianas existentes na amostra. Neste estudo preliminar, tendo em conta o número relativamente restrito de colónias seleccionadas por cada amostra (20 a 24), a obtenção de uma boa representação dos géneros mais abundantes parece exequível. Por sua vez, é também possível que alguns dos géneros menos prevalentes tenham sido identificados por acaso, podendo a sua frequência estar sobrevalorizada em relação a outros, de abundâncias superiores, que possam ter ficado por identificar nas diferentes amostras. Assim, é provável que as abundâncias relativas estimadas para cada género não sejam propriamente correspondentes às que se obteriam se fossem sequenciadas, por exemplo, cerca de 100 colónias por amostra ou mais amostras em cada grupo. Este facto pode, portanto, explicar

porque os géneros *Chlamydia* e *Ureaplasma* não foram identificados por esta abordagem em oposição ao género *Neisseria* que foi aqui identificado através de uma única sequência, num indivíduo anteriormente considerado como negativo.

Nesta investigação preliminar do microbioma de casos e controlos de infertilidade, foi já possível identificar alguns géneros mais abundantes do plasma seminal, dos quais se destacam os géneros *Enterococcus*, *Haemophilus*, *Streptococcus*, *Peptoniphilus* e *Shigella*. O género *Enterococcus* tem sido associado na literatura com a ocorrência de infeções urinárias, podendo por isso ter um efeito negativo no trato genitourinário de indivíduos inférteis (25,64). O género *Haemophilus*, que foi previamente identificado como uma bactéria Gram negativa mais prevalente entre casos de infertilidade, embora possa fazer parte da flora normal do organismo humano, em determinadas circunstâncias, dependendo da espécie, pode ter efeitos patológicos (3). O género *Streptococcus* é também um constituinte da flora normal da boca, pele, intestino e trato respiratório superior, sendo apenas capaz de provocar infeções em condições muito específicas, como é o caso de indivíduos com o sistema imunitário comprometido e dependendo também da espécie (64). Para os géneros *Peptoniphilus* e *Shigella*, que tiveram abundâncias equivalentes nos dois grupos, não existem evidências de efeitos negativos na saúde humana, especialmente associados a infertilidade (64,74).

Alguns géneros comuns entre os dois grupos de indivíduos têm abundâncias superiores no grupo controlo, denotando, à partida, um possível efeito protetor, são exemplos, os géneros *Veillonella* e *Fingoldia*, que compõem a flora normal do intestino, trato urinário e mucosa oral, e o género *Campylobacter* que é considerado como oportunista. O género *Morganella*, pelo facto de estar apenas presente no grupo controlo pode denotar igualmente um efeito protetor.

De um modo geral, pode-se concluir desta segunda fase do estudo que as comunidades bacterianas do plasma seminal são muito mais amplas do que considerado pela simples análise dos agentes de DST e que estas podem variar entre indivíduos, independentemente da sua associação com a infertilidade sugerindo, em consistência com trabalhos de outros autores, que cada indivíduo possui uma comunidade microbiana personalizada (3,16). A comparação dos resultados obtidos com os principais estudos equivalentes (25,53,54) mostra ainda que a larga maioria dos géneros identificados, quer em casos que em controlos, estão também presentes nouro tipo de amostras, e que estes podem ser componentes naturais do trato urinário masculino assim como do sistema reprodutor feminino e do trato gastrointestinal. Para além disso, deste estudo não emerge

um padrão claro da composição bacteriana do sémen, quer em casos controlos como em inférteis, reforçando a teoria atualmente estabelecida de que a constituição do microbioma do sémen é largamente afetada por vários fatores extrínsecos e intrínsecos aos indivíduos. Assim, nas análises dos microbiomas, há a possibilidade de existirem variáveis intrínsecas (ex. dieta, idade, toma de antibióticos) que possam alterar a composição do microbioma e diluir os efeitos de correlação com fenótipos de infertilidade (16,65).

4.3. Estudo alargado do microbioma do sémen por técnicas de sequenciação de nova geração (NGS)

O recente desenvolvimento de tecnologias de sequenciação em massa tem permitido uma análise mais aprofundada da composição das diferentes comunidades microbianas do organismo humano através da sequenciação, numa única reação, de inúmeras moléculas com origem em diferentes *taxa* bacterianos (23,50,66). Estas moléculas podem ser capturadas quer pela análise do transcriptoma de um qualquer tecido humano, quer pela amplificação de uma ou mais regiões hipervariáveis do gene 16S (66).

Nesta terceira fase do estudo, e de modo a caracterizar as comunidades bacterianas do plasma seminal em casos e controlos de infertilidade de uma forma mais abrangente e com uma maior resolução, procedeu-se à sequenciação do gene 16S (regiões V3-V6) por técnicas de sequenciação de nova geração (NGS – *next generation sequencing*). De modo a reduzir os custos desta análise, optou-se por efetuar a sequenciação do gene 16S de múltiplas amostras simultaneamente, num conjunto de quatro grupos amostrais, aqui denominados como *pools*.

Um total de 89 casos e 29 controlos foram selecionados para este estudo consoante os seus fenótipos de infertilidade. De seguida, os produtos de amplificação do gene 16S foram agrupados de modo a criar os quatro *pools*, três correspondentes a casos de infertilidade e um quarto que incluía as amostras controlo.

A subdivisão em diferentes grupos amostrais foi efetuada de modo a procurar avaliar uma possível relação causa-efeito das comunidades bacterianas com os diferentes fenótipos de infertilidade, astenozoospermia, oligozoospermia, teratozoospermia e hiperviscosidade, que são sobreponíveis num número elevado de casos, (Tabela 4.4).

Em síntese, com o *pool* C procurou-se estabelecer um padrão normal das comunidades bacterianas presentes em indivíduos aparentemente saudáveis. Com os *pools* AT e ATO, procurou-se avaliar uma possível correlação com fenótipos de astenozoospermia, teratozoospermia e oligozoospermia, mas de modo a poder ser investigado separadamente um possível efeito do microbioma na redução do número de espermatozoides. Por fim, com o *pool* H procurou-se avaliar um possível efeito das comunidades bacterianas no aumento da viscosidade seminal.

Tabela 4.4. Composição dos quatro grupos amostrais (*pools*) de casos e controlos de infertilidade.

| <i>Pools</i> | Fenótipos associados | Indivíduos incluídos |
|-----------------------------------|------------------------------------|---|
| <i>Pool C</i> (n=29) | Controlos | Todos os controlos (com parâmetros seminais dentro dos valores de referência) |
| <i>Pool AT</i> (n=27) | Asteno + Terato | Indivíduos com parâmetros de mobilidade reduzida e morfologia alterada, mas sem alteração no número de espermatozoides |
| <i>Pool ATO</i> (n=35) | Asteno + Terato + Oligo | Indivíduos com parâmetros de mobilidade reduzida e morfologia alterada, mas com redução do número de espermatozoides |
| <i>Pool H</i> (n=27) | Hiperviscosos | Indivíduos com parâmetros de hiperviscosidade e outros parâmetros alterados (mobilidade reduzida, redução do número de espermatozoides mas sem alteração de morfologia) |

n = número de amostras incluídas em cada grupo amostral.

Numa fase inicial do tratamento de dados, para as 118 amostras analisadas, e consideradas as regiões V3-V6 do gene 16S, foram identificados um total de 22 filós bacterianos, distribuídos pelos quatro grupos amostrais. Posteriormente, de modo a simplificar a análise de dados do microbioma, foi ainda introduzido, a todos os níveis taxonómicos, um limite de abundância relativa mínima de 0,1%, sendo coligidas numa única categoria (“ $f < 0,1\%$ taxa) todas as sequências de reduzida prevalência e com provável significância clínica limitada. Na tabela 4.5 são sumariadas as diversidades microbianas de cada grupo amostral aos diferentes níveis taxonómicos analisados (Filo, Classe, Ordem, Família e Género).

Numa observação preliminar de diversidade bacteriana realizada a todos os níveis taxonómicos, os grupos amostrais ATO e H parecem apresentar uma maior variedade bacteriana em comparação com os grupos C e AT. Tendo em consideração que nem sempre foi possível atingir o nível taxonómico do género, os *pools* ATO e H, em particular, destacam-se pelo maior número de famílias e géneros bacterianos identificados no plasma seminal. De seguida será dada maior relevância aos resultados obtidos nos níveis taxonómicos de filo, classe e género, sendo que, sempre que não tenha sido possível a identificação até ao nível taxonómico anterior, será apresentada a família. A restante informação taxonómica, referente às ordens e famílias, é disponibilizada em anexo (Anexos VIII-A, VIII-B).

Tabela 4.5. Distribuição da diversidade bacteriana identificada por grupo amostral (*pool*) nos diferentes níveis taxonómicos. Valores totais e superiores ao limite estabelecido de 0,1%.

| Grupo amostral | Filo Total (f> 0,1%) | Classe Total (f> 0,1%) | Ordem Total (f> 0,1%) | Família Total (f> 0,1%) | Género Total (f> 0,1%) |
|-----------------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| Pool C | 16 (5) | 34 (10) | 53 (20) | 110 (37) | 212 (50) |
| Pool AT | 17 (6) | 34 (12) | 51 (21) | 105 (35) | 213 (54) |
| Pool ATO | 19 (7) | 36 (12) | 54 (19) | 115 (36) | 244 (54) |
| Pool H | 18 (7) | 36 (12) | 54 (24) | 118 (45) | 255 (59) |

4.3.1. Composição do microbioma do sémen – filo e classe

No conjunto dos quatro grupos amostrais foram identificados sete filios com abundâncias relativas superiores a 0,1% (Figura 4.8). O mais frequente, no geral, é o filo *Firmicutes*, com mais de 50% de prevalência em qualquer um dos *pools*, seguido pelos filios *Proteobacteria* e *Actinobacteria*, com frequências variáveis entre 11-27% e 9-13%. Outros filios identificados, mas menos comuns, são *Bacteroidetes*, *OD1*, *Cyanobacteria* e *Fusobacteria*, todos eles com frequências inferiores a 10%. Neste nível taxonómico, apenas 0,1-0,3% das sequências foram associadas a filios de baixa prevalência (f<0,1%).

Na comparação das abundâncias relativas, o *pool H*, correspondente ao fenótipo de hiperviscosidade, demarca-se dos restantes por uma diminuição da frequência de *Firmicutes* e um aumento de *Proteobacteria*, o que poderá sugerir uma correlação entre o filo *Proteobacteria* e o aumento da viscosidade no sémen destes indivíduos. De facto, do ponto de vista estatístico, o *pool H* é o único com diferenças significativas em relação aos controlos (p=0.0294). Neste contexto, é importante salientar que, enquanto o filo *Firmicutes* inclui mais de 274 géneros de bactérias Gram positivas com baixo conteúdo GC, muitas delas presentes no intestino humano (64), o filo *Proteobacteria* constitui o maior grupo taxonómico bacteriano, exibindo uma larga diversidade filogenética que compreende seis subdivisões de espécies Gram negativas com relevância clínica e, na sua maioria, consideradas como patogénicas (ex. *Neisseria*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* e *Legionella*) (64).

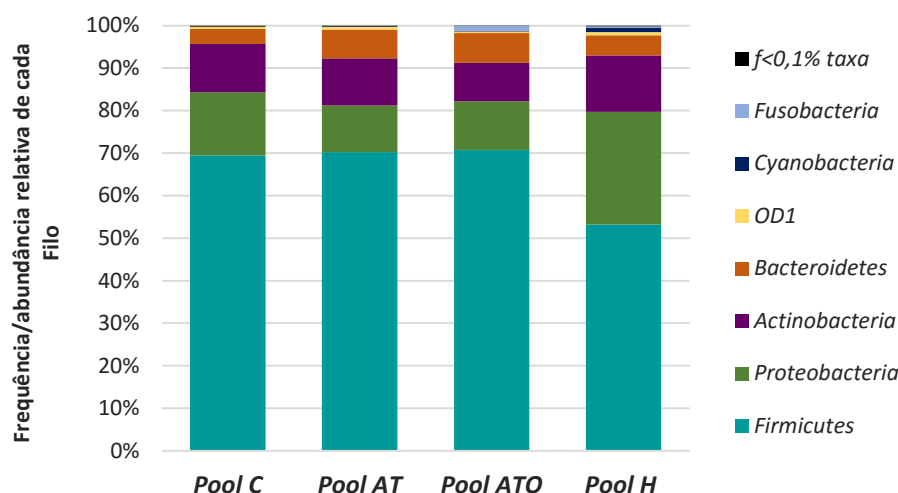


Figura 4.8. Abundância relativa dos diferentes filos bacterianos identificados no sêmen dos quatro grupos amostrais (*pools*). *Pool C*: amostras controle, *Pool AT*: amostras asteno e teratozoospermicos, *Pool ATO*: amostras asteno, terato e oligozoospermicos, *Pool H*: amostras hiperviscosos.

Mesmo a um nível taxonômico amplo, como é o filo, estes resultados apontam para a existência de uma diferenciação nos microbiomas dos vários grupos amostrais, o que pode ser indicador de uma influência das comunidades bacterianas no sêmen e nos fenótipos apresentados pelos indivíduos inférteis.

Na figura 4.9 estão representadas as 14 classes bacterianas mais prevalentes nos diferentes grupos amostrais. No geral, verifica-se uma subdivisão dos *Firmicutes* em duas classes, *Bacilli* e *Clostridia*, que possuem abundâncias relativas entre 45-54% e 8-23%, respectivamente. A distribuição da classe *Clostridia* não é uniforme entre os grupos, sendo mais comum no *pool AT*, com 23%, e menos abundante no *pool H*, com 8%. Esta menor prevalência da classe *Clostridia* associada com o fenótipo de hiperviscosidade parece, em parte, explicar a menor abundância do filo *Firmicutes* neste grupo amostral. A classe seguinte com maior prevalência é *Actinobacteria* que se mantém inalterada em relação ao filo com valores de distribuição muito próximos entre os *pools* (9-13%).

Por outro lado, na subdivisão do filo *Proteobacteria*, a demarcação do fenótipo de hiperviscosidade parece ser evidente e atribui-se a uma maior prevalência da classe *Gammaproteobacteria*, com uma representatividade de 17% do microbioma no *pool H*, em contraste com apenas 7% no *pool C*. Esta diferença é assinalável e aponta para uma provável associação entre a presença de microrganismos do filo *Proteobacteria*, na sua maioria da classe *Gammaproteobacteria*, e o fenótipo de hiperviscosidade. A classe

Alphaproteobacteria também apresenta uma prevalência superior no *pool H* (9%) mas, quando comparada com o *pool C*, a diferenciação é mínima (7%).

A classe *Flavobacteriia*, do filo *Bacteroidetes*, apresenta variações de abundância entre 2,6-4,4%, sendo ligeiramente mais prevalente nos *pools AT* e *ATO*, o que pode ser sugestivo de uma contribuição deste *taxon* nos fenótipos de asteno e teratozoospermia. Já a classe *Bacteroidia*, do mesmo filo, apresenta abundâncias entre 0,2-2,4%, sendo 10 vezes mais prevalente no *pool ATO*, sugerindo uma relação com o fenótipo de oligozoospermia. Apesar de todas estas variações, as diferenças quando consideradas no conjunto de cada grupo não são suficientes para atingir a significância estatística ($p > 0.05$).

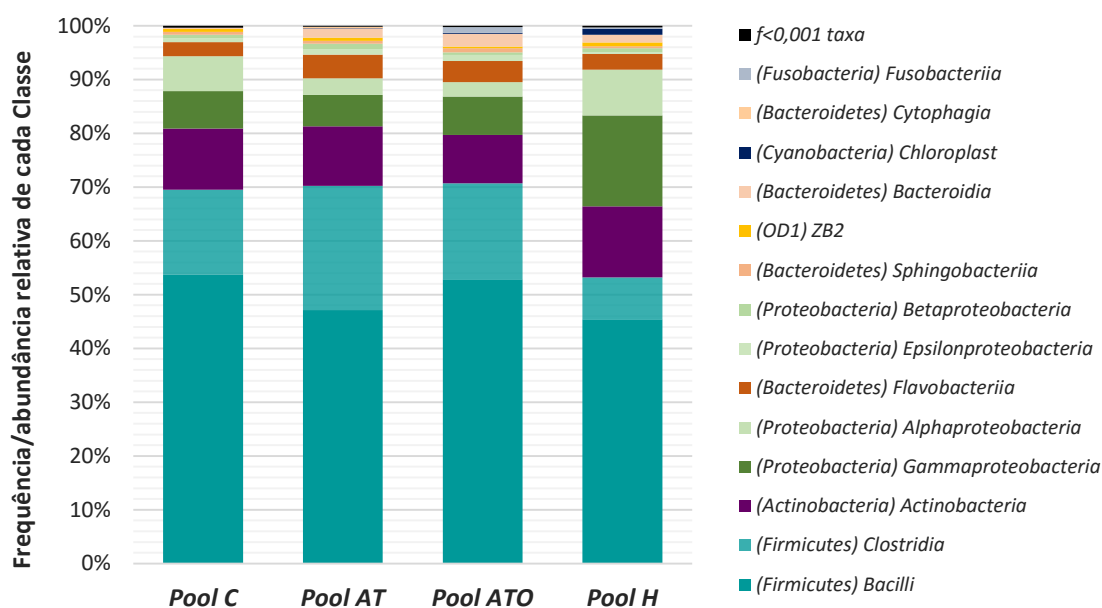


Figura 4.9. Abundância relativa das diferentes classes bacterianas identificadas no sêmen dos quatro grupos amostrais (*pools*). *Pool C*: amostras controlo, *Pool AT*: amostras asteno e teratozoospermicos, *Pool ATO*: amostras asteno, terato e oligozoospermicos, *Pool H*: amostras hiperviscosos.

4.3.2. Composição do microbioma do sêmen – género/família prevalentes em casos e controlos de infertilidade

A análise por famílias ou, sempre que possível, por géneros bacterianos mais prevalentes em cada um dos *pools* permite, à partida, uma avaliação mais precisa das potenciais repercussões da composição do microbioma nos diferentes parâmetros seminais e fenótipos de infertilidade. Neste nível taxonómico foram identificados, nos quatro grupos amostrais, 50 famílias diferentes e mais de 290 géneros. No entanto, apenas 81 géneros apresentam abundâncias relativas superiores a 0,1%. Entre os géneros/famílias mais prevalentes (Figura 4.10), aqueles com maior representatividade no

microbioma seminal são 30 *taxa* pertencentes ao filo *Proteobacteria* e 28 ao filo *Firmicutes*, seguidos pelos filos *Actinobacteria* com 10 e o filo *Bacteroidetes* com 9 gêneros. Nesta escala, as categorias taxonômicas com frequências inferiores a 0,1% representam já uma fração considerável do microbioma, 2,5-3% do total.

De um modo geral, pode-se afirmar que os gêneros mais comuns no sémen, independentemente do grupo amostral considerado, são *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Anaerococcus*, *Corynebacterium*, *Peptoniphilus*, *Propionibacterium* e *Haemophilus*. Na realidade, a maioria destes gêneros tinha já sido identificada no estudo piloto do microbioma seminal em que foram analisados apenas 10 casos e 6 controlos de infertilidade. Esta composição de gêneros/famílias é, no entanto, diferente em relação a estudos anteriores em que foram também analisadas regiões hipervariáveis do gene 16S (3,16). Concretamente, a referida literatura destaca os gêneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Prevotella*, *Pseudomonas*, *Anaerococcus*, *Veillonella*, *Porphyromonas* e *Aerococcus* como dos mais prevalentes no sémen. Nesta amostragem, alguns destes gêneros constituem uma fração menor dos microbiomas de casos e controlos de infertilidade.

Na comparação global dos quatro grupos amostrais, não parecem existir diferenças assinaláveis na abundância relativa dos gêneros/famílias embora, para testes estatísticos dos *pools* C contra H e AT contra H, os valores se aproximem da significância estatística ($p \approx 0,08$). No entanto, destacam-se algumas variações entre grupos que poderão sugerir um possível efeito no fenótipo de infertilidade, principalmente no que se refere aos gêneros *Staphylococcus*, *Anaerococcus* e *Peptoniphilus* (Tabela 4.6). O género *Peptoniphilus* aparece quase três vezes mais representado nos *pools* AT e ATO, que têm em comum a inclusão de fenótipos de asteno e teratozoospermia. Por outro lado, o género *Staphylococcus* apresenta uma redução da sua abundância relativa no *pool* H, que inclui indivíduos com hiperviscosidade, sendo este género mais prevalente no grupo de indivíduos com asteno e teratozoospermia (*pool* AT). Embora estes dois últimos gêneros possam ter alguma contribuição na alteração da motilidade e morfologia dos espermatozoides, estas diferenças não devem, por si só, ser encaradas como uma causa destes fenótipos.

Como referido anteriormente, ao contrário de estudos anteriores em que os gêneros *Lactobacillus* e *Prevotella* foram reportados como prevalentes no sémen (3) neste estudo, estes gêneros apresentam baixas abundâncias (entre 0,2-2%), tanto nos controlos como nos casos. Mesmo assim, o género *Lactobacillus* apontado como um microrganismo benéfico e preventivo da proliferação de agentes patogénicos, quer no trato reprodutor

feminino quer no masculino, é mais prevalente nos controlos que nos casos, inclusive no *pool/H* que não ultrapassa o limite de 0,1%. Por sua vez, géneros anteriormente associados de forma negativa com a qualidade do sémén e a infertilidade masculina (16), como é o caso do *Anaerococcus*, que inclui bactérias Gram negativas anaeróbias frequentemente encontradas no trato genital feminino, no estudo atual parece estar correlacionado com parâmetros normais do plasma seminal (9% no *pool C*) e é um dos mais prevalentes no geral.

Tabela 4.6. Principais diferenças entre géneros mais abundantes no microbioma do sémén nos diferentes grupos amostrais.

| Género | <i>Pool C</i> | <i>Pool AT</i> | <i>Pool ATO</i> | <i>Pool H</i> |
|--------------------------|---------------|----------------|-----------------|---------------|
| <i>Enterococcus</i> | 32,3% | 21,8% | 30,8% | 26,7% |
| <i>Staphylococcus</i> | 10,4% | 15,5% | 7,5% | 5,8% |
| <i>Peptoniphilus</i> | 3,6% | 10,6% | 10,2% | 2,4% |
| <i>Corynebacterium</i> | 5% | 4,3% | 2% | 4,1% |
| <i>Anaerococcus</i> | 8,7% | 4,2% | 1,2% | 1,2% |
| <i>Propionibacterium</i> | 3,1% | 1,7% | 1,7% | 2,6% |
| <i>Haemophilus</i> | 2,2% | 0,8% | 1,5% | 3% |
| <i>Granulicatella</i> | 1,5% | 1,4% | 2,1% | 1,8% |
| <i>Fingoldia</i> | 2,4% | 2,4% | 1,2% | 0,8% |
| <i>Actinomyces</i> | 1,5% | 0,6% | 1,9% | 2,7% |
| <i>Vagococcus</i> | 1,5% | 0,9% | 1,5% | 1,7% |
| <i>Pseudomonas</i> | 0,6% | 0,6% | 2,6% | 1,2% |
| <i>Acinetobacter</i> | 0,2% | 0,1% | 0,4% | 3,8% |
| <i>Campylobacter</i> | 0,7% | 1% | 1,1% | 0,3% |
| <i>Prevotella</i> | 0,2% | 0,7% | 2,1% | 1,1% |
| <i>Aggregatibacter</i> | 1,2% | 0,3% | 0,4% | 2,4% |
| <i>Facklamia</i> | 0,1% | 0,1% | 1% | 2,6% |
| <i>Lactobacillus</i> | 0,6% | 0,4% | 0,2% | - |
| <i>Aerococcus</i> | 0,3% | - | 4,2% | 1% |
| <i>Bifidobacterium</i> | 0,2% | 1,4% | 1,0% | - |
| <i>Klebsiella</i> | - | - | 0,3% | 0,9% |
| <i>Clostridium</i> | - | - | 0,9% | - |
| <i>Neisseria</i> | - | - | - | 0,2% |
| <i>Morganella</i> | 0,3% | - | - | - |
| <i>Sneathia</i> | - | - | 0,9% | - |

4. Resultados e Discussão



Figura 4.10. Abundância relativa dos diferentes gêneros ou famílias bacterianas do plasma seminal identificados nos quatro grupos amostrais (*pools*). As famílias são apresentadas entre parêntesis. *Pool C*: amostras controle, *Pool AT*: amostras asteno e teratozoospermicos, *Pool ATO*: amostras asteno, terato e oligozoospermicos, *Pool H*: amostras hiperviscosos.

(Legenda: azul – filo *Firmicutes*, verde – filo *Proteobacteria*, roxo – filo *Actinobacteria*, laranja – filo *Bacteroidetes*, amarelo – filo *OD1*, cinza – filo *Fusobacteria*, azul-escuro – filo *Cyanobacteria*).

O género *Haemophilus*, que inclui diversas espécies de bactérias patogénicas oportunistas associadas com doenças sistémicas e infeções do trato reprodutor, apresenta-se como um dos mais frequentes do microbioma seminal e, no conjunto dos quatro grupos amostrais, não revela diferenças de distribuição assinaláveis que possam ser interpretadas como um importante fator microbiano de infertilidade. O género *Aggregatibacter*, caracterizado por bactérias Gram negativas, é tido como mais prevalente entre casos de infertilidade (3) e apresenta uma frequência duas vezes superior nos hiperviscosos quando comparada com os controlos (2,4% contra 1,2%), sugerindo uma possível contribuição deste género na perda da qualidade do sêmen. *Corynebacterium*, *Propionibacterium*, *Fingoldia* e *Pseudomonas* são géneros que, apesar de terem frequências entre 1-5% no geral, não apresentam diferenças de distribuição significativas entre os *pools*.

Neste estudo, alguns géneros com reconhecida patogenicidade foram apenas identificados em grupos amostrais específicos e com prevalências relativamente baixas, como é o caso dos géneros *Sneathia* e *Clostridium*, identificados no *pool* ATO e o género *Klebsiella* no *pool* ATO e H. Outro exemplo é o género *Neisseria* identificado no *pool* H com uma prevalência de 0,2%.

Para além destes, outros géneros apresentam diferenças consideráveis em determinado *pool*, em comparação com a sua ausência ou prevalência inferior a 1% nos restantes. Destacam-se os géneros *Acinetobacter* e *Facklamia*, mais prevalentes nos *pools* ATO e H, respetivamente. O género *Aerococcus* apresenta uma prevalência superior no *pool* ATO e tinha já sido identificado no microbioma do sêmen de indivíduos asteno e oligozoospermicos (16). Estes géneros poderão ser específicos de determinados grupos de indivíduos ou, dada a sua baixa prevalência, serem apenas específicos de alguns dos indivíduos incluídos no *pool*.

De um modo geral, a maioria dos géneros mais frequentes no microbioma do sêmen correspondem a bactérias Gram positivas que, de acordo com um estudo anterior (3), parecem ser parte integrante da flora microbiana do trato reprodutivo e estão envolvidos na proteção contra o efeito negativo de géneros Gram negativos.

Para além disso, muitos dos géneros incluídos no microbioma do sêmen de indivíduos inférteis estão igualmente relacionados com os géneros encontrados no trato genital feminino, alguns deles associados a infeções vaginais (16,67,68,72). Este facto suporta a teoria de que os microrganismos que compõem o microbioma são partilhados e adquiridos entre indivíduos (3,16). Dentre os géneros de bactérias comuns entre homens e mulheres incluem-se *Corynebacterium*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Prevotella*,

Finegoldia, *Anaerococcus*, *Peptoniphilus*, *Veillonella*, *Porphyromonas*, *Aerococcus* e *Granulicatella* (16,68).

Em comparação com outros estudos similares existentes (3,16,23), alguns dos resultados discordantes podem ser atribuídos ao uso de diferentes metodologias experimentais. Estas metodologias compreendem a utilização de diferentes *primers* universais para a amplificação de distintas regiões hipervariáveis do gene 16S e a sequenciação de amostras singulares ou em *pools*. No entanto, a referida diferenciação entre estudos pode estar também relacionada com fatores ambientais que condicionem a composição do microbioma, uma vez que os estudos anteriores foram realizados em populações asiáticas e não populações mais próximas geograficamente de Portugal.

Embora o estudo atual permita uma visão global da composição das comunidades microbianas do plasma seminal e possibilite identificar possíveis *taxa* implicados na infertilidade de forma transversal a múltiplos indivíduos, não permite com rigor avaliar em cada caso específico se existe, ou não, uma preponderância de um qualquer agente infeccioso. Para além disso, há a hipótese de perda de alguns géneros particulares que por serem muito pouco frequentes tenham sido agrupados numa única categoria ($f < 0,1\%$). Este é o caso dos agentes de DTS *Chlamydia*, *Ureaplasma* e *Mycoplasma* que foram todos eles detetados em frequências extremamente baixas ($f < 0,1\%$).

Finalmente, o estudo atual, pelas múltiplas diferenças entre o grupo controlo e de hiperviscosidade, sugere um papel mais relevante das alterações nas interações das comunidades bacterianas no sémen, principalmente na perda de qualidade por aumento da viscosidade. Este resultado é concordante com propostas de diferentes autores de uma possível associação do fenótipo de hiperviscosidade com a presença de infeções bacterianas e situações de leucocitospermia (25,76).

5. Conclusão

No presente estudo do microbioma do plasma seminal de casos e controlos de infertilidade, realizado apenas em indivíduos de origem Portuguesa, foram utilizadas técnicas convencionais de PCR para deteção de reconhecidos agentes de DST e, numa abordagem mais abrangente por técnicas de sequenciação de nova geração, foi realizada a caracterização das comunidades microbianas do sémen. Numa perspectiva global, este estudo permite concluir que:

- I. Os agentes de DST reconhecidos como os mais prevalentes, HPV, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Ureaplasma urealyticum*, não apresentam diferenças significativas entre controlos e casos de infertilidade, independentemente do fenótipo considerado.
- II. O agente patogénico *Neisseria gonorrhoeae*, apesar da sua baixa frequência em casos, é o único que, pela sua ausência nos controlos, poderá representar um importante fator infeccioso de infertilidade.
- III. As comunidades microbianas do plasma seminal são muito mais amplas do que o considerado pela simples análise dos principais agentes de DST, verificando-se que, apesar de uma certa variabilidade entre indivíduos, a maior parte dos microrganismos identificados são comuns às floras do sistema genitourinário masculino e feminino e sistema gastrointestinal.
- IV. O microbioma do plasma seminal é maioritariamente constituído por *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Anaerococcus*, *Corynebacterium*, *Peptoniphilus*, *Propionibacterium* e *Haemophilus*. Embora, no geral, não existam diferenças substanciais entre casos e diferentes fenótipos de infertilidade, o grupo dos hiperviscosos parece destacar-se por uma maior diversidade de *taxa*, por uma abundância relativa superior do filo *Proteobacteria* e, nomeadamente, pela presença de agentes infecciosos como *Klebsiella*, *Facklamia* e *Acinetobacter* bem como *Neisseria*, e ausência do género protetor *Lactobacillus*.

6. Referências bibliográficas

6. Referências Bibliográficas

1. Monavari SH, Vaziri MS, Khalili M, Shamsi-Shahrabadi M, Keyvani H, Mollaei H, et al. Asymptomatic seminal infection of herpes *simplex* virus: impact on male infertility. *Journal of biomedical research*. 2013; 27 (1):56-61.
2. Cooper TG, Noonan E, Eckardstein SV, Auger J, et al. World Health Organization Reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*. 2010; 16 (3):231-245.
3. Weng SL, Chiu CM, Lin FM, Huang WC, Liang C, Yang T, et al. Bacterial communities in semen from men of infertile couples: metagenomic sequencing reveals relationships of seminal microbiota to semen quality. *PLoS One*. 2014; 9 (10): e110152.
4. Brookings C, Goldmeier D, Sadeghi-Nejad H. Sexually transmitted infections and sexual function in relation to male fertility. *Korean journal of urology*. 2013; 54(3):149-56.
5. Keck C, Gerber-Schafer C, Clad A, Wilhelm C, Breckwoldt M. Seminal tract infections: impact on male fertility and treatment options. *Human reproduction update*. 1998; 4 (6): 891-903.
6. Albu C, Brusin S, Dias JG, Ciancio B, Spiteri G. European Centre for Disease Prevention and Control - sexually transmitted infections, including HIV and blood-borne viruses. *Annual epidemiological report*. 2014.
7. Ochsendorf FR. Sexually transmitted infections: impact on male fertility. *Andrologia*. 2008; 4 (2): 72-5.
8. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interactions. 4th ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.
9. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5ed. Geneva: WHO Press World Health Organization; 2010.
10. Jequier AM. *Male Infertility - A guide for the clinician*. 2nded. Cambridge: Clinical Guides Publisher - Cambridge University Press; 2011.
11. Stukenborg JB, Kjartansdóttir KR, Reda A, Colon E, Albersmeier JF, Söder O. Male germ cell development in Humans. *Hormone research in paediatrics*. 2014; 81: 2-12.
12. Lundquist F. Aspects of the biochemistry of semen. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1949; 19(66):7– 105.
13. Holstein AF, Schulze W, Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive biology and endocrinology*. 2003; 1:107.
14. Mitra A, Richardson RT, O'Rand MG. Analysis of Recombinant Human Semenogelin as an Inhibitor of Human Sperm Motility. *Biol Reprod*. 2010; 82(3): 489–496.
15. Baker K, Li J, Sabanegh E. Analysis of semen parameters in male referrals: impact of reference limits, stratification by fertility categories, predictors of change, and comparison of normal semen parameters in subfertile couples. *Fertility and Sterility*. 2015; 103 (1):59-65.
16. Hou D, Zhou X, Zhong X, Settles ML, Herring J, Wang L, et al. Microbiota of the seminal fluid from healthy and infertile men. *Fertility and sterility*. 2013; 100 (5): 1261-1269.
17. Punab M, Kullisaar T, Mändar R. Male infertility workup needs additional testing of expressed prostatic secretion and/or post-massage urine. *PLoS One*. 2013; 8 (12): e82776.

6. Referências Bibliográficas

18. Ahmadi MRH, Yasemi M, Peyman H, Hemati K, Khajavikhan J, Yaghoubi M, et al. Associated factors with male infertility: a case control study. *Journal of Clinical and diagnostic research*. 2014; 8 (9): FC11-FC13.
19. Anawalt BD. Approach to male infertility and induction of spermatogenesis. *Journal of Clinical Endocrinology*. 2013; 98 (9): 3532-3542.
20. Aitken RJ, Baker MA. Causes and consequences of apoptosis in spermatozoa; contributions to infertility and impacts on development. *Int. J. Dev. Biology*. 2013; 57(2-4): 265-272.
21. Erenpreiss J, Spano M, Erenpreisa J, Bungum M, Giwercman A. Sperm chromatin structure and male infertility: biological and clinical aspects. *Asian Journal of Andrology*. 2006; 8(1):11-29.
22. Gimenes F, Medina FS, Abreu AL, Irie MM, Esquicati IB, Malagutti N, et al. Sensitive simultaneous detection of seven sexually transmitted agents in semen by multiplex-PCR and of HPV by single PCR. *PLoS One*. 2014; 9 (6): e98862.
23. Mändar R. Microbiota of male genital tract: impact on the health of man and his partner. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*. 2013; 69(1): 32-41.
24. Balmelli T, Stamm J, Dolina-Giudici M, Peduzzi R, Piffaretti-Yanez A, Balerna M. *Bacteroides ureolyticus* in men consulting for infertility. *Andrologia*. 1994; 26 (1): 35-38.
25. Domes T, Lo KC, Grober ED, Mullen JB, Mazzulli T, Jarvi K. The incidence and effect of bacteriospermia and elevated seminal leukocytes on semen parameters. *Fertility and sterility*. 2012; 97(5): 1050-1055.
26. Ruzs A, Pilatz A, Wagenlehner F, Linn T, Diemer T, Schuppe HC, et al. Influence of urogenital infections and inflammation on semen quality and male fertility. *World journal of urology*. 2012; 30 (1): 23-30.
27. Bezold G, Politch JA, Kiviat NB, Kuypers JM, Wolff H, Anderson DJ. Prevalence of sexually transmissible pathogens in semen from asymptomatic male infertility patients with and without leukocytospermia. *Fertility and sterility*. 2007; 87 (5): 1087-1097.
28. Abusarah EA, Awwad ZM, Charvalos E, Shehabi AA. Molecular detection of potential sexually transmitted pathogens in semen and urine specimens of infertile and fertile males. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2013; 77 (4): 283-286.
29. Gimenes F, Souza RP, Bento JC, Teixeira JJV, et al. Male infertility: a public health issue caused by Sexually transmitted pathogens. *Nature reviews urology*. 2014; 11: 672-687.
30. Sanocka-Maciejewska D, Ciupinska M, Kurpisz M. Bacterial infection and semen quality. *Journal of reproductive immunology*. 2005; 67(1-2): 51-56.
31. Fraczek M, Szumala-Kakol A, Jedrzejczak P, Kamieniczna M, Kurpisz M. Bacteria trigger oxygen radical release and sperm lipid peroxidation in in vitro model of semen inflammation. *Fertility and sterility*. 2007; 88(4): 1076-1085.
32. Fraczek M, Kurpisz M. Inflammatory mediators exert toxic effects of oxidative stress on human spermatozoa. *Journal of andrology*. 2007; 28(2): 325-333.

33. Schneede P, Tenke P, Hofstetter AG. Sexually transmitted diseases (STDs)-a synoptic overview for urologists. *European urology*. 2003; 44 (1): 1-7.
34. Gdoura R, Kchaou W, Ammar-Keskes L, Chakroun N, Sellemi A, Znazen A, et al. Assessment of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*, and *Mycoplasma genitalium* in semen and first void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples. *Journal of andrology*. 2008; 29 (2):198-206.
35. Garolla A, Pizzol D, Bertoldo A, Menegazzo M, Barzon L, Foresta C. Sperm viral infection and male infertility: focus on HBV, HCV, HIV, HPV, HSV, HCMV, and AAV. *Journal of reproductive immunology*. 2013; 100 (1): 20-29.
36. Ivanov IB, Kuzmin MD, Gritsenko VA. Microflora of the seminal fluid of healthy men and men suffering from chronic prostatitis syndrome. *International journal of andrology*. 2009; 32 (5): 462-467.
37. Hosseinzadeh S, Eley A, Pacey AA. Semen quality of men with asymptomatic chlamydial infection. *Journal of andrology*. 2004; 25 (1): 104-109.
38. Mahony JB, Jang D, Chong S, Luinstra K, Sellors J, Tyndall M, et al. Detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum*, and *Mycoplasma genitalium* in First-void Urine Specimens by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Molecular diagnosis*. 1997; 2 (3): 161-168.
39. Al-Sweih NA, Al-Fadli AH, Omu AE, Rotimi VO. Prevalence of *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*, and *Ureaplasma urealyticum* infections and seminal quality in infertile and fertile men in Kuwait. *Journal of andrology*. 2012; 33 (6):1323-1329.
40. Lee SR, Chung JM, Kim YG. Rapid one step detection of pathogenic bacteria in urine with sexually transmitted disease (STD) and prostatitis patient by multiplex PCR assay (mPCR). *Journal of microbiology*. 2007; 45 (5):453-459.
41. Wang Y, Wu Z-W, Zhang L-F, Wu X-K, Yi L, Han X-D. Effects of *Ureaplasma urealyticum* infection on the male reproductive system in experimental rats. *First international journal of Andrologia*. 2010; 42 (5): 297-301.
42. Svenstrup HF, Fedder J, Abraham-Peskir J, Birkelund S, Christiansen G. *Mycoplasma genitalium* attaches to human spermatozoa. *Human reproduction*. 2003; 18 (10): 2103-2109.
43. Sethi S, Singh G, Samanta P, Sharma M. *Mycoplasma genitalium*: an emerging sexually transmitted pathogen. *The Indian journal of medical research*. 2012; 136 (6): 942-55.
44. Gupta A, Gupta A, Gupta S, Mittal A, Chandra P, Gill A. Correlation of *Mycoplasma* with unexplained infertility. *Arch Gynecol Obstet*. 2009; 280 (6):981-985.
45. Yang Y, Jia CW, Ma YM, Zhou LY, Wang SY. Correlation between HPV sperm infection and male infertility. *Asian Journal of Andrology*. 2013; 15 (4): 529-532.
46. Amirjannati N, Yaghmaei F, Akhondi MM, Nasiri M, Heidari-Vala H, Sehhat Z. Molecular and serologic diagnostic approaches; the prevalence of herpes simplex in idiopathic men infertile. *Iranian journal of reproductive medicine*. 2014; 12 (5): 327-334.

47. Cox MJ, Cookson WO, Moffatt MF. Sequencing the human microbiome in health and disease. *Human molecular genetics*. 2013; 22 (R1): R88-94.
48. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108 (1): 4680-4687.
49. Chakravorty S, Helb D, Burday M, Connell N, Alland D. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of microbiological methods*. 2007; 69 (2): 330-339.
50. Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*. 2013; 41 (1): e1.
51. Nelson DE, Van Der Pol B, Dong Q, Revanna KV, Fan B, Easwaran S, Sodergren E, et al. Characteristic Male Urine Microbiomes Associate with Asymptomatic Sexually Transmitted Infection. *PLoS One*. 2010; 5(11): e14116.
52. Moretti E, Capitani S, Figura N, Pammolli A, Federico MG, Giannerini V. et al. The presence of bacteria species in semen and sperm quality. *Journal of assisted reproduction and genetics*. 2009; 26 (1): 47-56.
53. Lbadin OK, Ibeh IN. Bacteriospermia and sperm quality in infertile male patient at University of Benin Teaching Hospital, Benin City, Nigeria Malaysian. *Journal of Microbiology*. 2008; 4(2): 65-67.
54. De Francesco MA, Negrini R, Ravizzola G, Galli P, Manca N. Bacterial species present in the lower male genital tract: a five-year retrospective study. *European Journal Contracept Reproduction Health Care*. 2011; 16 (1): 47–53.
55. Akutsu T, Motani H, Watanabw K, Iwase H, Sakurada K. Detection of bacterial 16S ribosomal RNA genes for forensic identification of vaginal fluid. *Legal Medicine*. 2012; 14 (3):160-162.
56. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010; 26(19):2460–2461.
57. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knigh TR. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*. 2011; 27(16): 2194–2200.
58. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods*. 2010; 7(5): 335–336.
59. Desantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol*. 2006; 72 (7):5069–5072.
60. Muvunyi CM, Dhont N, Verhelst R, Crucitti T, Reijans M, Mulders B, et al. Evaluation of a new multiplex polymerase chain reaction assay STDFinder for the simultaneous detection of 7 sexually transmitted disease pathogens. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2011; 71 (1): 29-37.

6. Referências Bibliográficas

61. Diemer T, Ludwig M, Huwe P, Hales DB, Weidner W. Influence of urogenital infection on sperm function. *Current opinion in urology*. 2000; 10(1): 39-44.
62. Dong Q, Brulc JM, Iovieno A, Bates B, Garoutte A, Miller D, et al. Diversity of Bacteria at Healthy Human Conjunctiva. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2011; 52(8):5408-5413.
63. Hospodsky D, Qian J, Nazaroff WW, Yamamoto N, Bibby K, Rismani-Yazdi H, et al. Human Occupancy as a Source of Indoor Airborne Bacteria. *Plos One*. 2012; 7(4): e34867.
64. Madigan TM, Martinko JM, Parker J. *Microbiologia de Brock*. 10ed. Pearson, Prentice Hill; 2004.
65. Davenport ER, Mizrahi-Man O, Michelini K, Barreiro LB, Ober C, Gilad Y. Seasonal Variation in Human Gut Microbiome Composition. *Plos One*. 2014; 9(3): e90731.
66. Maclean D, Jones JDG, Studholme DJ. Application of “Next-generation” sequencing technologies to microbial genetics. *Nature reviews Microbiology*. 2009; 7:287-296.
67. Korrovits P, Punab M, Türk S, Mändar R. Seminal Microflora in asymptomatic inflammatory (NIH IV category) Prostatitis. *European association of Urology*. 2006; 50 (6):1338-1346.
68. Gdoura R, Kchaou W, Ammar-Keskes L, Chakroun N, Sellemi A, Znazen A, et al. Assessment of *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*, and *Mycoplasma genitalium* in semen and first void urine specimens of asymptomatic male partners of infertile couples. *Journal of Andrology*. 2008; 29 (2):198–206.
69. Peeling R, Embree J. Screening for sexually transmitted infection pathogens in semen samples. *The Canadian journal of infectious diseases & medical microbiology AMMI Canada*. 2005; 16 (2): 73-76.
70. Potts JM, Sharma R, Pasqualotto F, Nelson D, Hall G, Agarwal A. Association of *Ureaplasma urealyticum* with abnormal reactive oxygen species levels and absence of leukocytospermia. *The Journal of urology*. 2000; 163(6): 1775-1778.
71. Kohn FM, Erdmann I, Oeda T, el Mulla KF, Schiefer HG, Schill WB. Influence of urogenital infections on sperm functions. *Andrologia*. 1998; 30 (1): 73-80.
72. Borovkova N, Korrovits P, Ausmees K, Türk S, Jöers K, Punab M. et al. Influence of sexual intercourse in genital tract microbiota in infertile couples. *Anaerobe*. 2007; 17 (6):414-418.
73. Jarvi K, Lacroix JM, Jain A, Dumitru I, Heritz D, Mittelman MW. Polymerase chain reaction-based detection of bacteria in semen. *Fertility and Sterility*. 1996; 66 (3): 463–467.
74. Citron DM, Tyrrell KL, Goldstein EJ. *Peptoniphilus coxii* sp. nov. and *Peptoniphilus tyrrelliae* sp. nov. isolated from human clinical infections. *Anaerobe*. 2012;18 (2):244–248.
75. Graham A, Kalsheker NA, Bamforth FJ, Newton CR, Markham AF. Molecular characterization of two alpha-1-antitrypsin deficiency variants: proteinase inhibitor (Pi) Nullnewport (Gly115»Ser) and (Pi) Zwrexham (Ser-19»Leu). *Human Genetic*. 1990; 85 (5):537–540.
76. Mändar R, Punab M, Borovkova N, Lapp E, Kiiker R, Korrovits P, et al. Complementary seminovaginal microbiome in couples. *Research in Microbiology*. 2015; 166 (5):440-7.

7. Anexos

ANEXO I – Lista de materiais e reagentes e respetiva marca/fabricante**Tabela AI.** Materiais e reagentes utilizados no decorrer do trabalho.

| Reagente | Marca |
|---|-----------------------------|
| Acrilamida | BioRad |
| Bisacrilamida | BioRad |
| SeaKem® LE agarose | Lonza |
| SGTB 10x | GRISP |
| Carbonato de sódio | VWR chemicals |
| Trizma® Base (Tris Base) | Sigma |
| <i>Kit e tampão sequenciação - Big Dye terminator cycle sequencing ready reaction kit</i> | Applied Biosystems |
| Sephadex G-50 Fine DNA grade | GE Healthcare |
| Sephacryl S-300 Hight Resolution | GE Healthcare |
| Hi-Di Formamid | Applied Biosystems |
| Glicerol | Merck |
| Glicina | Merck |
| Formaldeído 37% | Merck |
| Ácido nítrico 65% | Merck |
| Ácido acético glacial | Merck |
| HCl | Applichem |
| APS (2%) – Persulfato de amónio | Sigma |
| TEMED | Applichem |
| GreenSafe Premium | NZYTEch |
| TOPO-TA <i>kit</i> clonagem | Invitrogen |
| <i>E.coli</i> Mach1-T1 | Invitrogen |
| vector pCRII-TOPO | Invitrogen |
| 2x KAPA Taq ReadyMix™ | KapaBiosystems |
| QIAamp DNA mini kit™ | Qiagen |
| RT-PCR grade water (para PCR 16S) | Ambion® by LifeTechnologies |
| Qiagen Multiplex PCR kit | Qiagen |
| Cloreto magnésio | Thermo Scientific |
| Nitrato de prata AgNO ₃ | Merck |
| LB- agar | Invitrogen |
| Marcador Peso Molecular – GeneRuler DNA Ladder Mix SMO331/2/3 | GRISP |

ANEXO II - Protocolo de extração de DNA do plasma seminal (em coluna) – *DNA Purification from Blood or Body Fluids (Spin protocol) – QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen)*

1. Pipetar 20 µL QIAGEN Protease (ou proteinase K) para um microtubo 1,5 mL.
2. Adicionar 200 µL de amostra.
3. Adicionar 200 µL Tampão de lise (Buffer AL). Vortexar 15 segundos.
4. Incubar 10 minutos a 56°C.
5. Centrifugar brevemente para remover gotas da tampa do microtubo.
6. Adicionar 200 µL etanol (96-100%) à mistura. Vortexar 15 segundos. Centrifugar 1 minuto a 6000g.
7. Aplicar a mistura do passo anterior numa coluna (recolher solução para descartar em microtubo de 2 mL). Centrifugar 6000 g/1 minuto. Colocar a coluna em novo tubo de 2 mL e descartar o tubo com o filtrado.
8. Adicionar 500 µL de tampão de lavagem 1 (Buffer AW1). Centrifugar 6000 g/1 minuto. Colocar a coluna em novo microtubo de 2 mL e descartar tubo com o filtrado.
9. Na coluna adicionar 500 µL de tampão de lavagem 2 (Buffer AW2). Centrifugar 20000 g/3 minutos.
10. Colocar coluna em novo microtubo 2 mL e descartar o tubo com filtrado. Centrifugar novamente a 20000 g/1 minuto.
11. Colocar a coluna em novo microtubo 1,5 mL e adicionar 100 µL de tampão de eluição (Buffer AE).
12. Incubar a 15-25°C por 1 a 5 minutos, centrifugar 6000 g/1 minuto.
13. Adicionar 50 µL de Tampão de eluição, repetir passo 12.
14. Armazenar a -20°C até ao uso.

ANEXO III – Condições das reações de *duplex* e *multiplex*-PCR para detecção de agentes patogênicos no sêmen

- Nas reações de PCR para a detecção de HPV, *Ureaplasma* e *Mycoplasma* + HSV-1, foi utilizada a solução comercial “2x KAPA Taq ReadyMix” (KapaBiosystems) com todos os componentes para PCR, *Kapa taq* DNA polimerase (1,25 U por 50 µL de reação); Tampão; dNTPs (0,3 mM de cada nucleotídeo) e MgCl₂ (2 mM), exceto *primers* e DNA e, quando necessário, complementada com MgCl₂ para uma concentração final de 3 mM.

- Detecção da *Chlamydia* e *Neisseria* + HSV-2, utilizou-se um *kit* comercial “Qiagen Multiplex PCR kit”, quando necessário complementado pela solução Q[®] (Qiagen).

- As soluções de *primers* (*Primer Mix*) foram preparadas de modo a que a concentração final dos *primers* para *SERPINA1* fosse 1 µM, *primers* para HPV, *C. trachomatis*, *U. urealyticum*, *N. gonorrhoeae*, *M. genitalium* e HSV-1 a 5 µM e *primers* de HSV-2 a 10 µM.

Tabela All.1. Condições das reações de *duplex* e *multiplex*-PCR

| | Reação PCR (<i>primers</i> Tabela 3.2) | Master Mix (Vf=10 µL) |
|-----------------------|--|--|
| <i>duplex</i> -PCRs | HPV + <i>SERPINA1</i> | 5 µL 2x KAPA Taq ReadyMix 1 µL <i>primer</i> Mix 0,4 µL MgCl ₂ 1,6 µL H ₂ O 2 µL DNA |
| | <i>Chlamydia</i> + <i>SERPINA1</i> | 5 µL Qiagen Multiplex PCR kit 1 µL <i>primer</i> Mix 2 µL H ₂ O 2 µL DNA |
| | <i>Ureaplasma</i> + <i>SERPINA1</i> | 5 µL 2x KAPA Taq ReadyMix 1 µL <i>primer</i> Mix 0,4 µL MgCl ₂ 1,6 µL H ₂ O 2 µL DNA |
| <i>multiplex</i> -PCR | <i>Neisseria</i> + HSV-2 + <i>SERPINA1</i> | 5 µL Qiagen Multiplex PCR kit 1 µL <i>primer</i> Mix 0,625 µL solução Q 1,375 µL H ₂ O 2 µL DNA |
| | <i>Mycoplasma</i> + HSV-1 + <i>SERPINA1</i> | 5 µL 2x KAPA Taq ReadyMix 1 µL <i>primer</i> Mix 0,4 µL MgCl ₂ 1,6 µL H ₂ O 2 µL DNA |

ANEXO IV – Protocolo preparação dos géis para eletroforese de DNA em poliacrilamida e em agarose

A) Preparação gel de poliacrilamida (T9C5):

Para 10 mL de gel, cassete de 54 poços

9,6 mL solução T9C5 (ver abaixo)

500 µL APS 2%

20 µL TEMED

Condições de eletroforese: Sistema horizontal *Multiphor II*.

Voltagem constante 270V /1h

Coloração do gel:

1. Colocar o gel numa solução de ácido nítrico 1% durante 5 minutos.
 2. Lavar 2x com H₂O destilada (10 segundos).
 3. Colocar o gel numa solução de nitrato de prata 0,2% durante 20 minutos (manter no escuro e em agitação).
 4. Lavar 2x com H₂O destilada (10 segundos).
 5. Revelar o gel com solução de carbonado de sódio 0,28 M e formaldeído 0,02%.
 6. Parar a reação com ácido acético 10% (alguns segundos) e lavar com H₂O.
- Solução T9C5 (19:1) volume final = 50 mL
10,71 mL acrilamida (BioRad) 40%
11,25 mL Bisacrilamida (BioRad) 2%
3 mL Glicerol
25 mL Tampão do gel 2x (90,86g Tris Base em 1L H₂O, acertar pH até 8,8 com HCl)
 - Solução Tampão das pontes - 15,2g Tris Base em 1L H₂O, acertar pH com glicina até 8,8.

B) Preparação gel de agarose (1,5%)

Para gel de 60 poços (100 mL): Pesar 1,5g de agarose e diluir em 100 mL tampão comercial SGTB (GRISP), dissolver por ebulição. Adicionar 4 µL *GreenSafe Premium* (NzYtech) à mistura de agarose, verter no suporte apropriado. Adicionar 2 a 3 µL de amostra a cada poço.

Condições eletroforese: Sistema Bio-Rad, voltagem constante 120V/1h, gel submerso em tampão comercial SGTB (GRISP).

ANEXO V – Purificação DNA e reação de sequenciação

A) Purificação produtos de PCR

1. Adicionar 500 μ L *Sephacryl S-300* em cada coluna.
2. Centrifugar a 800g/2 minutos.
3. Lavar a coluna de *Sephacryl S-300* com 300 μ L de água desionizada.
4. Centrifugar novamente a 800g/2 minutos e descartar solução.
5. Pipetar todo o produto do PCR no centro da coluna e recolher em microtubo de 1,5 mL.
6. Centrifugar a 800g/2 minutos.
7. Guardar produto de PCR purificado para sequenciação (ponto B).

B) PCR para sequenciação

Foi preparada uma mistura de reação com um volume total de 5 μ L, por cada amostra. Esta mistura é composta por 0,5 μ L de *kit* sequenciação “*BigDye® Terminator cycle sequencing ready reaction kit*” (Life Technologies); 1,5 μ L de tampão “*BigDye® Terminator Sequencing buffer*” (Life Technologies) e 0,5 μ L de *primer* a 2,5 μ M, 2,5 μ L de produto de PCR purificado.

C) Purificação produtos de PCR de sequenciação

1. Adicionar 500 μ L de *Sephadex G-50* por cada coluna.
2. Centrifugara 2000 g/2 minutos.
3. Colocar todo o produto do PCR de sequenciação no centro da coluna.
4. Centrifugar novamente a 2000 g/3 minutos e recolher em microtubo de 1,5 mL.
5. Adicionar 10 μ L de formamida a cada amostra.

ANEXO VI - Protocolo clonagem com *kit* TOPO-TA Cloning (Life Technologies)**A) Reação ligação do produto PCR ao vetor**

| | |
|---|-----------|
| Produto PCR (purificado com <i>Sephacryl</i>) | 4 μ L |
| Solução salina | 1 μ L |
| Vetor TOPO | 1 μ L |
| Volume final | 6 μ L |

1. Misturar os reagentes e incubar 5-10 minutos à temperatura ambiente.
2. Colocar os tubos de reação TOPO no gelo.
3. Adicionar 2 μ L do volume da reação TOPO (preparada no passo 1) a 25 μ L de um *vial* de células *E.coli* TOP10 quimicamente competentes. (Atenção, não pipetar para cima e para baixo).
4. Incubar em gelo por 30 minutos.
5. Realizar um choque térmico das células bacterianas (TOP10) num banho a 42°C por 30 segundos sem agitação. Transferir imediatamente para o gelo.
6. Adicionar 125 μ L de meio S.O.C. (Life Technologies).
7. Agitar os tubos (200 rpm) a 37°C por uma hora.
8. Espalhar 10-50 μ L de cada reação de transformação em placas petri com meio LB -agar (25g/L) e ampicilina, previamente aquecidas a 37°C. Incubar por 16h A 37°C.
9. Picar colónias e suspender em 20 μ L de água ultra-pura até um máximo de 24 colónias por indivíduo.

B) PCR das colónias

As condições da reação de PCR consistiram numa mistura de reação de 10 μ L, contendo 5 μ L de "2x *KAPA Taq ReadyMix*" (KapaBiosystems); 1 μ L de Solução de *primers* do vetor (M13) a 5 μ M; 3 μ L H₂O ultra-pura e 1 μ L da suspensão bacteriana. O programa de amplificação consistiu num passo de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos de 32 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos; hibridação a 50°C por 15 segundos e extensão a 72°C por um minuto, com um passo de extensão final à mesma temperatura por 20 minutos.

C) Vektor pCRII-TOPO (Life technologies)

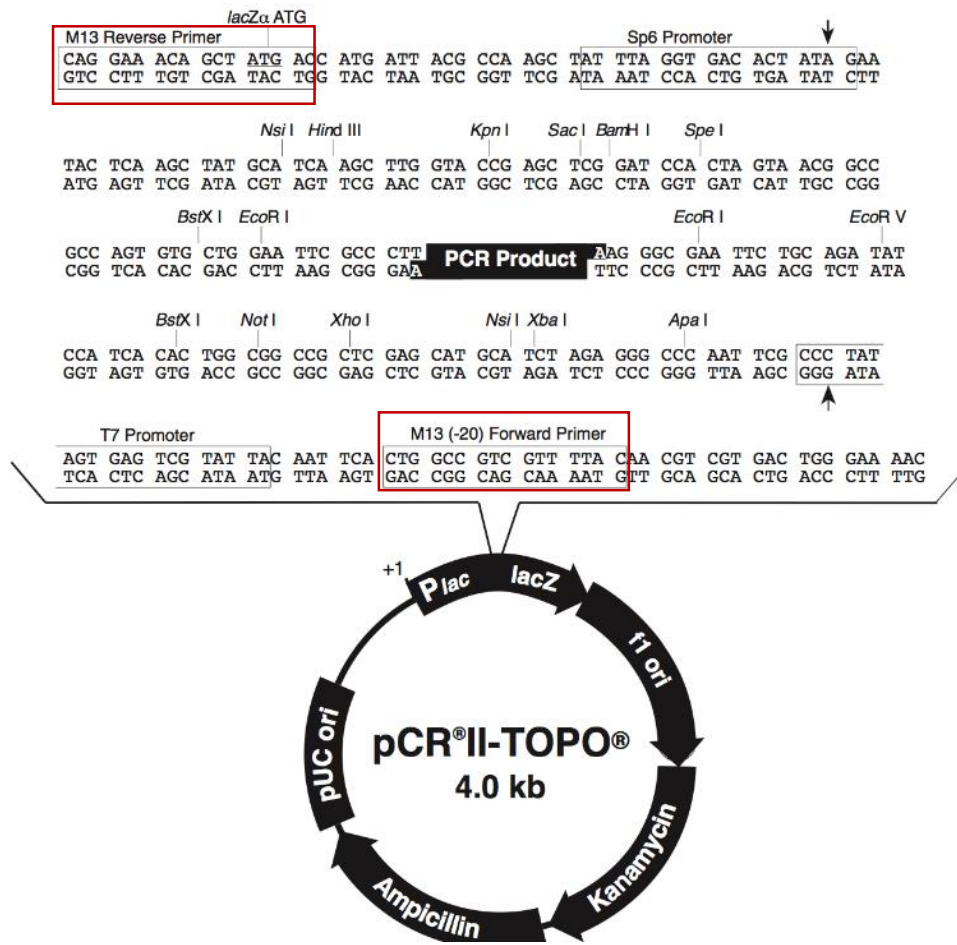


Figura AVI.1. Mapa do vetor pCRII-TOPO utilizado para a clonagem. Sequências dos *primers* utilizados no ponto AVI.B., M13 *forward* e M13 *reverse* (disponível em http://tools.invitrogen.com/content/sfs/vectors/pcriitopo_map.pdf).

ANEXO VII – Estudo preliminar do microbioma do fluido seminal em homens saudáveis e inférteis

Tabela AVII.1. Distribuição dos géneros bacterianos identificados em amostras de casos e controlos de infertilidade.

| Inférteis | | Controlos | |
|------------------------|-------|--------------------------|-------|
| <i>Enterococcus</i> | 46,2% | <i>Enterococcus</i> | 25,6% |
| <i>Anaerococcus</i> | 5,6% | <i>Anaerococcus</i> | 1,6% |
| <i>Eremococcus</i> | 0,5% | <i>Peptoniphilus</i> | 4,0% |
| <i>Klebsiella</i> | 1,5% | <i>Streptococcus</i> | 1,6% |
| <i>Peptoniphilus</i> | 3,6% | <i>Shigella</i> | 8,0% |
| <i>Streptococcus</i> | 5,1% | <i>Prevotella</i> | 2,4% |
| <i>Shigella</i> | 8,2% | <i>Campylobacter</i> | 4,8% |
| <i>Haemophilus</i> | 8,7% | <i>Fingoldia</i> | 4,0% |
| <i>Streptophyta</i> | 6,2% | <i>Varibaculum</i> | 0,8% |
| <i>Arcanobacterium</i> | 0,5% | <i>Veillonella</i> | 12,8% |
| <i>Prevotella</i> | 2,1% | <i>Corynebacterium</i> | 5,6% |
| <i>Neisseria</i> | 0,5% | <i>Sneathia</i> | 1,6% |
| <i>Fusobacterium</i> | 0,5% | <i>Actinomyces</i> | 0,8% |
| <i>Aerococcus</i> | 1,5% | <i>Staphylococcus</i> | 1,6% |
| <i>Campylobacter</i> | 0,5% | <i>Mobiluncus</i> | 0,8% |
| <i>Negativococcus</i> | 0,5% | <i>Morganella</i> | 8,8% |
| <i>Actinobaculum</i> | 1,0% | <i>Serratia</i> | 0,8% |
| <i>Fingoldia</i> | 1,5% | <i>Brevundimonas</i> | 1,6% |
| <i>Varibaculum</i> | 0,5% | <i>Pseudomonas</i> | 1,6% |
| <i>Veillonella</i> | 1,0% | <i>Porphyromonas</i> | 0,8% |
| Outros | 4% | <i>Novosphingobium</i> | 0,8% |
| | | <i>Leptotrichiaceae</i> | 1,6% |
| | | <i>Microbacteriaceae</i> | 0,8% |
| | | <i>Sphingomonas</i> | 2,4% |
| | | Outros | 4,8% |

ANEXO VIII – Estudo alargado do microbioma do sêmen por técnicas de sequenciação de nova geração (NGS) - Ordens, Famílias e Géneros

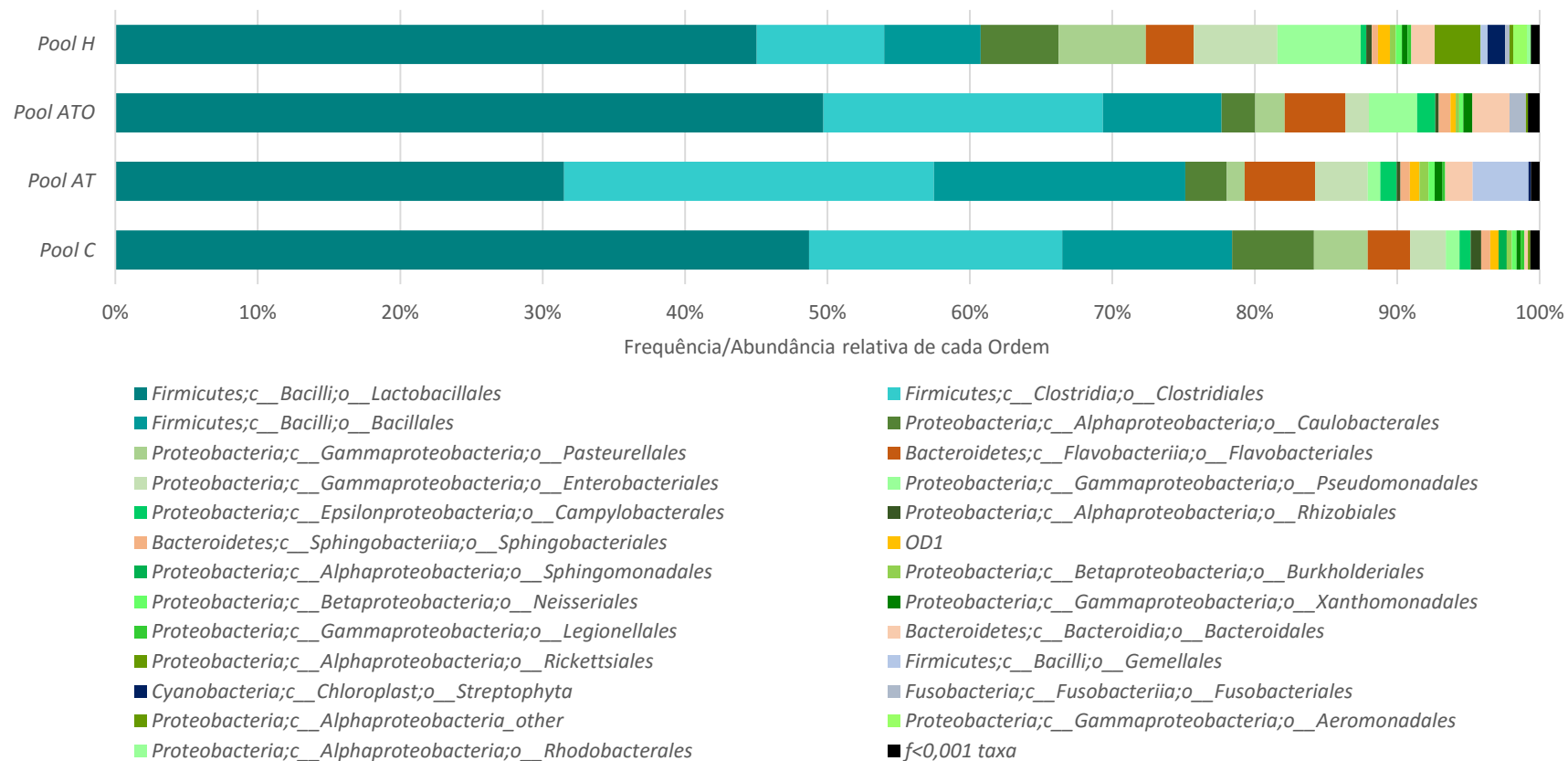


Figura AVII.A. Comunidades bacterianas no sêmen de indivíduos inférteis e controlos – Ordens mais abundantes. Abundância relativa (%) de cada ordem em função dos pools/fenótipos (Legenda: c_ Classe; o_ Ordem; f_ Família. azul – filo *Firmicutes*, verde – filo *Proteobacteria*, roxo – filo *Actinobacteria*, laranja – filo *Bacteroidetes*, amarelo – filo *OD1*, cinza – filo *Fusobacteria*, azul-escuro – filo *Cyanobacteria*).

7. Anexos

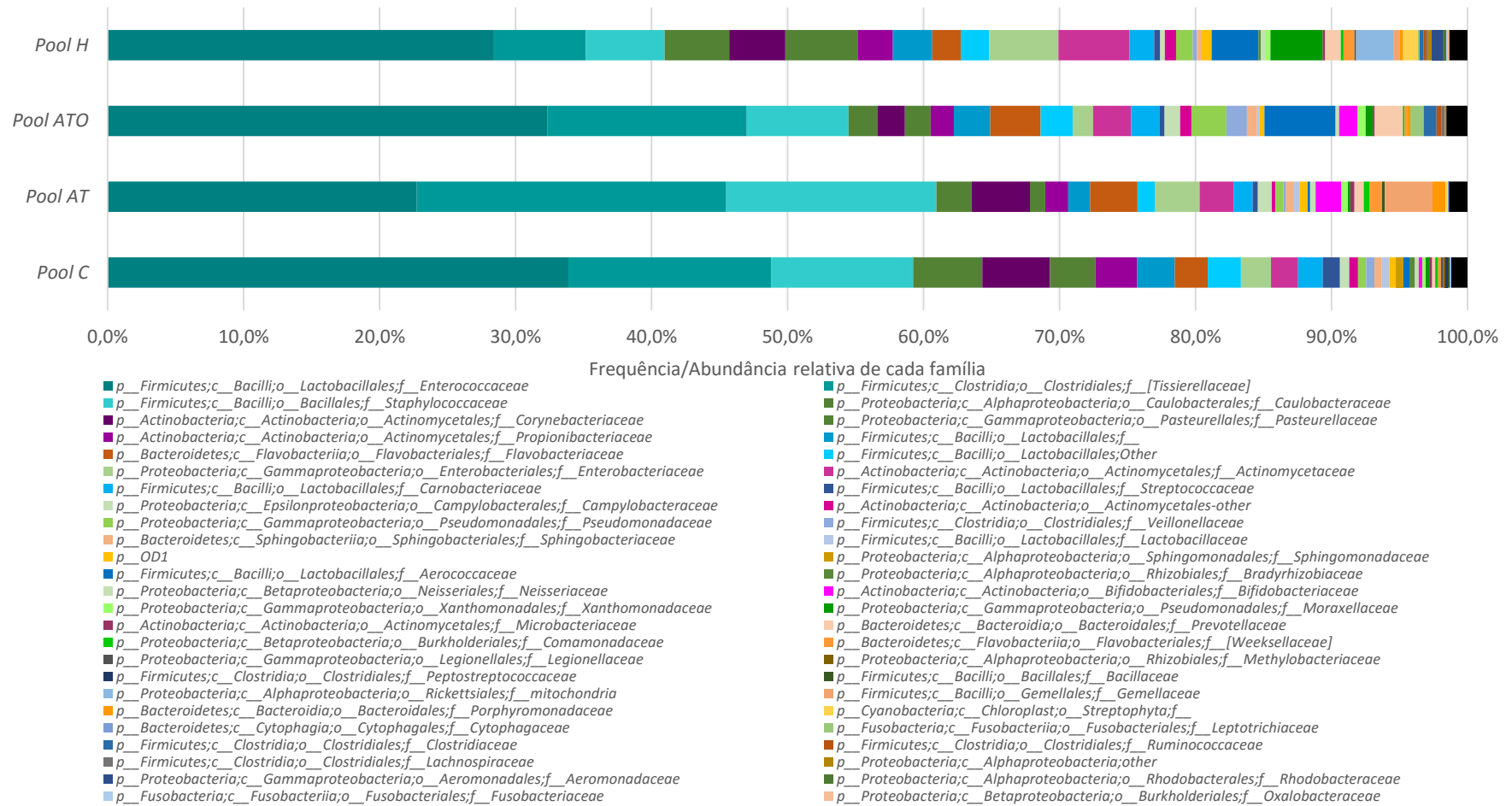


Figura AVII.B. Comunidades bacterianas no sêmen de indivíduos inférteis e controles – Famílias mais abundantes. Abundância relativa (%) de cada família em função dos pools/fenótipos (Legenda: c_ Classe; o_ Ordem; f_ Família. azul – filo *Firmicutes*, verde – filo *Proteobacteria*, roxo – filo *Actinobacteria*, laranja – filo *Bacteroidetes*, amarelo – filo *OD1*, cinza – filo *Fusobacteria*, azul-escuro – filo *Cyanobacteria*).

