



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS – SBFIS**

RAFAELA DE SOUZA BITTENCOURT

**Avaliação da influência do estradiol sobre mecanismos da
resposta imunológica em monócitos/macrófagos induzidos por
*Gardnerella vaginalis***

**Vitória da Conquista, BA
2021**

RAFAELA DE SOUZA BITTENCOURT

**Avaliação da influência do estradiol sobre mecanismos da
resposta imunológica em monócitos/macrófagos induzidos por
*Gardnerella vaginalis***

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas/Sociedade Brasileira de Fisiologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas

Orientador: Prof. Dr. Lucas Miranda Marques
Universidade Federal da Bahia - UFBA

Coorientador: Profa. Dra. Tiana Baqueiro Figueiredo
Universidade Federal da Bahia - UFBA

**Vitória da Conquista, BA
2021**

B624

Bittencourt, Rafaela de Souza.

Avaliação da influência do estradiol sobre mecanismos da resposta imunológica em monócitos/macrófagos induzidos por *Gardnerella vaginalis*.

/ Rafaela de Souza Bittencourt --Vitória da Conquista, 2021.

105 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Miranda Marques

Coorientador: Profa. Dra. Tiana Baqueiro Figueiredo

Tese (Doutorado – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas/Sociedade Brasileira de Fisiologia) -- Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, 2021.

1. Vaginose bacteriana. 2. *Gardnerella vaginalis*. 3. Estradiol. I. Universidade Federal da Bahia. Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Marques, Lucas Miranda. III. Figueiredo, Tiana Baqueiro. IV. Título.

CDU: 612.621.31

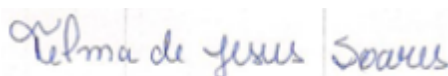
RAFAELA DE SOUZA BITTENCOURT

**Avaliação da influência do estradiol sobre mecanismos da
resposta imunológica em monócitos/macrófagos induzidos por
*Gardnerella vaginalis***

Esta tese foi julgada adequada à obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas e aprovada em sua forma final pelo Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas/ Sociedade Brasileira de Fisiologia, Universidade Federal da Bahia. Vitória da Conquista – BA, data.



Prof. Dr. Lucas Miranda Marques (Orientador)
Universidade Federal da Bahia



Profa. Dra. Telma de Jesus Soares (Examinadora)
Universidade Federal da Bahia



Prof. Dra. Samira Itana de Souza (Examinadora)
Universidade Federal da Bahia



Profa. Dra. Clarissa Leal Silva e Souza (Examinadora)
Universidade Federal da Bahia



Profa. Dra. Lilianny Souza de Brito Amaral (Examinadora)
Universidade Federal da Bahia

AGRADECIMENTO

O meu primeiro agradecimento é à minha família (Paulo (pai), Jane (mãe), Manuela (irmã), Paulinho (afilhado) Pedro (sobrinho) e Valmir (cunhado), pelo carinho, paciência, incentivo e pela minha formação. Sem a certeza que sempre estão comigo este projeto seria mais difícil.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Lucas Miranda Marques, por todo apoio e confiança. Sempre conduziu meu processo de aprendizado com muita a generosidade e dedicação, que, para mim, descreve este ser humano inteligente e com uma alma linda.

À minha co-orientadora e amiga, Profa Dra Tiana Baqueiro Figureido, por toda abdicação de sua vida para suprir minhas necessidades tanto no campo do aprendizado quanto no pessoal

As voluntárias da pesquisa, pela disponibilidade em contribuir para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos profissionais das Unidade de Saúde da Família do município de Vitória da Conquista

A todos os colegas da pós-graduação, pelo compartilhamento de experiências e conhecimento, e, por todo acolhimento e contribuição para o meu aprendizado.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PMPGCF) pela idealização deste programa juntamente com a Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFIS), por permitindo a expansão do conhecimento em fisiologia.

A todo corpo docente do IMS/UFBA, pelo empenho e dedicação a este programa.

Ao corpo técnico do IMS/UFBA que auxiliou em diversas etapas deste trabalho.

À todos os meus amigos da “família Conquistense” amigos, Obrigada pela presença, incentivo, festas, almoços e tantas reuniões que contribuíram em dar leveza e confiança durante esta etapa.

Aos meus amigos de Salvador que sempre me incentivaram a concretizar esta etapa mesmo com a distância.

A minha família e amigos que, com todo amor e apoio, contribuíram para que alcançasse esta etapa da minha vida.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”

Chico Xavier

RESUMO

BITTENCOURT, Rafaela de Souza. **Avaliação da influência do estradiol sobre mecanismos da resposta imunológica em monócitos/macrófagos induzidos por *Gardnerella vaginalis***. 2021, 105 p. Tese (Doutorado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2021

Gardnerella vaginalis é uma bactéria comensal da microbiota vaginal e o principal agente da vaginose bacteriana (VB), uma infecção vaginal estabelecida devido ao desequilíbrio nesse ecossistema. A patogênese da vaginose bacteriana não está bem estabelecida, no entanto é considerada a principal desordem vaginal que acomete mulheres em idade reprodutiva o que pode hipotetizar a influência dos hormônios sexuais femininos em sua patogênese. Objetivo: Avaliar a influência do 17 β -estradiol (E2) na resposta imunológica induzida por *Gardnerella vaginalis* em modelos *in vitro* de macrófagos peritoneais murinos (MPMs) fêmeas e monócitos humanos do sangue periférico (hPMs) de mulheres, com ou sem atividade ovariana fisiológica. Metodologia: Realizado experimentos *in vivo* e *in vitro*. Para os experimentos *in vivo* nos animais, foram realizados: peso corporal, índice uterino e dosagem de estradiol e em humanos, foram realizados exames laboratoriais como hemograma, bioquímicos e hormonais. Para os experimentos *in vitro* os macrófagos peritoneais de fêmeas BALB/C cirurgia simulada (SHAM) ou ovariectomizadas (OVX) e os monócitos humanos do sangue periférico (hPMs) de mulheres em período fértil e menopausa foram subdivididos em três grupos: células inoculadas com *G. vaginalis*, células com salina estéril, ambas por 6 horas, e células pré-tratadas com 17 β -Estradiol (E2), por 6 horas, e inoculadas com *G. vaginalis*, também por 6 horas. Marcadores inflamatórios como: citocinas GM-CSF, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-23, IL-27 e IL-10, nitritos totais, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), foram mensurados em sobrenadante de cultura e a expressão dos genes TLR-2, NF-kB e ER α e ER β Além disso, uma curva de crescimento foi realizada em dois grupos. O grupo um, apenas com *G. vaginalis* e o grupo dois, *G. vaginalis* com 17 β -estradiol, durante um período de 24 horas. Resultados: Para a análise da curva de crescimento, pode ser constatada a atividade inibitória do E2 sobre a *G. vaginalis*. Para os experimentos em animais: *In vivo*, fêmeas SHAMs apresentaram maior peso uterino e maior concentração de estradiol, enquanto fêmeas OVX apresentaram maior peso corporal. *In vitro*, a concentração das citocinas, IL-6, IL-8, IL-10 e os marcadores inflamatórios, nitritos totais e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), apresentaram níveis elevados em MPMs de fêmeas SHAM e OVX inoculadas com *G. vaginalis* quando comparados com salina estéril. Ao tratamento com E2, os MPMs das fêmeas OVX apresentaram maiores níveis de IL-10 e peróxido de hidrogênio quando com parados com OVX sem tratamento. Entretanto, apenas o peróxido de hidrogênio se equiparou aos MPMs das fêmeas SHAM. Para as expressões gênicas de TLR-2, NF-kB e ER α e ER β resultado similar foi observado nos modelos SHAM e OVX entre infectados e salina estéril. As comparações entre as células infectadas dos modelos SHAM, OVX e OVX tratados com E2 também apresentaram maiores níveis de citocinas e marcadores inflamatórios e expressões gênicas para células do modelo SHAM, com exceção apenas para expressão do ER β . Para os experimentos em humanos: *In vivo*, todos os sujeitos de pesquisa selecionados estavam saudáveis, porém foi observado maior concentração de glicose, colesterol total, LDL e TGP nas mulheres na fase de menopausa e maior concentração de leucócitos nas mulheres em período fértil. Para a dosagem sérica dos hormônios sexuais foi observado que mulheres em período fértil apresentaram maiores concentrações de 17 β -estradiol e progesterona, enquanto as mulheres na menopausa, concentrações elevadas dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). *In vitro*, os hPMs infectados com *G. vaginalis* de mulheres no período reprodutivo e na menopausa apresentaram maiores níveis de nitritos totais, H₂O₂ e citocinas quando comparado com salina. Entretanto, os hPMs infectados de mulheres na menopausa apresentaram maiores níveis de H₂O₂ em comparação com hPMs de mulheres no período reprodutivo. Em se tratando das citocinas as células tratadas com E2 não se equipararam às com E2 endógeno, exceto IL-10. Conclusão: Aos experimentos em animais e humanos, em relação à influência do E2 na resposta inflamatória aguda ao desafio, *in vitro*, por *G. vaginalis*, observa-se que o hormônio apresenta característica imunomodulatória, mas não podendo ser,

exclusivamente, definida como pró ou antiinflamatória. Neste estudo, para o E2 endógeno, todas as citocinas, marcadores inflamatórios e expressões gênicas apresentaram maiores níveis, tanto em MPMs quanto para hPMs. Ao tratamento com E2, os MPMs de fêmeas OVX e hPMS de mulheres na menopausa apresentaram similaridade de resposta para os níveis de IL-10 em relação as células com E2 endógeno, indicando uma ação anti-inflamatória. Porém, os genes de reconhecimento e desencadeamento de inflamação aguda também apresentaram similaridade entre MPMs tratadas com E2 em relação às células com E2 exógeno. Influências fisiológicas, como a progesterona endógena, podem contribuir para que células apresentem características de resposta inflamatória aguda, e o tratamento de células, exclusivamente com E2, não tenha resultado em uma equiparação de resposta de células com hormônios sexuais endógenos. Entretanto, o E2 apresentou característica bacteriostática em relação a proliferação *G. vaginalis*, podendo este hormônio modular fatores de virulência deste microrganismo, assim, contribuindo para uma ausente ou discreta resposta imunológicas no curso da vaginose bacteriana.

Palavras-chave: Estradiol, *Gardnerella vaginalis*, resposta inflamatória

ABSTRACT

BITTENCOURT, Rafaela de Souza. **Evaluation of the influence of estradiol on immune response mechanisms in monocytes/macrophages induced by *Gardnerella vaginalis***. 2021, 105 p. Tese (Doutorado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2021.

Gardnerella vaginalis is a commensal bacterium of the vaginal microbiota and the main agent of bacterial vaginosis (BV), a vaginal infection established due to an imbalance in this ecosystem. The pathogenesis of bacterial vaginosis is not well established; however, it is considered the main vaginal disorder that affects women of reproductive age, which may hypothesize the influence of female sex hormones in its pathogenesis. Objective: To evaluate the influence of 17 β -estradiol (E2) on the immune response induced by *Gardnerella vaginalis* in *in vitro* models of female murine peritoneal macrophages (MPMs) and human peripheral blood monocytes (hPMs) from women, with or without physiological ovarian activity. Methodology: *in vivo* and *in vitro* experiments were carried out. For the *in vivo* experiments in animals, the following were performed: body weight, uterine index and estradiol dosage; and in humans, laboratory tests such as blood count, biochemical and hormonal tests were performed. For the *in vitro* experiments, peritoneal macrophages from BALB/C sham surgery (SHAM) or ovariectomized (OVX) females and human peripheral blood monocytes (hPMs) from fertile and menopausal women were subdivided into three groups: cells inoculated with *G. vaginalis*, cells with sterile saline, both for 6 hours, and cells pretreated with 17 β -Estradiol (E2), for 6 hours, and inoculated with *G. vaginalis*, also for 6 hours. Inflammatory markers such as: cytokines GM-CSF, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-23, IL-27 and IL-10, total nitrites, hydrogen peroxide (H₂O₂), were measured in culture supernatant, and the expression of TLR-2, NF-kB and ER α and ER β genes. In addition, a growth curve was performed in two groups. Group one, with only *G. vaginalis* and group two, *G. vaginalis* with 17 β -estradiol, for a period of 24 hours. Results: For the analysis of the growth curve, the inhibitory activity of E2 on *G. vaginalis* can be verified. For animal experiments: *In vivo*, SHAM females had higher uterine weight and higher estradiol concentration, while OVX females had higher body weight. *In vitro*, the concentration of cytokines, IL-6, IL-8, IL-10 and inflammatory markers, total nitrites and (H₂O₂), showed high levels in MPMs of SHAM and OVX females inoculated with *G. vaginalis* when compared to *G. vaginalis* with sterile saline. When treated with E2, the MPMs of OVX females showed higher levels of IL-10 and hydrogen peroxide, when compared to untreated OVX. However, only the hydrogen peroxide matched the MPMs of the SHAM females. Similar results were observed for gene expressions of TLR-2, NF-kB and ER α and ER β in the SHAM and OVX models between infected and sterile saline. Comparisons between infected cells from the SHAM, OVX and OVX treated with E2 models also showed higher levels of cytokines and inflammatory markers and gene expressions for cells from the SHAM model, with the exception only for the expression of ER β . For the human experiments: *In vivo*, all selected research subjects were healthy, but a higher concentration of glucose, total cholesterol, LDL and TGP was observed in menopausal women and a higher concentration of leukocytes in women in their fertile period. For the serum dosage of sex hormones, it was observed that women in the fertile period had higher concentrations of 17 β -estradiol and progesterone, while women in menopause had high concentrations of follicle-stimulating (FSH) and luteinizing (LH) hormones. *In vitro*, hPMs infected with *G. vaginalis* from women in the reproductive period and menopause showed higher levels of total nitrites, H₂O₂ and cytokines when compared to saline. However, infected hPMs from menopausal women had higher levels of H₂O₂ compared to hPMs from women in the reproductive period. With regard to cytokines, cells treated with E2 did not match those with endogenous E2, except for IL-10. Conclusion: In animal and human experiments, in relation to the influence of E2 on the acute inflammatory response to *G. vaginalis*, it is observed that the hormone has an immunomodulatory characteristic, but it cannot be exclusively defined as pro or anti-inflammatory. In this study, for endogenous E2, all cytokines, inflammatory markers and gene expressions showed higher levels, both in MPMs and hPMs. When treated with E2, MPMs from OVX females and hPMS from menopausal women showed similar response for IL-10 levels in relation to cells with endogenous E2, indicating an anti-inflammatory action. However, acute inflammation

recognition and triggering genes also showed similarity between MPMs treated with E2 and cells with exogenous E2. Physiological influences, such as endogenous progesterone, may contribute for cells to present characteristics of an acute inflammatory response, and the treatment of cells, exclusively with E2, has not resulted in an equivalence of cell response with endogenous sex hormones. However, E2 showed a bacteriostatic characteristic in relation to *G. vaginalis* proliferation, and this hormone can modulate virulence factors of this microorganism, thus contributing to an absent or discrete immune response in the course of bacterial vaginosis.

Keywords: Estradiol, Gardnerella vaginalis, inflammatory response

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** O microbioma vaginal Adaptado MUHLEISEN, HERBST-KRALOVETZ, 2016.
- Figura 2.** Curva de crescimento da *G. vaginalis* (UFC 108). *G. vaginalis* reativo em BHI por 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Curva Controle Positivo, *G. vaginalis* (1mL) em meio BHI (100mL). Curva Tratamento (E2) *G. vaginalis* (1mL) em meio BHI (100mL) + 17β-estradiol [10⁻⁷M] (5,25mL), mantidas a 37°C com 5% de CO₂ por um período de zero a vinte e quatro horas (T0-T24). (a) Leitura da absorbância; (b) Contagem manual de colônias. Os dados são expressos como média ± DPM. ** p<0,01, ***p<0,001.
- Figura 3.** Avaliação da eficácia da ovariectomia. (a) Peso do útero corrigido pelo peso corporal de camundongos fêmeas SHAM e OVX. (b) Dosagem de 17β-estradiol no soro das fêmeas SHAM e OVX. (c) Peso corporal de camundongos fêmeas SHAM e OVX. Dados são expressos como média± DPM.*p<0,05, ***p<0,001.
- Figura 4.** Concentração de citocinas IL-6 (a) e (b), IL-8 (c) e (d), IL-10 (e) em sobrenadante de cultura de MPMs (2x10⁵/mL) de fêmeas SHAM e OVX. MPMs inoculados com 10μl *G. vaginalis* (GV) (10⁸ UFC), grupos: (SHAM + GV) e (OVX + GV) ou 10μl salina estéril, grupos: (SHAM + SALINA) e (OVX + SALINA). Todos os experimentos foram relaziados pelo tempo de seis horas. Avaliação realizada por ELISA. Dados são expressos como média ± DPM. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001.
- Figura 5.** Concentração de citocinas IL-6 (a), IL-8 (b) e IL-10 (c) no sobrenadante de MPMs (2x10⁵/mL) de fêmeas SHAM e OVX. MPMs inoculados com 10μl *G. vaginalis* (GV) (10⁸ UFC), por 6 horas, grupos: (SHAM + GV) e (OVX + GV). MPMs de fêmeas OVX pré-tratadas com 100μl 17β-estradiol (E2) (10⁻⁷ M), por 6 horas e inoculados 10μl *G. vaginalis* (GV), pelo tempo de seis horas, grupo: (OVX + E2 + GV). Avaliação realizada por ELISA. Dados são expressos como média ± DPM. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001.
- Figura 6.** Concentração de nitritos totais (a) e (b) e peróxido de hidrogênio (c) e (d) em sobrenadante de cultura de MPMs (2x10⁵/mL) de fêmeas SHAM e OVX. MPMs inoculados com 10μl *G. vaginalis* (GV) (10⁸

UFC), grupos: (SHAM + GV) e (OVX + GV) ou 10µl salina estéril, grupos: (SHAM + SALINA) e (OVX + SALINA). Todos os experimentos foram realizados pelo tempo de seis horas. Avaliação realizada por reação de Griess para nitrito totais e Kits comerciais para peróxido de hidrogênio. Dados são expressos como média ± DPM. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001.

Figura 7. Concentração nitritos totais (a) e peróxido de hidrogênio (b) no sobrenadante de MPMs (2×10^5 /mL) de fêmeas SHAM e OVX. MPMs inoculados com 10µl *G. vaginalis* (GV) (10^8 UFC), por 6 horas, grupos: (SHAM + GV) e (OVX + GV). MPMs de fêmeas OVX pré-tratadas com 100µl 17β-estradiol (E2) (10^{-7} M), por 6 horas e inoculados 10µl *G. vaginalis* (GV), todos pelo tempo de seis horas, grupo: (OVX + E2 + GV). Avaliação realizada por reação de Griess para nitrito totais e Kits comerciais para peróxido de hidrogênio. Dados são expressos como média ± DPM. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001.

Figura 8. Expressão gênica relativa TLR2 (a) e (b) e NF-κB (c) e (d) em MPMs de cultura celular (2×10^5 /mL) de fêmeas SHAM e OVX. MPMs inoculados com 10µl *G. vaginalis* (GV) (10^8 UFC), grupos: (SHAM + GV) e (OVX + GV) ou 10µl salina estéril, grupos: (SHAM + SALINA) e (OVX + SALINA). Todos os experimentos foram realizados pelo tempo de seis horas. Avaliação realizada por RT-qPCR array. Dados são expressos como média ± DPM. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001.

Figura 9. Expressão gênica relativa TLR2 (a) e NF-κB (b) em MPMs de cultura celular (2×10^5 /mL) de fêmeas SHAM e OVX. MPMs inoculados com 10µl *G. vaginalis* (GV) (10^8 UFC), por 6 horas, grupos: (SHAM + GV) e (OVX + GV). MPMs de fêmeas OVX pré-tratadas com 100µl 17β-estradiol (E2) (10^{-7} M), por 6 horas e inoculados 10µl *G. vaginalis* (GV), pelo tempo de seis horas, grupo: (OVX + E2 + GV). Avaliação realizada por RT-qPCR array. Dados são expressos como média ± DPM. *p<0,05, **p<0,01 e ***p<0,001.

Figura 10. Expressão gênica relativa ER-α (a) e (b) e ER-β (c) e (d) em MPMs de cultura celular (2×10^5 /mL) de fêmeas SHAM e OVX. MPMs inoculados com 10µl *G. vaginalis* (GV) (10^8 UFC), grupos: (SHAM + GV) e (OVX + GV) ou 10µl salina estéril, grupos: (SHAM + SALINA) e (OVX + SALINA). Todos os experimentos foram realizados pelo tempo de seis horas. Avaliação realizada por RT-

qPCR array. Dados são expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Figura 11. Expressão gênica relativa ER- α (a) e ER- β (b) em MPMs de cultura celular (2×10^5 /mL) de fêmeas SHAM e OVX. MPMs inoculados com $10 \mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV) (10^8 UFC), por 6 horas, grupos: (SHAM + GV) e (OVX + GV). MPMs de fêmeas OVX pré-tratadas com $100 \mu\text{l}$ 17β -estradiol (E2) (10^{-7} M), por 6 horas e inoculados $10 \mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV), pelo tempo de seis horas, grupo: (OVX + E2 + GV). Avaliação realizada por RT-qPCR array. Dados são expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Figura 12. Concentração dos hormônios sexuais femininos entre mulheres na fase reprodutiva e da pós-menopausa. (a) Concentração sérica de estradiol (E2), (b) Concentração sérica de progesterona, (c) Concentração sérica de FSH (Hormônio folículo estimulante), (d) Concentração sérica de LH (Hormônio luteinizante). Os dados são expressos como média \pm DPM. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,01$

Figura 13. Concentração de citocinas GM-CSF (a), IL-1 β (b), TNF- α (c), IL-6 (d), IL-12 (e), IL-23 (f), IL-27 (g) (o) e IL-10 (h) em sobrenadante de cultura de hPMs (2×10^5 /mL) de mulheres em período fértil. hPMs inoculados com $10 \mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV) (10^8 UFC), grupos: (FÉRTIL + GV) ou $10 \mu\text{l}$ salina estéril, grupos: (FÉRTIL + SALINA). Todos os experimentos foram realizados pelo tempo de seis horas. Avaliação realizada por ELISA. Dados são expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Figura 14. Concentração de citocinas GM-CSF (a), IL-1 β (b), TNF- α (c), IL-6 (d), IL-12 (e), IL-23 (f), IL-27 (g) (o) e IL-10 (h) em sobrenadante de cultura de hPMs (2×10^5 /mL) de mulheres em período da menopausa. hPMs inoculados com $10 \mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV) (10^8 UFC), grupos: (MENOPAUSA + GV) ou $10 \mu\text{l}$ salina estéril, grupos: (MENOPAUSAL + SALINA). Todos os experimentos foram realizados pelo tempo de seis horas. Avaliação realizada por ELISA. Dados são expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Figura 15. Concentração de citocinas GM-CSF (a) IL-1 β (b), TNF- α (c), IL-6 (d) IL-12 (e), IL-23 (f), IL-27 (g) e IL-10 (h) no sobrenadante de hPMs (2×10^5 /mL) de mulheres em período fértil e menopausa, respectivamente. hPMs inoculados com $10 \mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV) (10^8 UFC), por 6 horas, grupos: (FÉRTIL + GV) e (MENOPAUSA + GV). hPMs de mulheres na menopausa pré-tratadas com $100 \mu\text{l}$ 17β -

estradiol (E2) (10^{-7} M), por 6 horas e inoculados $10\mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV), pelo tempo de seis horas, grupo: (MENOPAUSA + E2 + GV). Avaliação realizada por ELISA. Dados são expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Figura 16. Concentração de nitritos totais (a) e (b) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (c) e (d) em sobrenadante de cultura de hPMs ($2 \times 10^5/\text{mL}$) de mulheres em período fértil e menopausa. hPMs inoculados com $10\mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV) (10^8 UFC), grupos: (FÉRTIL + GV) e (MENOPAUSA + GV) ou $10\mu\text{l}$ salina estéril, grupos: (FÉRTIL + SALINA) e (MENOPAUSA + SALINA). Todos os experimentos foram realizados pelo tempo de seis horas. Avaliação realizada por reação de Griess para nitrito totais e Kits comerciais para peróxido de hidrogênio. Dados são expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Figura 17. Concentração nitritos totais (a) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (b) no sobrenadante de hPMs ($2 \times 10^5/\text{mL}$) de mulheres em período fértil e menopausa. hPMs inoculados com $10\mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV) (10^8 UFC), por 6 horas, grupos: (FÉRTIL + GV) e (MENOPAUSA + GV). hPMs de mulheres na menopausa pré-tratadas com $100\mu\text{l}$ 17β -estradiol (E2) (10^{-7} M), por 6 horas e inoculados $10\mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV), todos pelo tempo de seis horas, grupo: (MENOPAUSA + E2 + GV). Avaliação realizada por reação de Griess para nitrito totais e Kits comerciais para peróxido de hidrogênio. Dados são expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHI: *Brain Heart Infusion*

CAAE: Certificado de Apresentação para Apreciação Ética

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CEUA: Comitê de Ética no Uso de Animais

E2: 17 β -estradiol

EEC *European Community Guidelines*

EDTA: *Ethylenediamine Tetraacetic Acid*

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)

EPI: Equipamento de Proteção Individual

ER α : *Estrogen Receptor Alpha* (Receptor Estrogênico Alfa)

ER β : *Estrogen Receptor Beta* (Receptor Estrogênico Beta)

FBS: *Fetal Bovine Serum* (Soro Fetal Bovino)

FSH: *Follicle-Stimulating Hormone* (Hormônio Folículo-estimulante)

GAPDH: *Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*

GM-CSF: *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos)

HEPES: *4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic Acid*

hPMs - Monócitos humanos do sangue periférico

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-23: Interleucina 23

IL-27: Interleucina 27

LH: *Luteinizing Hormone* (Hormônio Luteinizante)

MPMs: Macrófagos Peritoneais Murinos

OVX: Fêmeas Ovariectomizadas

PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cell* (Células Mononucleares do Sangue Periférico)

PBS: *Phosphate-Buffered Saline*

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute (culture medium)*

RT-qPCR: *Reverse transcription Quantitative PCR*

SFB: Soro Fetal Bovino

SHAM: Fêmeas submetidas a operação simulada (operação sham)

SPF: *Specific-pathogen-free*

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TGO: Transaminase Glutâmico-Oxalacética

TGP: Transaminase Glutâmico-Pirúvica

TLR2: Toll-like Receptor 2

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor Alpha* (Fator de Necrose Tumoral Alfa)

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

VB: Vaginose bacteriana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 <i>Microbiota vaginal</i>	23
2.2 Vaginose Bacteriana	25
2.3 <i>Gardnerella vaginalis</i>	27
2.4 Resposta imunológica contra <i>G. vaginalis</i>	28
2.5 Estrógeno e defesa imunológica	31
2.6 Papel dos Monócitos/Macrófagos na resposta imune	34
3 OBJETIVO	38
3.1 Objetivo geral	38
3.2 Objetivos específicos	38
4 METODOLOGIA	40
4.1 <i>G. vaginalis</i>	40
4.2 Efeito do 17 β -estradiol sobre a curva de crescimento <i>G. vaginalis</i>	40
4.3 Experimentos com Camundongos	40
4.3.1 Aspectos legais	40
4.3.2 Animais	41
4.3.3 Ovariectomia	41
4.3.4 Citologia vaginal	41
4.3.5 Obtenção de tecido uterino, lavado vaginal	42
4.3.6 Obtenção do sangue para dosagem de 17 β -estradiol	42
4.3.7 Isolamento de Macrófagos Peritoneais Murinos (MPMs)	42
4.3.7.1 Inoculação de MPMs com <i>G. vaginalis</i> (GV) ou solução salina estéril e tratamento com 17 β -estradiol (E2)	42
4.3.7.2 Dosagem de citocinas	43
4.3.7.3 Concentração de nitritos totais	43
4.3.7.4 Dosagem de peróxido de hidrogênio	44
4.3.7.5 Expressão gênica de receptores e fator de transcrição por RT- qPCR	44
4.4.1 Aspectos éticos e legais	44
4.4.2 Seleção dos sujeitos da pesquisa	45
4.4.3 Coleta de sangue periférico dos sujeitos de pesquisa	46
4.4.3.1 Isolamento de monócitos periféricos humanos (hPMs)	46
4.4.3.2 Inoculação de hPMs com <i>G. vaginalis</i> ou solução salina estéril e tratamento com 17 β -estradiol	47

4. 4.3.3 Dosagem de citocinas	48
4.4.3.4 Concentração de nitritos totais.....	48
4.4.3.5 Dosagem de peróxido de hidrogênio	48
4.5 Análise Estatística	48
5 RESULTADOS.....	50
5.1 Efeito do 17β-estradiol sobre a curva de crescimento <i>G. vaginalis</i>	50
5.2 Experimentos com Camundongos	51
5.2.1.1 Índice uterino, concentração sérica 17β-estradiol e peso corporal	51
5.2.2.1 Concentração de citocinas em MPMs de fêmeas SHAM e OVX.....	52
5.2.2.2 Concentração de citocinas em MPMs de fêmeas SHAM e OVX tratados ou não com 17β-estradiol (E2).....	53
5.2.2.3 Concentração de nitrito totais e peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em MPMs de fêmeas SHAM e OVX.....	54
5.2.2.4 Concentração de nitrito totais e peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em MPMs de fêmeas SHAM e OVX tratados ou não com 17β-estradiol (E2)	55
5.2.2.5 Expressão gênica relativa do receptor Toll-Like 2 (TLR2) e o Fator nuclear kappa (NF-κB) em MPMs de fêmeas SHAM e OVX.....	56
5.2.2.6 Expressão gênica relativa do receptor Toll-Like 2 (TLR2) e o Fator nuclear kappa (NF-κB) em MPMs de fêmeas SHAM e OVX tratados ou não com 17β-estradiol (E2)	57
5.2.2.7 Expressão gênica relativa dos receptores estrogênicos intracelulares alfa (ER-α) e beta (ER-β) em MPMs de fêmeas SHAM e OVX.....	58
5.2.2.8 Expressão gênica relativa dos receptores estrogênicos intracelulares alfa (ER-α) e beta (ER-β) em MPMs de fêmeas SHAM e OVX tratados ou não com 17β-estradiol (E2)	59
5.3 Experimentos com Seres Humanos	60
5.3.1 Modelo In vivo	60
5.3.1.1 Avaliação de saúde geral dos sujeitos da pesquisa.....	60
5.3.1.2 Níveis dos hormônios sexuais femininos das voluntárias	61
5.3.2 Modelo In vitro.....	62
5.3.2.1 Concentração de citocinas em hPMs de mulheres no período fértil.....	62
5.3.2.2 Concentração de citocinas em hPMs de mulheres na menopausa	63
5.3.2.2 Concentração de citocinas em hPMs de mulheres no período fértil e menopausa	65
tratados ou não com 17β-estradiol (E2).....	65
5.3.2.3 Concentração de nitrito totais e peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em hPMs de mulheres no período fértil e menopausa	67
5.3.2.4 Concentração de nitrito totais e peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em hPMs de mulheres no período fértil e menopausa tratados ou não com 17β-estradiol (E2).....	68
6 DISCUSSÃO	69
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	98

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO DE ESTADO DE SAÚDE	102
ANEXO A – PARECER DO CEUA.....	105

1 INTRODUÇÃO

A microbiota vaginal é composta por diversos microrganismos complexos com metabolismos interdependentes. É observado na literatura a descrição de seis estados comunitários (CSTs) dos quais quatro predominam *Lactobacillus spp.* enquanto dois não contêm um número significativos, mas sim uma predominância de bactérias anaeróbicas que podem ou não ser facultativos (PINES, 2015). Os estados comunitários dominados por *Lactobacillus spp.* são descritos como: CST – I (*L. crispatus*); CST-II (*L. iners*); CST-III (*L. gasseri*) e CST-V (*L. jensenii*). Já os não dominados pelos *Lactobacillus spp.* têm uma formação polimicrobiana, que incluem espécies dos gêneros *Gardnerella*; *Atopobium*; *Molibuncus*, *Prevotella* e outros *Clostridiales* e são descritos como, CST-IVa e CST-IVb ou apenas CST-IV (GUATAM et al 2015).

A interação entre hospedeiro e as bactérias do ecossistema vaginal é dinâmica e o microbioma vaginal muda dramaticamente ao longo da vida da mulher em simultâneo com características hormonais e microanatômicas do epitélio vaginal. (MUHLEISEN, HERBST-KRALOVETZ, 2016). No período pré-menopausa predomina o estado comunitário vaginal saudável (CST I, II, III E V) (SMITH, RAVEL, 2017), enquanto, durante a menopausa ocorre a predominância do estado comunitário CST-IV, microbiota característica de mulheres positivas para vaginose bacteriana. (MUHLEISEN, HERBST-KRALOVETZ, 2016).

O desequilíbrio neste ecossistema pode causar diversas doenças, dentre essas a vaginose bacteriana (VB) (DACTU, 2014). Um distúrbio polimicrobiano caracterizado pela redução da colonização dos *lactobacilli* juntamente com o crescimento excessivo de várias bactérias anaeróbicas ou facultativas (BARUAH, 2014). O microrganismo mais relacionado com o desenvolvimento da VB é a bactéria *Gardnerella vaginalis*. Bactéria gram-variável, sem a presença de flagelo, com pili, anaeróbica facultativa e com um grande poder de aderir ao epitélio vaginal formando um biofilme chamado de *clue cell*, que serve como um apoio para aderência para outras bactérias (CATLIN, 1992). *G. vaginalis* possui múltiplos fatores de virulência que podem desencadear desde a lise celular às alterações de mecanismos de defesa do hospedeiro, e esses fatores podem ter vários papéis distintos na patogênese mediada por essa bactéria. (CAUCI et al., 2002; CAUCI, 2004; GARCIA et al., 2019; MOHAMMADZADEH et al., 2019).

A vaginolisina (VLY) é o fator de virulência de *G. vaginalis* mais extensivamente estudado devido a sua natureza conservada dentro da espécie e sua associação com VB (GARCIA et al., 2019; CASTRO et al., 2015). Outros fatores de virulências determinados na

literatura são as enzimas hidrolíticas sialidase e prolidase (CAUCI et al., 2002; CAUCI, 2004; CASTRO et al., 2015). Com a estimulação microbiana inicia a cascata de sinalização para *G. vaginalis*, que podem ativar uma gama diversificada de receptores de reconhecimentos de padrões (RRPs), como o Toll -Like TLR2 (MARES et al 2008; MORRIL, GILBERT, LEWIS, 2020) e mediadores inflamatórios são liberados conforme as características microbiológicas vaginais (ANAHTAR et al., 2015; ROSE et al., 2012; SMITH; RAVEL, 2017). Níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias e fatores quimiotáticos são comumente encontrados nos estados comunitários CST-IV em relação aos CST-I, II, III e V (ROSE et al., 2012; ANAHTAR et al., 2015). Contudo, ocorre uma contradição entre o aumento dos níveis destas moléculas e umas das principais características da VB, uma resposta imune fraca ou inexistente devido a atenuação da cascata inflamatória (CAUCI, 2004; LEWIS et al., 2012; DATCU, 2014) SMITH, RAVEL, 2017). Várias hipóteses são levantadas em relação a ausência de resposta inflamatória (LEWIS et al., 2013), no entanto, uma está relacionada ao fato de a *G. vaginalis* compor parte da microbiota vaginal (CAUCI et al., 2002; CAUCI et al., 2004 CAUCI et al 2008) e outra aos fatores de virulência da bactéria que inibem fatores quimiotáticos e a função das células de defesa, suprimindo a cascata inflamatória (ABRAÃO, 1989; CAUCI et al., 2002; CAUCI et al., 2004 CAUCI et al 2008; MOHAMMADZADEH et al., 2019).

O desenvolvimento dessa infecção é na maioria dos casos assintomático, e quando apresenta sintomatologia, esta pode ser na presença de pouca ou total ausência de resposta inflamatória (ABRAÃO, 1989; GONDO et al, 2010), o que pode acarretar sérias consequências, como complicações durante a gravidez, aborto, parto prematuro, assim como, aumenta o risco de contrair infecções sexualmente transmissíveis (ISTs), incluindo o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (HERRERO, DOMINGO, 2016). A vaginose bacteriana, embora não seja considerada uma infecção sexualmente transmissível, é altamente relacionada com a atividade sexual (ZIRMMEMMANN et al., 2009; EREN et al., 2011; SCHWEBKE et al., 2014). A presença deste patógeno já foi constatado na uretra masculina e no fluido seminal, sugerindo-o como veículo de transmissão (ZIRMMEMMANN et al., 2009). Entretanto, Schwebke e colaboradores (2014) observaram a transmissão da *G. vaginalis*, por via sexual, sem exposição ao sêmen, em casais heterossexuais. Por analogia, esta hipótese é considerada devido a ocorrência de vaginose bacteriana entre mulheres que mantém relação sexual exclusivamente com mulheres, onde foi verificado que as parceiras sexuais compartilhavam as mesmas cepas de *G. vaginalis* (EREN et al., 2011).

No período reprodutivo, a proteção imunológica é atenuada no trato genital feminino durante a fase secretora desses hormônios (WIRA et al., 2010). Esta atenuação otimiza as condições de fertilização, porém cria uma janela de vulnerabilidade para o desenvolvimento de doenças (WIRA, RODRIGUEZ-GARCIA, PATEL, 2015). Em circunstâncias normais, ocorre uma harmonia entre os hormônios sexuais e os mecanismos de defesa (SMITH e RAVEL 2017). O equilíbrio necessita proporcionar um ambiente que concilie papéis, muitas vezes contraditório, de reprodução, devido ao trânsito de espermatozoides exógenos e o de defesa, com a eliminação de patógenos sexualmente transmissíveis, além de sustentar uma população de bactérias comensais que contribuem para manutenção das suas funções (LASSARTE et al., 2015). Na fase reprodutiva, a influência hormonal contribui para um perfil e resposta adaptativa mais robusta do tipo Th2 (WIRA, RODRIGUEZ-GARCIA, PATEL, 2015). Porém, com o avanço da idade e o estabelecimento da menopausa, a produção dos hormônios sexuais nos ovários cessa, o que altera a predominância da resposta do tipo Th2 para Th1. (GIEFIENG-KRÖLL et al., 2015). No geral, a imunossenescência exibe um número reduzido de linfócitos totais e células B circulantes, enquanto ocorre um aumento das células NK. Entre os hormônios sexuais, o estrogênio, especialmente 17 β -estradiol (E2), é reconhecido na literatura por sua ação anti-inflamatória (VILLA et al., 2015). A modulação imunológica ocorre por meio de receptores estrogênicos que são expressos na maioria das células do sistema inato e adaptativo, incluindo linfócitos T, B, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (DC) e o natural killer (NK) (ACHILLES et al., 2018).

A VB é umas das causas mais comuns de infecção vaginal em mulheres sexualmente ativas e em idade reprodutiva, fase em que ocorre os maiores níveis de hormônios sexuais (CASTRO et al., 2017). A patogênese da VB não está bem estabelecida, sendo referida como "um dos enigmas mais prevalentes no campo da medicina" (KENYON et al., 2013). Como, por exemplo, uma em cada três mulheres nos Estados Unidos, em fase de reprodução, obteve a prevalência da VB (SOPER, 2020), sugerido a possibilidade de os hormônios sexuais femininos estarem envolvidos na sua patogênese (HOLMES *et al.*, 1999; SCHWEBKE et al., 2014).

Com estas observações, este estudo tem como hipótese compreender a influência do 17 β -estradiol na patogênese desta doença. Para tanto, foi realizado experimentos com monócitos/macrófagos, *in vitro*, para analisar a influência o 17 β -estradiol na modulação da resposta imunológica contra *Gardnerella vaginalis* entre grupos com atividade estrogênica fisiológica e grupos com esta atividade estrogênica suprimida com e sem tratamento hormonal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Microbiota vaginal*

A microbiota vaginal é composta por inúmeros microrganismos e sofre modificações à medida em que se altera a fisiologia feminina (GUATAM et al 2015). É observado na literatura a descrição de seis estados comunitários (CSTs) dos quais quatro predominam *Lactobacillus spp* e dois com uma predominância de bactérias anaeróbicas que podem ou não ser facultativo (PINES, 2015). Os estados comunitários dominados por *Lactobacillus* são descritos como: CST – I (*L. crispatus*); CST-II (*L. iners*); CST-III (*L. gasseri*) e CST-V (*L. jenesenii*). Para os que não são dominados pelos *Lactobacilli* têm uma formação polimicrobiana, que incluem espécies dos gêneros *Gardnerella*; *Atopobium*; *Molibuncus*, *Prevotella* e outros *Clostridiales* e são descritos como, CST-IVa e CST-IVb ou apenas CST-IV (GUATAM et al 2015; SMITH, RAVEL, 2017).

A interação entre hospedeiro e as bactérias do ecossistema vaginal é dinâmica e o microbioma vaginal muda dramaticamente ao longo da vida da mulher em simultâneo com características hormonais e microanatômicas do epitélio vaginal (MUHLEISEN, HERBST-KRALOVETZ, 2016). Os tipos exatos de bactérias não foram semelhantes em mulheres na pré-menopausa e na perimenopausa, em comparação com as mulheres na pós-menopausa (PINES, 2015). As mulheres na puberdade produzem pouco estrógeno, o que resulta em baixos níveis de glicogênio, alta diversidade microbiana e alto pH vaginal. O epitélio vaginal, antes da puberdade, é escamoso delgado e estratificado (anucleado nas camadas superiores) e coberto com uma fina camada de muco (MUHLEISEN, HERBST-KRALOVETZ, 2016). Após a puberdade, no estado pré-menopausa, as mulheres estão produzindo altos níveis de estrógeno, resultando em mais depósitos de glicogênio nas células epiteliais e glicogênio livre disponível para *Lactobacillus spp*, desta forma, predominam estado comunitário vaginal saudável (CST I, II, III E V) (SMITH, RAVEL, 2017). Na fase pré-menopausa, o epitélio vaginal é mais espesso e coberto por uma espessa camada de muco (MUHLEISEN, HERBST-KRALOVETZ, 2016).

Durante os anos, referente à menopausa, com a queda nos níveis de estrógeno, hipoestrogenismo e diminuição do glicogênio o epitélio vaginal se assemelha ao estágio pré-puberdade com menos camadas e uma camada de muco mais fino. Em alguns casos, isso leva ao esgotamento de *Lactobacillus spp*. e um aumento em diversas espécies microbianas e estado comunitário (CST IV), que tem maior associação com sintomas vaginais que se

manifestam como atrofia vaginal, secura e dispareunia. Isso contrasta com as mulheres assintomáticas que são mais propensas a ter *Lactobacillus spp* vaginal e podem estar em terapia de reposição hormonal (TRH) sistêmica ou tópica com um moderado nível de estrogênio e glicogênio (MUHLEISEN, HERBST-KRALOVETZ, 2016; PINES, 2015).

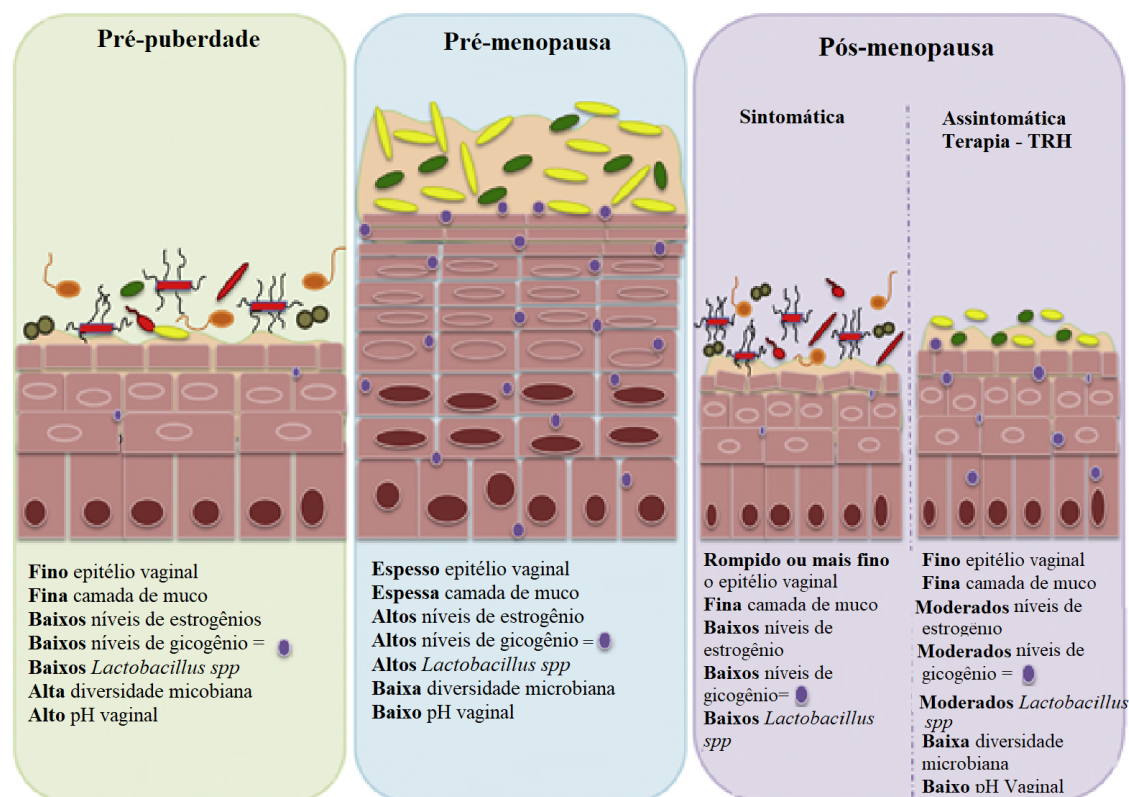


Figura. 1. O microbioma vaginal - **Antes da puberdade (painel esquerdo)**, as fêmeas produzem pouco estrogênio, o que resulta em baixos níveis de glicogênio, alta diversidade microbiana e alto pH vaginal. O epitélio vaginal anterior à puberdade é um epitélio escamoso estratificado delgado (anucleado nas camadas superiores) e coberto por uma fina camada de muco. **Após a puberdade no estado pré-menopausa (painel intermediário)**, altos níveis de estrogênio, resultando em mais depósitos de glicogênio nas células epiteliais e glicogênio livre disponível para *Lactobacillus spp.*, Predomínio de microbioma vaginal saudável (CST I, II, II e V). Os estados de diversidade microbiana (CST IV-A e IV-B - (CST IV)) encontrados em alguns estados saudáveis e disbióticos não são destacados pela simplicidade da figura. O epitélio vaginal é mais espesso e coberto por uma espessa camada de muco. **Fase da pós-menopausa (painel direito)**, os níveis de estrogênio caem, diminuindo o glicogênio e o epitélio vaginal se assemelha ao estágio de pré-puberdade, com menos camadas e uma camada mais fina de muco. Em alguns casos, isso leva à depleção de *Lactobacillus spp.* e um aumento em diversas espécies microbianas e estados da comunidade (CST IV-A e CST IV-B (CST IV)), que tem uma maior associação com sintomas vaginais (lado esquerdo do painel direito, pós-menopausa) que se manifestam como atrofia vaginal, secura e dispareunia. Isso contrasta com mulheres assintomáticas que têm maior probabilidade de apresentar *Lactobacillus spp* vaginal e em terapia de reposição hormonal tópica ou sistêmica (TRH; lado direito do painel direito, pós-menopausa) (Adaptado MUHLEISEN, HERBST-KRALOVETZ, 2016).

O estudo de Brotman e colaboradores (2014), identificou que mulheres na pós-menopausa tiveram uma chance 7,8 vezes maior de serem classificadas como CST IV-A ou

CST IV-B, ou simplesmente CST IV, sem números significativos de *Lactobacilli*, quando comparadas aos subgrupos bacterianos em mulheres na pré-menopausa. É na característica microbiológica do microbioma vaginal denominado estado comunitário CST IV, mais comum em mulheres no período da menopausa ou devido ao desequilíbrio microbiológico, que podem desenvolver diversas doenças vaginais (GUATAM et al 2015; PINES, 2015; SMITH, RAVEL, 2017). Entretanto, embora o estado comunitário CST IV seja mais predominante em período da vida mulher com menores níveis de estradiol (BROTMAN et al., 2014) é no período da vida reprodutiva, onde níveis de hormônios sexuais são mais elevados, que ocorre a principal desordem vaginal, a vaginose bacteriana (VB) (CASTRO et al, 2017; COHAN et al., 2012).

2.2 Vaginose Bacteriana

A vaginose bacteriana se estabelece em mulheres em idade reprodutiva devido ao desequilíbrio do microbioma vaginal, entretanto, este desequilíbrio ocorre por sob circunstâncias pouco esclarecidas, porém é identificado a depleção de *Lactobacilli* e aumento de micro-organismos anaeróbicos ou facultativos dependentes de um pH elevado (COHAN et al., 2012). Em condições homeostáticas, os microrganismos do microbioma vaginal mantêm uma relação mutualística com o hospedeiro (MACHADO et al., 2015). Esta relação é extremamente complexa tendo *Lactobacilli* como um agente microbiológico importante na homeostase deste ecossistema (COHAN et al., 2012).

A homeostasia vaginal ocorre pela produção do ácido láctico através da degradação do glicogênio liberada pelas células epiteliais da vagina sob influência do estrogênio (DATCU, 2014). Além do ácido láctico, o ambiente vaginal saudável ocorre também devido a produção de substâncias como Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) e bacteriocinas pelos *Lactobacilli*, que inibem o crescimento de microrganismos patogênicos existentes na microbiota (AROUTCHEVA et al., 2001a).

Microbiologicamente, a VB caracteriza-se de forma polimicrobiana, apresentando diversos patógenos relacionados ao seu desenvolvimento como: *Mycoplasma hominis*, *Peptostreptococcus species*, *Mobiluncus species*, *Prevotella species*, *Atopobium vagiae* e *Gardnerella vaginalis*, porém *G. vaginalis* é encontrada com predominância (BARUAH et al., 2014).

G. vaginalis é a primeira espécie a aderir ao epitélio vaginal formando *clue cell*, células-alvo ou indicadoras, caracterizadas por células epiteliais repletas de bactérias

(GILBERT, LEWIS, LEWIS, 2013). Essa especificidade à adesão epitelial fornece suporte para as outras espécies sendo um passo importante para formação de biofilme, desenvolvimento e na persistência de VB (DATCU, 2014). Clinicamente a VB é considerada uma síndrome em mulheres apresentando, em sua maioria, um quadro assintomático. Porém, quando sintomáticas, apresentam sintomatologia como prurido, ardor, fluido vaginal de coloração branco-acinzentada com pequenas bolhas e odor fétido (GILBERT, LEWIS, LEWIS, 2013). Este odor é decorrente da produção das aminas aromáticas por estas bactérias. As principais aminas são as cadaverinas e putrinas que, quando volatizadas, conferem o mau odor genital (GONDO et al., 2010; EREN et al., 2011). O quadro clínico da VB também pode evoluir para complicações graves como infertilidade, salpingites, endometrite, doença infecciosa pélvica (DIP), ruptura prematura de membranas, aborto e aumento do risco de infecção pelo HIV, assim como outras ISTs (HERRERO, DOMINGO, 2016).

Para o diagnóstico da vaginose bacteriana, os métodos mais utilizados são através da coloração de Gram, considerado padrão-ouro para o diagnóstico microbiológico, sendo avaliado pela classificação do gradiente de Nugent e os critérios clínicos de Amsel (ASMEL et al., 1983; TONINATO, 2016). Em relação a classificação do gradiente de Nugent, fundamenta-se principalmente na observação quantitativa de determinados morfotipos na bacterioscopia de Gram (TONINATO, 2016). A predominância ou não dos *Lactobacilli* estabelece claramente a normalidade do ecossistema. Uma microbiota vaginal saudável tem cerca de 85% de *Lactobacilli* (escore 0 a 3), uma zona de transição ou de indefinição, equilíbrio entre *Lactobacilli* e microbiota cocoide, (escore de 4 a 6) e uma completa desestruturação do equilíbrio, apresentando ausência quase completa de *Lactobacilli* com presença de microbiota cocoide – vaginose bacteriana (escore 7 a 10) (GIRALDO et al., 2008; NUGENT, KROHN, HILLIER, 1991). De acordo com os critérios clínicos de Asmel, para estabelecer diagnóstico de VB, devem estar presentes ao menos três das quatro condições a seguir: a) características do fluido genital; b) hidróxido de potássio (KOH) positivo, teste das aminas; c) pH vaginal > 4,5 e d) presença de células-alvo (clue cells). Destes critérios a presença de células-alvo é a característica mais específica e sensível de VB (ASMEL et al., 1983; ZEIRMMEMMANN et al., 2009).

Epidemiologicamente a VB, como o principal distúrbio vaginal, apresenta uma prevalência mundial próxima de 76,8% das mulheres na faixa etária reprodutiva (BARUAH et al., 2014). Nos Estados Unidos uma em cada três mulheres apresentam vaginose bacteriana (GILBERT, LEWIS, LEWIS, 2013; SOPER, 2020). Na África do Sul cursa com prevalência de cerca de 58.3%, no Brasil pode-se alcançar cerca 21.6% em mulheres com uma média de idade

24.8 (KENYON, COLEBUNDERS, CRUCITTI, 2013). A vaginose bacteriana, embora a prevalência varie em diferentes regiões, representa o ônus econômico global do tratamento sintomático estimado em U\$ 4,8 bilhões anuais (JOSEPH et al., 2021). Embora *G. vaginalis* seja um microrganismo que compõe a microbiota vaginal, diversos estudos demonstraram a presença deste patógeno na uretra masculina e no fluido seminal, sugerindo que o trato urogenital masculino seja um possível reservatório. (SCHWEBKE et al., 2014; ZIRMMEMMANN et al., 2009). Tem sido estudado que o sêmen, por causa de suas propriedades alcalinas, pode alterar o pH ácido da vagina e levar ao desenvolvimento da VB (SCHWEBKE et al., 2014). No entanto, estudos relatam a transmissão da *G. vaginalis* e estabelecimento da VB, por via sexual sem exposição ao sêmen em casais heterossexual, mas sim microrganismos transmitidos através da atividade sexual (SCHWEBKE et al., 2014). Por analogia, esta hipótese é considerada devido a ocorrência de vaginose bacteriana entre mulheres que mantêm relação sexual exclusivamente com mulheres, na qual foi verificada que as parceiras sexuais compartilhavam as mesmas cepas de *G. vaginalis* (EREN et al., 2011).

2.3 *Gardnerella vaginalis*

Em 1894, Döderlein descreveu alterações na microbiota vaginal de etiologia desconhecida, determinada como "vaginite não específica", em mulheres com queixas de um fluido fino e esbranquiado. Foi observado que nessas mulheres *Lactobacilli* típicos, conhecidos como bacilos Döderlein, estavam suprimidos e esses foram substituídos por bactérias de diferentes morfologias (DATCU, 2014). Apenas em 1955 que os pesquisadores Gardner e Dukes identificaram o que poderia ser o agente causador dessa infecção, que havia sido reclassificado, anteriormente, por Greenwood e Picket para a atualmente conhecida *Gardnerella vaginalis* (GARDNER, DUKES, 1955).

G. vaginalis é uma bactéria gram variável e beta-hemolítica, caracterizada gram positiva durante sua fase de crescimento exponencial alterando sua morfologia para gram negativa à medida que a cultura envelhece (CATLIN, 1992). São pleomórficas e pequenas. Suas dimensões médias são 0,4 por 1,0 a 1,5µm. A camada externa é revestida por material microcapsular, descrito como exopolissacarídeo fibrilar com um importante papel na aderência de *G. vaginalis* às células epiteliais da vagina e na formação do biofilme. Esta bactéria possui pilli e não possuem flagelos, caracterizando-as como imóveis (CATLIN, 1992). A parede celular contém alanina, ácido glutâmico, glicina e lisina e a membrana celular

contém predominantemente ácidos hexadecanóico e octadecanóico, sem ácidos graxos hidroxilados (SPIEGEL, 1991).

G. vaginalis possui múltiplos fatores de virulência, podem desencadear desde a lise celular às alterações de mecanismos de defesa do hospedeiro, e esses fatores podem ter vários papéis distintos na patogênese mediada por essa bactéria. (CAUCI et al., 2002; CAUCI, 2004; GARCIA et al., 2019; MOHAMMADZADEH et al., 2019). Entre os fatores de virulência está uma toxina com função hemolítica específica para eritrócitos humanos, vaginolisina (MOHAMMADZADEH et al., 2019; MORAN et al., 1991). Apresenta, também, ação de lise para células nucleadas, como células tecido epitelial humano e neutrófilos humanos (MOHAMMADZADEH et al., 2019; MORAN et al., 1991; ROTTINI et al., 1990; SPIEGEL, 1991). Para as células tecido epitelial humano a atividade foi confirmada pela liberação de cromo 51(51Cr), um marcador de lesão celular, enquanto que os neutrófilos foram testados pela captação azul de tripan (ROTTINI et al., 1990; SPIEGEL, 1991).

A vaginolisina (VLY) é o fator de virulência de *G. vaginalis* mais extensivamente estudado devido à sua natureza conservada dentro da espécie e sua associação com VB (GARCIA et al., 2019; CASTRO et al., 2015). Caracterizada como uma citolisina formadora de poros dependente de colesterol (CDC) devido à sua similaridade de sequência com outros CDCs, que reconhece a molécula reguladora do complemento, CD59, na superfície das células humanas (MOHAMMADZADEH et al., 2019). Outros fatores de virulências determinados na literatura são as enzimas hidrolíticas sialidase e prolidase (CAUCI et al., 2002; CAUCI, 2004; CASTRO et al., 2015). A sialidase remove enzimaticamente resíduos de ácido siálico terminais de diferentes glicoconjugados tais como: mucinas, fibronectinas e moléculas de adesão celular. (CAUCI et al., 2002; CAUCI et al., 2004). Prolidases são enzimas proteolíticas que (CAUCI et al., 2004), assim como a sialidase, altera componentes da matriz extracelular, como as mucinas (CAUCI et al., 2002). Ambas fornecem nutrição às bactérias e melhora sua capacidade de evasão do sistema imunológico do hospedeiro e de interações (CAUCI et al 2008).

2.4 Resposta imunológica contra *G. vaginalis*

A manutenção da homeostase do trato genital inferior feminino é realizada por diferentes elementos da microbiota vaginal e por diferentes mecanismos de defesa presentes nas secreções e na mucosa (WIRA et al 2010). Esses mecanismos podem ser tanto inespecíficos, como a barreira epitelial, mucosa vaginal, presença de *lactobacilli*, acidez do

pH vaginal, as células fagocíticas, reação inflamatória e a produção de citocinas para ação da resposta imune celular e a humoral (WITKIN et al., 2007; LIBBY et al., 2008). A vigilância no trato genital feminino, seja contra microrganismos comensais ou patogênicos, ocorre através dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como os Toll Like (TLRs) (MORRIL, GILBERT, LEWIS, 2020; WIRA et al 2010). A estimulação microbiana inicia a cascata de sinalização para *G. vaginalis*, devido aos constituintes da parede celular de *G. vaginalis* os quais podem ativar uma gama diversificada de receptores de reconhecimento de padrões (RRPs), como o Toll -Like TLR2 (MARES et al 2008).

Ao ser ativado, o TLR2 sinaliza através da molécula adaptadora MYD88 (proteína 88 de resposta primária à diferenciação mielóide) que, por sua vez, desencadeia a ativação de IRAK4 (quinase associada a IL-1R 4) e TRAF6 (fator 6 associado a TNFR), levando à ativação de NF- κ B (fator nuclear κ B), C/EBP β/δ (CCAAT/proteína potenciadora de ligação β/δ) e MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógeno), como JNK, p38 e ERK1 (quinase 1 regulada por sinal extracelular) ou ERK2. O TLR2 também usa o TIRAP (proteína adaptadora que contém o domínio TIR) para iniciar a sinalização. (MILLER; CHO, 2011; SOUZA, 2019)

Após o reconhecimento, a resposta imunológica e seus mediadores inflamatórios são liberados conforme as características microbiológicas vaginais e os estados comunitários (ANAHTAR et al., 2015; ROSE et al., 2012; SMITH; RAVEL, 2017.). Níveis mais elevados de IL-1 α , IL-1 β e IL-8 e outras, comumente encontrados em CST-IV em relação às comunidades dominadas por *L. crispatus* (CST-I), enquanto as comunidades dominantes de *L. incessans* (CST -III) induziram níveis moderados de IL-8 em relação ao *CST-I* (SMITH; RAVEL, 2016). Observa-se, também, aumentos significativos em IL-1 α , IL-1 β e TNF- α em mulheres que passaram de um CST-I para CST-III e para um CST-IV (ANAHTAR et al., 2015). Por outro lado, as comunidades dominadas por *L. crispatus* (CST-I) e *L. jensenii* (CST-V) em modelos epiteliais vaginais não induzem fortemente a secreção de citocinas IL-1 β ou IL-8 e inibem algumas respostas pró-inflamatórias após a indução de TLR 2/6 e 3 agonistas (ROSE et al., 2012).

O estado comunitário CST-IV, característico do quadro clínico da vaginose bacteriana, potencialmente tem uma resposta pró-inflamatória maior do que CST-I ou CST-II, com aumentos significativos em IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-8, IL-10, IL-12p70, entretanto, ocorre uma contradição entre o aumento dos níveis destas moléculas e umas das principais características da VB que é uma resposta imune fraca ou inexistente devido a atenuação da cascata inflamatória (CAUCI, 2004; SMITH, RAVEL, 2017), assim como,

leucócitos polimorfonucleares nos conteúdos vaginais ser pequeno ou até mesmo ausente (DATCU, 2014).

Existem diversas hipóteses que são feitas em relação a ausência de resposta inflamatória. Uma hipótese está relacionada ao fato desses agentes infecciosos fazerem parte da microbiota vaginal. Outra hipótese está relacionada ao fato de os microrganismos serem capazes de liberar substâncias que inibem fatores quimiotáticos e a função das células de defesa (ABRAÃO, 1989). Os fatores de virulência da *G. vaginalis* interage modulando a ação imunológica. A interação da citolisina vaginolisina e a molécula CD59 forma o complexo VLY-CD59, que altera a atividade do sistema complemento inibindo a formação do complexo de ataque à membrana do complemento (MAC) devido a capacidade do CD59 de ligar-se às proteínas do complemento C8 α e C9 (MOHAMMADZADEH et al., 2019). As enzimas hidrolíticas, sialidase e prolidase suprimem a cascata inflamatória que deveria ser desencadeada através da IL-1 β . Esta supressão afeta, diretamente, a expressão das citocinas da cascata pró-inflamatória, como a IL-8 ou seus receptores (CXCR1 e -2), que justificaria a supressão da resposta imune inespecífica (CAUCI et al., 2002; CAUCI et al. 2008). A supressão da IL-8 justificaria a ausência do aumento de neutrófilos, que são as células mais importantes na defesa vaginal. (CAUCI et al., 2002; CAUCI et al., 2004)

A imunidade inata como um precursor necessário para o estabelecimento da resposta imune adaptativa e em mulheres com VB a resposta adaptativa está fortemente correlacionada na produção da imunoglobulina A contra a citolisina produzida pela *Gardnerella vaginalis* (anti-Gvh IgA) (CAUCI et al., 2002; WITKIN et al., 2007). É comprovado que a resposta imune através da presença de anti-Gvh IgA está positivamente correlacionada aos níveis de IL-8 da cascata inflamatória, por outro lado, quando a resposta adaptativa se encontra prejudicada, é observado níveis elevados das enzimas hidrolíticas, tanto prolidase quanto a sialidase. (CAUCI et al., 2002; CAUCI, 2004). A sialidase também demonstrou a capacidade de contribuir para que moléculas de IgA clivem o ácido siálico, desse modo permitindo que a *G. vaginalis* consuma e neutralize resíduos, o que contribui, também, para que a bactéria obtenha a capacidade de evadir da resposta do hospedeiro (LEWIS et al., 2012; LEWIS et al., 2013). Para Cauci e colaboradores (2002; 2004; 2008) o desencadeamento das respostas imunológicas inata e adaptativa são inversamente proporcionais aos níveis das enzimas hidrolíticas, mesmo com concentração elevada da citocina IL-1 β , caracterizando a influência da supressão da resposta imunológica pelas enzimas hidrolíticas.

2.5 Estrógeno e defesa imunológica

O estrógeno é um hormônio sexual secundário, derivado do colesterol, que integra o ciclo reprodutivo das fêmeas, secretado, principalmente, pelos ovários e por células epiteliais da vagina. Os hormônios estrogênicos sintetizados no corpo da mulher em fase não gravídica são: o estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) e o estriol (E3) e destes, o hormônio mais ativo é o 17 β -estradiol (E2) tendo sua produção e liberação sob coordenação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas. (RETTBERG; YAO; BRINTON, 2014).

O hormônio hipotalâmico que coordena os hormônios sexuais secundário é o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Como um metrônomo, o hipotálamo define o ritmo do ciclo pela liberação pulsátil do GnRH (RETTBERG; YAO; BRINTON, 2014). A secreção pulsátil de GnRH estimula a hipófise a secretar os hormônios gonadotróficos: luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). A hipófise traduz o tempo definido pelo hipotálamo em um sinal, a secreção de LH e FSH, que pode ser compreendido pelo folículo ovariano (KESNER et al 1987; RANCE et al.,1994; ROBKER et al., 2018).

O folículo ovariano é composto por três células principais: células da teca, células da granulosa e oócito. No folículo ovariano, o LH estimula as células da teca a produzir androstenediona. Em células da granulosa de pequenos folículos antrais, o FSH estimula a síntese de aromatase que catalisa a conversão da androstenediona derivada da teca em estradiol (MORSELLI et al., 2017). Durante esta fase de maturação do folículo ovariano, a produção diária de 17 β -estradiol (E2) é de aproximadamente 36 μ g/dia, enquanto a progesterona é muito baixa, 1 μ g /dia (REED et al., 2018).

Uma concentração de estradiol produzida a partir de um grande folículo antral dominante causa feedback positivo no hipotálamo, resultando em um aumento na secreção de GnRH e um pico de LH. O pico de LH causa o início do processo de ovulação (KARSCH et al., 1973; ROBKER et al., 2018). Após a ovulação, o folículo é transformado no corpo lúteo que é estimulado por LH ou gonadotrofina coriônica (hCG), caso ocorra a gravidez, para secretar progesterona (BARBIERI, 2014).

O estradiol (E2) juntamente com a progesterona preparam o endométrio uterino para a implantação do conceito e este diferencia-se em um epitélio secretor e altamente vascularizado (BARBIERI, 2014; RICHARD et al., 2007). Esta fase é caracterizada por níveis aumentados de E2 e progesterona, com produção diária de aproximadamente 250 μ g/dia (aumento de ~ 7 vezes do folicular) e 25 μ g/dia (aumento de 25 vezes do folicular), respectivamente (REED et al., 2018).

Estes hormônios também exercem controle sobre as células do sistema imune, inato e adaptativo, do trato genital feminino e a proteção imune varia conforme a fase do ciclo menstrual (WIRA et al., 2010; WIRA et al., 2014). Em circunstâncias normais ocorre uma harmonia entre os hormônios sexuais e os mecanismos de defesa, pois necessita de um ambiente que concilie seus papéis, muitas vezes contraditório, de reprodução, devido ao trânsito de espermatozoides exógenos, e o de defesa, com a eliminação de patógenos sexualmente transmissíveis, além de sustentar uma população de bactérias comensais que contribuem para manutenção das suas funções (LASSARTE et al., 2015). Devido a esta necessidade, a proteção imunológica é atenuada no trato genital feminino durante a fase secretora desses hormônios com intuito de otimizar as condições de fertilização, o que cria uma janela de vulnerabilidade para o desenvolvimento de doenças (WIRA et al., 2010; WIRA, RODRIGUEZ-GARCIA, PATEL, 2015).

A influência dos hormônios sexuais sobre o sistema imunológico ocorre também de forma sistêmica durante as fases do ciclo reprodutivo. O estrógeno modula, de diversas formas, as células imunes; na fase ovulatória ou gravídica é observado a supressão da citotoxicidade das células NK (HAO et al., 2007). *In vitro*, macrófagos tratados com estradiol apresentaram diminuição das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α , enquanto, a longo prazo, a administração levou a um aumento de IL-1 β , IL-6 e IL-12p40. O estrógeno também aumenta a atividade anti-inflamatória, porém diminui a quimiotaxia dos neutrófilos (GIEFIENG-KRÖLL et al., 2015).

Nos linfócitos T o estrógeno exerce a função que desfavorece o perfil de resposta para o tipo Th1 e ativação de células T CD8, entretanto, altos níveis deste hormônio, característicos de mulheres em idade reprodutiva, estimulam, do desenvolvimento do perfil, a resposta do tipo Th2 e ativam a maturação de linfócitos B e produção de anticorpos (GIEFIENG-KRÖLL et al., 2015). O estrógeno também reduz a apoptose de células B imaturas aumentando a disponibilidades destes linfócitos, mas também a hipermutação e recombinação de troca de classe de imunoglobulinas, o que contribui para uma melhor resposta humoral, mas em contrapartida mulheres são mais susceptíveis as doenças autoimunes. (SAKIANI et al., 2013).

Com a menopausa, a produção de estrógeno nos ovários cessa aumentando a expressão do fator de transcrição T-bet (T-box expressed em células T) que altera a predominância da resposta do tipo Th2 para Th1. A funcionalidade de células do sistema imune inato tem sua capacidade fagocítica diminuída o que leva ao decréscimo da função de apresentação de antígeno e ativação do sistema adaptativo (GIEFIENG-KRÖLL et al., 2015). Panda e colaboradores (2009) descreveram a alteração sequencial de reconhecimento e eliminação de

microrganismos em uma infecção. Neste estudo os pesquisadores observaram que a adesão de neutrófilos ao endotélio vascular e o extravasamento inicial para o tecido não são afetados pelo envelhecimento, entretanto, a quimiotaxia parece ser comprometida, enquanto a quimiocinese permanece intacta, reduzindo a eficiência da migração para o local infectado.

A migração através do tecido envolve a secreção de proteases, como a elastase de neutrófilos, de grânulos azurófilos. A atividade quimiotática reduzida aumentaria a exposição do tecido a tais proteases, aumentando os danos colaterais ao tecido saudável. No próprio local da infecção, a fagocitose de neutrófilos e a subsequente morte envolvendo a geração de superóxido são ambas reduzidas com a idade. Cada um desses fatores contribui para a redução da capacidade dos adultos idosos de eliminar infecções bacterianas e resolver prontamente a inflamação (PANDA et al., 2009).

No geral, a imunossenescência exibe um número reduzido de linfócitos totais e células B circulantes, enquanto ocorre um aumento das células NK. A fisiologia endócrina, com o avanço da idade, altera a expressão de mediadores inflamatórios, elevando os níveis de IL-1 β , IL-6; IL-10 e TNF- α e diminuindo gradualmente os níveis de INF- γ (GIEFIENG-KRÖLL et al., 2015; PANDA et al., 2009). Analisando os efeitos do 17 β -estradiol (E2), hormônio mais ativos dos estrógenos, é possível evidenciar que em baixas dosagens ocorre supressão da atividade imune e aumento da circulação de citocinas pró-inflamatórias (SMITH, RAVEL, 2017), enquanto em altas concentrações, o E2 inibe a liberação dessas citocinas. (STRAUB, 2007).

A modulação imunológica sob influência do E2 ocorre através dos receptores de estrógenos que são expressos na maioria das células do sistema inato e adaptativo, incluindo os linfócitos T, B, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (DC) e as natural killer (NK). (FISH, 2008; KOVATS, 2015). Tem sido demonstrado que o estradiol e os ERs exercem efeitos reguladores positivos ou negativos na produção de citocinas inflamatórias. Contudo, isso varia de acordo com o tipo de célula ou dose de estrogênio (KOVATS, 2015). É reconhecido diferentes mecanismos envolvidos com a sinalização biológica dos receptores de estrogênicos (SOLAR et al., 2013), dentre estes incluem: a) a via clássica dependente de ligante que envolve a ligação de complexos E2-ER intracelulares alfa ou beta a elementos de resposta ao estrogênio (ERE) em promotores alvo levando a uma regulação positiva ou negativa da transcrição do gene e subsequentes respostas; b) as vias independentes de ligante através das quais os fatores de crescimento (GF) ou AMP cíclico ativam as vias da quinase intracelular, levando à fosforilação e ativação do ER (alfa ou beta) de uma maneira independente do ligante; e c) a sinalização independente de ERE que envolve complexos E2-

ER que alteram a transcrição de genes por meio da associação com outros fatores de transcrição ligados ao DNA, resultando em uma regulação positiva da expressão gênica (LASHKARI 2017 et al., 2017).

Finalmente, foi há muito reconhecido a sinalização E2 da superfície celular (não genômica). O receptor GPR30 ligado à membrana pode estar envolvido na ação anti-inflamatória do estrogênio ao localizar agonistas específicos do GPR30 que regulam a expressão da superfície celular de receptores Toll-like (VILLA et al., 2015). Quando fatores padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) são detectados por meio de RRP's do hospedeiro, como os TLRs, as vias de sinalização são ativadas, permitindo a dissociação do fator de transcrição NFκB de seu inibidor IκB, que é subsequentemente fosforilado e degradado. O NFκB ativo é translocado para o núcleo e se liga aos elementos de resposta dos genes alvo, permitindo a expressão de genes pró-inflamatórios (VÁSQUEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2018). Em um nível molecular, receptor estrogênico ativado pela via clássica, ou seja, ativado por hormônio demonstrou prejudicar a atividade transcricional de NF-κB, evitando sua translocação nuclear na presença de fortes estímulos inflamatórios onde a presença da ativação da via clássica não permitiu a degradação do inibidor IκB do fator de transcrição NFκB (VILLA et al., 2015)

De maneira geral, na literatura, o hormônio sexual 17-beta estradiol é reconhecido por ser anti-inflamatório (AOMATSU et al., 2013; SHIVERS et al., 2015). Entretanto, pesquisadores trazem que os efeitos provocados pela influência desse hormônio na resposta imunitária ainda permanecem paradoxais. Uma extensa revisão composta de mais de 500 publicações conduzida por STRAUB (2007) revelou que o E2 pode assumir tanto o perfil anti-inflamatório quanto o perfil pró-inflamatório, sendo a etiologia do processo patológico e o período do ciclo reprodutivo a dose hormonal e o tipo celular os principais responsáveis por essa dicotomia.

2.6 Papel dos Monócitos/Macrófagos na resposta imune

Existem dois ramos do sistema imunológico: o sistema imunológico não específico (inato ou natural) e o sistema imunológico específico (adquirido ou adaptativo). Após o reconhecimento de um agente estranho, uma resposta efetiva é montada através do recrutamento de uma variedade de células e moléculas para eliminar o organismo invasor (AUFRAY; SIEWEKE; GREISSMANN, 2009).

A resposta imune não específica é a primeira linha de defesa contra infecções. As células efetoras deste ramo do sistema imune são monócitos, macrófagos, granulócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), células dendríticas e células natural killer (NK) (TOMAR; DE, 2014). Estas células eliminam os agentes invasores através de atividade fagocítica (neutrófilos, monócitos e macrófagos), por lise de células infectadas (células NK) ou pela produção de citocinas para aumentar as respostas imunes não específicas e específicas (todas as células) (BOUMAN; HEINEMAN; FAAS, 2005).

Os componentes celulares da resposta imune específica são os linfócitos T e os linfócitos B produtores de imunoglobulina. Dentro da população de linfócitos T existem os linfócitos T auxiliares (células Th ou CD4+), que fornecem ajuda a outras células do sistema imunológico pela produção de citocinas. Os linfócitos T citotóxicos / supressores (células CD8+) produzem citocinas e podem eliminar diretamente células estranhas ou infectadas (BOUMAN; HEINEMAN; FAAS, 2005; TOMAR; DE, 2014).

Os monócitos constituem entre 5 e 10% dos leucócitos circulantes humanos e 4% dos leucócitos no sangue de camundongos. Estas células têm meia-vida curta, permanecendo aproximadamente 24 horas no sangue (BOUMAN; HEINEMAN; FAAS, 2005, TSOU et al., 2007), pois são um subconjunto de glóbulos brancos que podem se diferenciar em macrófagos teciduais e células dendríticas (DCs) (TSOU et al., 2007).

Monócitos/macrófagos são células excepcionalmente plásticas, capazes de adotar os fenótipos específicos do contexto necessários para proteger o hospedeiro de eventos prejudiciais e para restabelecer a homeostase do tecido quando a reação inflamatória termina (LAYOUN; SAMBA, SANTOS, 2015; VILLA et al 2015; ZHANG; GONÇALVES; MOSSER, 2008). Estímulos inflamatórios (derivados de microrganismos, tecidos danificados e outros) induzem macrófagos a adquirir a polarização pró-inflamatória ou M1, via clássica, consistindo na rápida ativação de NF- κ B e na síntese e secreção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, interferon (IFN)- γ , GM-CSF TNF α , IL1 β , IL6, IL12 e IL23) e quimiocinas (particularmente proteína-1 quimiotática de monócitos, MCP1) (CHAN et al., 2018; MARTINEZ; GORDON, 2014; TSOU et al., 2007). Esses compostos inflamatórios são responsáveis pelo aumento da expressão de mediadores citotóxicos, como o óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Eles também são responsáveis pelo aumento da expressão de enzimas relevantes para a fagocitose de tecidos danificados ou microrganismos e para a migração e posterior recrutamento de macrófagos (VILLA et al 2015).

Essas sequências de eventos que visam a remoção rápida e eficiente dos estímulos inflamatórios costumam ser a causa de graves danos no local da inflamação; assim, uma

resposta imune bem equilibrada termina com o reparo e a recuperação funcional de todos os tecidos danificados (MURRAY, 2017; SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018). Esta "fase de resolução" é realizada por macrófagos em conjunto com o tecido do hospedeiro e outras células imunes como linfócitos e ocorre pela aquisição do estado de ativação alternativa ou polarização M2 (MARTINEZ; GORDON, 2014) em que os macrófagos estimulam ainda mais a síntese e secreção de citocinas anti-inflamatórias como IL4, IL13, IL-10 e TGF- β para finalmente reprimir a produção de citocinas pró-inflamatórias (como TNF α , IL12 e IL1 β) e iNOS (ATRI; GUERFALI; LAOUINI, 2018; VILLA et al 2015).

Uma vez que os monócitos/macrófagos desempenham um papel regulador importante nas respostas imunológicas ao afetar o quantitativo disponível destas células, esta resposta sofre regulação, que pode ser tanto positiva quanto negativa (CUNNINGHAM; GILKESON, 2011; MURRAY, 2017). Neste contexto, é de conhecimento na literatura que a contagem circulante de monócitos recebe influência direta dos hormônios sexuais (CUNNINGHAM; GILKESON, 2011). Durante a menopausa, foi demonstrado um aumento no número de monócitos sanguíneos em comparação com mulheres na fase folicular (BEN HUR et al., 1995; BOUMAN et al., 2004). Além disso, na fase da menopausa, a contagem de monócitos diminui após a terapia de reposição de estrogênio (BOUMAN et al., 2004). Essas descobertas sugerem que o estrogênio e, possivelmente, também a progesterona, diminuem o número de monócitos (CUNNINGHAM; GILKESON, 2011) e os hormônios sexuais podem desempenhar um papel importante nas diferenças das respostas imunológicas entre as fases reprodutivas.

Nos ensaios imunoendócrinos, os monócitos/macrófagos representam um bom modelo experimental para avaliar o papel do 17 β -estradiol (E2) no processo de ativação e modulação da resposta imune frente a um agente infeccioso (VILLA et al 2015). Essas células são as principais mediadoras da resposta inflamatória tecidual (MOSSER et al., 2008), além de expressarem as duas das principais isoformas intracelular de ligação do estrogênio (ER α e ER β) (MURPHY et al., 2009; JENSEN et al, 2016). Outros autores demonstraram que o receptor de estrogênio acoplado à proteína G ligado na membrana (GPR30 / GPER-1) também é expresso em macrófagos (RETTEW; MCCALL; MARRIOTT, 2010).

Neste sentido, a VB por ser considerada a principal desordem vaginal em mulheres no período reprodutivo, o presente trabalho tem como hipótese que o 17 β -estradiol exerce modulação imunológica na patogênese da vaginose bacteriana. Sendo assim, tem-se como objetivo avaliar o efeito do 17 β -estradiol na resposta imunológica induzida por inoculação da *G. vaginalis* em cultura de monócitos/macrófagos oriundos de lavagem peritoneal de

camundongos fêmeas shams e ovariectomizadas e sangue periférico de mulheres com e sem atividade ovariana fisiológica

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar a influência do 17 β -estradiol (E2) na resposta imunológica induzida por *Gardnerella vaginalis* em modelos *in vitro* de macrófagos peritoneais murinos (MPMs) fêmeas e monócitos humanos do sangue periférico (hPMs) de mulheres, com ou sem atividade ovariana fisiológica.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o papel do E2 sobre o crescimento de *G. vaginalis*;
- Avaliar a resposta inflamatória por meio de dosagem de citocinas (IL-6, IL-8 e IL-10) em MPMs, de camundongos fêmeas cirurgia simulada (SHAM) e ovariectomizadas (OVX), estimulados por *G. vaginalis* ou salina estéril;
- Avaliar a produção de marcadores inflamatórios (nitritos totais e peróxido de hidrogênio (H₂O₂)) em MPMs, de fêmeas SHAM e OVX, estimulados por *G. vaginalis* ou salina estéril;
- Avaliar a expressão gênica do receptor *toll-like* dois (TLR2) em MPMs, de fêmeas SHAM e OVX, estimulados por *G. vaginalis* ou salina estéril;
- Avaliar a expressão gênica do fator de transcrição NF- κ B em MPMs, de fêmeas SHAM e OVX, estimulados por *G. vaginalis* ou salina estéril;
- Avaliar a expressão gênica dos receptores intracelulares do estradiol, alfa (ER- α) e beta (ER- β), em MPMs, de fêmeas SHAM e OVX, estimulados por *G. vaginalis* ou salina estéril;
- Avaliar resposta inflamatória gerada, por meio de dosagem de citocinas (GM-CSF, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-23, IL-27 e IL-10) em hPMs, de mulheres no período fértil e menopausa, estimulados por *G. vaginalis* ou salina estéril;
- Avaliar a produção de marcadores inflamatórios (nitritos totais e peróxido de hidrogênio) em hPMs, de mulheres no período fértil e menopausa, estimulados por *G. vaginalis* ou salina estéril;
- Comparar a resposta inflamatória por meio de dosagem de citocinas (IL-6, IL-8 e IL-10) estimulados por *G. vaginalis*, entre MPMs, de fêmeas SHAM, OVX e OVX tratadas com estradiol;

- Comparar a produção de marcadores inflamatórios (nitritos totais e peróxido de hidrogênio (H₂O₂)) entre MPMs, estimulados por *G. vaginalis*, de fêmeas SHAM, OVX e OVX tratadas com estradiol;
- Comparar a expressão gênica do receptor *Toll-like* dois (TLR2) entre MPMs, estimulados por *G. vaginalis*, de fêmeas SHAM, OVX e OVX tratadas com estradiol;
- Comparar a expressão gênica do fator de transcrição NF-κB entre MPMs, estimulados por *G. vaginalis*, de fêmeas SHAM, OVX e OVX tratadas com estradiol;
- Comparar a expressão gênica dos receptores intracelulares do estradiol, alfa (ER-α) e beta (ER-β), entre MPMs, estimulados por *G. vaginalis*, de fêmeas SHAM, OVX e OVX tratadas com estradiol;
- Comparar a resposta inflamatória por meio de dosagem de citocinas (GM-CSF, IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-12, IL-23, IL-27 e IL-10) estimulados por *G. vaginalis* entre hPMs, de mulheres no período fértil, menopausa e menopausa tratados com estradiol;
- Comparar a produção de marcadores inflamatórios (nitritos totais e peróxido de hidrogênio) entre hPMs, de mulheres no período fértil estimulados por *G. vaginalis*, menopausa e menopausa tratados com estradiol.

4 METODOLOGIA

4.1 *G. vaginalis*

A cepa de referência ATCC 49154 de *G. vaginalis* foi usada para a infecção. A bactéria foi cultivada, por 24 horas (incubação: 37°C com 5% de CO₂), em caldo de infusão de cérebro coração (BHI) (CASTRO, 2017). O inóculo de *G. vaginalis* foi obtido após centrifugação (3000rpm/ 16min), ressuspensão em solução salina estéril, submetido ao vortex e analisado em um espectrofotômetro para obter os seguintes parâmetros: 0,135_{Ab} (660 nm), equivalente a 1 x10⁸ unidades formadoras de colônias (UFC) (DE OLIVEIRA et al., 2015).

4.2 Efeito do 17β-estradiol sobre a curva de crescimento *G. vaginalis*

Para entender o papel bactericida ou bacteriostático do 17β-estradiol sobre *G. vaginalis*, os protocolos de inóculo de Silva, (2007) e de Oliveira e colaboradores (2015) foram adaptados para realizar duas curvas de crescimento pelo período de 24 horas. *G. vaginalis* foi reativada em BHI por 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ (CASTRO, 2017). A primeira etapa foi a inoculação (1x10⁸ UFC/mL). Em seguida, o meio foi preparado para a primeira curva, controle positivo, apenas com *G. vaginalis* (1mL) em meio BHI e uma segunda curva contendo *G. vaginalis* (1mL) em meio BHI com 17β-estradiol (5,25mL) em uma concentração de 10⁻⁷M. Ambos mantidos em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por um período de zero a vinte e quatro horas (T0-T24). A partir desse momento, no tempo zero e a cada hora, três etapas foram realizadas simultaneamente, incluindo: (1) remoção de 100μL da cultura para diluição em série em solução salina 10⁻¹ a 10⁻⁶; (2) 10μL da diluição foram semeados em ágar sangue e cultivados em estufa a 37°C com CO₂ a 5%, para contagem de colônias após 24 horas; (3) transferência de 1,5mL da cultura para leitura da absorbância (660nm) em espectrofotômetro.

4.3 Experimentos com Camundongos

4.3.1 Aspectos legais

Todos os experimentos com camundongos foram conduzidos de acordo com os princípios internacionalmente aceitos para o uso e cuidados de animais de laboratório, conforme estabelecido na resolução do parlamento europeu sobre a diretiva 86/609/CEE relativa à proteção dos animais utilizados para fins experimentais e outros fins científicos e executados após aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto

Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia (IMS/UFBA), sob protocolo nº 049/2017.

4.3.2 Animais

Foram utilizados 15 (quinze) camundongos fêmeas livres de patógenos (SPF) da linhagem Balb/C com idades entre seis e oito semanas. Os camundongos utilizados nos experimentos *in vivo* e *in vitro* foram obtidos do Centro Multidisciplinar de Pesquisa Biológica na Área de Ciência do Laboratório de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB / UNICAMP) e foram mantidos sob condições controladas de luz (luz das 7h às 19h) e temperatura (23 ± 3 ° C), com livre acesso a água e ração no biotério para camundongos do Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia (IMS/UFBA).

4.3.3 Ovariectomia

A fim de diminuir significativamente o nível de hormônios sexuais, os animais foram submetidos à cirurgia de remoção ovariana de ovariectomia (OVX). A cirurgia simulada (SHAM) foi realizada para o grupo controle. Os animais foram anestesiados com quetamina e xilazina nas doses de 5mg/kg e 50mg/kg, respectivamente (DE ANDRADE et al., 2011). A cirurgia foi realizada de acordo com o método atual em endocrinologia (MIRBAHA et al., 2009). Após a cirurgia, os animais receberam tratamento profilático com antibiótico enrofloxacina a 2,5% em uma dose única de 2,5mg/kg (BREGANTE et al., 1999).

4.3.4 Citologia vaginal

Os animais ficaram em observação diária por duas semanas após os procedimentos cirúrgicos. O controle do ciclo estral foi iniciado no sétimo dia pós-cirúrgico e realizado por sete dias consecutivos, no período da manhã, até o dia da eutanásia. O procedimento consiste em introduzir 30µL de solução salina estéril no canal vaginal e identificar as células sob um microscópio óptico (40x) (VILELA, 2007). Para validar a precisão da determinação da fase do ciclo estral, fluidos vaginais foram novamente coletados no momento da eutanásia, confirmando o ciclo estral proestro das fêmeas SHAMS. Para as fêmeas OVX não foi identificado características citológicas de fases do ciclo estral (LAMAS et al, 2015).

4.3.5 Obtenção de tecido uterino, lavado vaginal

Todos os animais, SHAM e OVX, foram pesados e posteriormente realizado a eutanásia, por decapitação. O útero foi isolado e em seguida pesado. Para o cálculo do peso uterino o peso do órgão úmido (g) foi dividido pelo peso corporal do animal (g), razão do peso úmido (RPU).

4.3.6 Obtenção do sangue para dosagem de 17 β -estradiol

Após a eutanásia, aproximadamente 1mL de sangue do tronco foi coletado em tubo com gel separado e mantido por 30 minutos em temperatura ambiente para retração do coagulo. Foi realizada a centrifugação em 2500rpm/20min e o soro foi coletado para dosagem hormonal (WOOD et al., 2007; de OLIVEIRA et al., 2010). Os níveis séricos de estradiol foram medidos por ELISA de acordo as instruções do fabricante do kit Estradiol EIA Kit (ACE™ Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, EUA).

4.3.7 Isolamento de Macrófagos Peritoneais Murinos (MPMs)

Para induzir o recrutamento de macrófagos para a cavidade peritoneal, 2ml de meio de tioglicolato (3%) foi injetado na cavidade peritoneal de camundongos fêmeas OVX (n = 6) e SHAM (n = 6). Após três dias, os animais foram submetidos ao procedimento de eutanásia por decapitação. As células foram isoladas da lavagem peritoneal de acordo com o protocolo descrito na literatura (LU; VARLEY, 2013; ZHANG; GONÇALVES; MOSSER, 2008) e cultivadas com meio RPMI 1640 (Gibco™) suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% (Sigma Aldrich) e ciprofloxacina (20 μ g/mL) (Sigma Aldrich). A suspensão de MPM (2x10⁵ / mL) foi semeada em placas de 24 poços (PRIYANKA et al., 2013).

4.3.7.1 Inoculação de MPMs com *G. vaginalis* (GV) ou solução salina estéril e tratamento com 17 β -estradiol (E2)

Após o período de cultivo, de 24 horas, antes da inoculação, todos os poços com os MPMs foram lavados com 100 μ l e, posteriormente, adicionado 500 μ l de RPMI 1640 (Gibco™) sem suplementação. Os MPMs de camundongos fêmeas SHAM ou OVX foram estimuladas com 10 μ l do inóculo *G. vaginalis* (UFC 10⁸) (DE OLIVEIRA, et al., 2015; SIRAIT et al., 2017) ou 10 μ l salina estéril, por 6h, em 5% de CO₂ 95% de ar umidificado a 37°C. Para os grupos de tratamento, as células foram pré-tratadas com 100 μ l de 17 β -estradiol (10⁻⁷ M) (AOMATSU et al., 2013) (Sigma Aldrich) por 6h a 37°C (GARCIA-DURAN M et

al, 1999), antes da estimulação com *G. vaginalis* ou salina estéril. Os MPMs das fêmeas OVX e SHAM foram divididas nos seguintes grupos:

- SHAM + GV: MPMs de camundongos fêmeas SHAM infectadas com *G. vaginalis*;
- SHAM + Salina: MPMs de camundongas fêmeas SHAM tratadas com salina;
- OVX + GV: MPMs de camundongos fêmeas ovariectomizadas infectadas com *G. vaginalis*;
- OVX + Salina: MPMs de camundongas fêmeas ovariectomizadas tratadas com salina
- OVX + E2 + GV: MPMs de camundongas fêmeas ovariectomizadas, pré-tratadas com de 17 β -estradiol e infectadas com *G. vaginalis*.

Os sobrenadantes foram utilizados para dosagem de citocinas, nitritos totais e peróxido de hidrogênio. Os MPMs foram desaderidos das placas com auxílio de 50 μ l tripsina, mantido em 5% de CO₂ 95% de ar umidificado a 37°C por aproximadamente 7min e estabilizados com 200 μ l RNA later para realização de expressão gênica.

4.3.7.2 Dosagem de citocinas

As citocinas IL-6, IL-8 e IL-10, proveniente do sobrenadante da cultura, dos MPMs das fêmeas SHAM e OVX dos grupos: SHAM + GV; SHAM + Salina; OVX + GV; OVX + Salina e OVX + E2 + GV, foram analisadas pela técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), utilizando kits comerciais ProcartaPlex™ Simplex Kit Invitrogen (Thermo Fisher, São Paulo, Brasil). O ensaio foi realizado seguindo as instruções do fabricante e os níveis de citocinas foram demonstrados em valores absolutos (pg/mL). Todos os grupos foram analisados em triplicata.

4.3.7.3 Concentração de nitritos totais

A produção indireta de óxido nítrico por macrófagos foi realizada através da reação de Griess (GREEN; TANNENBAUM; GOLDMAN, 1981). Em uma placa de 96 poços, uma alíquota do sobrenadante da cultura de células (50 μ L) reagiu com 50 μ L de solução reagente de Griess a 0,1% (dicloridrato de naftaleno - NEED) diluído em água destilada, incubada por 10 minutos sem luz direta e 50 μ L de solução de e-sulfanilamida a 1% (Sigma, São Paulo, Brasil) diluída em ácido fosfórico a 5% (Merck SA, Rio de Janeiro, Brasil) novamente incubada por 10 min sem luz direta. Finalmente, todos os grupos foram analisados em níveis triplicados de NO-2 medidos na absorbância (550nm) em um espectrofotômetro. Todos os grupos foram analisados em triplicata

4.3.7.4 Dosagem de peróxido de hidrogênio

Dosagem de peróxido de hidrogênio proveniente do sobrenadante da cultura celular de MPMs oriundos das fêmeas SHAM e OVX. Em uma placa de 96 poços foi adicionada uma alíquota do sobrenadante proveniente da cultura de células e a reação de dosagem de H₂O₂ ocorreu com quantificação com curva padrão seguindo as instruções do fabricante do kit Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase (Invitrogen). Finalmente, todos os grupos foram analisados em níveis triplicados medidos na absorbância (560nm) em um espectrofotômetro.

4.3.7.5 Expressão gênica de receptores e fator de transcrição por RT- qPCR

No desenvolvimento deste estudo também foi realizado a expressão gênica relativa nos MPMs, oriundos das fêmeas SHAM e OVX subdivididos nos grupos anteriormente detalhados, para melhor compreender os mecanismos de resposta. Para isso, foi realizado a expressão do receptor de reconhecimento de padrões moleculares existentes em diversos agentes infectantes como *Toll-Like-2* (TLR2). A expressão do fator de transcrição, Fator nuclear kappa B (NF-κB). A expressão relativa das duas isoformas dos receptores intracelulares do 17β-estradiol: alfa (ERα) e beta (ERβ). As expressões gênicas foram avaliadas pelo RT - qPCR array. O ensaio de expressão gênica SYBR® PCR Master Mix (Applied Biosystems™) foi realizado em placas com genes-alvos, TLR2, NF-κB, ERα e Erβ, genes endógenos e genes controle. A amplificação foi feita pelo termociclador StepOnePlus, com os seguintes ciclos: 50 °C por 10 minutos, 95 °C por 10 minutos, 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Os dados foram analisados pelo método comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) e a normalização foi realizada com base na expressão de GAPDH.

4.4 Experimentos com Seres Humanos

4.4.1 Aspectos éticos e legais

Por se tratar de uma pesquisa que envolveu seres humanos atendeu às exigências éticas obedecendo às diretrizes da presente Resolução 466/12. O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia e Imunologia do IMS/UFBA após aprovação da Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da mesma instituição (CAAE: 81069817.5.0000.5556). Todos os procedimentos foram iniciados somente após aprovação

por este e após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) em duas vias, ficando uma com o participante da pesquisa e outra arquivada pela pesquisadora.

4.4.2 Seleção dos sujeitos da pesquisa

As coletas foram realizadas entre os meses de abril de 2019 e março de 2020 nos consultórios de enfermagem da Unidade de Saúde da Família (USF) Nelson Barros, do município de Vitória da Conquista. Foram obtidas amostras de sangue periférico e fluido vaginal de 18 mulheres, 9 em idade reprodutiva e acima de 18 anos, com uma média de, aproximadamente 30,1 anos, e 9 na menopausa, com idade a partir de 47 anos com média de 48 anos (VETERATO et al 2020). O objetivo do estudo foi apresentado de forma sucinta e com linguagem simples na sala de espera da USF. Em seguida, as pacientes voluntárias foram convidadas a participar da pesquisa, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

As voluntárias foram avaliadas previamente em uma consulta de triagem em que foi aplicado um questionário com o objetivo de averiguar os critérios de exclusão. No questionário foi perguntado data de nascimento, sexo, histórico clínico e hábitos como álcool ou tabagismo e uso de medicações. O questionário foi respondido pela voluntária, individualmente, exceto a seção de “EXAME GINECOLÓGICO”, este preenchido pela enfermeira da USF após a realização do exame ginecológico “PAPANICOLAU”. A pesquisadora esteve presente durante a aplicação dos questionários para esclarecimento de dúvidas.

Para as voluntárias que por ventura se enquadraram nos critérios de exclusão da pesquisa foi comunicado e esclarecido o(s) motivo(s) da descontinuidade da participação. Para critérios de exclusão: menstruação no dia da coleta, hábitos como álcool ou tabagismo, uso de medicamentos (antibióticos, antifúngicos e contraceptivos) nos três meses que antecederem à coleta, mulheres grávidas, puérperas ou amamentando, assim como portadoras do vírus HIV e HPV, diagnosticadas para infecções sexualmente transmissíveis, que declare diabetes, cardiopatias, doenças psiquiátricas, câncer, doença renal e ainda que apresente sinais e sintomas clínicos como: verruga, erupções, petéquias ou úlceras. Para mulheres na menopausa o uso de terapia de reposição hormonal foi considerado critério de exclusão.

As amostras obtidas foram acondicionadas em suporte plástico para tubos de ensaio, armazenados e transportados para o Laboratório de microbiologia e imunologia da Universidade Federal da Bahia em caixas isotérmicas (4°C). Parte das amostras de sangue foram devidamente identificados e entregues no Laboratório Central Municipal (LACEM) de

Vitória da Conquista/BA para realização de dosagem dos níveis hormonais: 17β -estradiol; progesterona, hormônio folículo-estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) e exames para avaliação do estado de saúde geral: dosagem de glicemia; colesterol total e frações; transaminase glutâmico-oxalacética (TGO); transaminase glutâmico-pirúvica (TGP); e hemograma completo. Em caso de alteração negativa do estado geral de saúde das voluntárias, as amostras armazenadas nos laboratórios da Universidade Federal da Bahia foram descartadas, seguindo o protocolo de descarte de materiais biológico do Instituto Multidisciplinar em Saúde – UFBA.

4.4.3 Coleta de sangue periférico dos sujeitos de pesquisa

Para realização do procedimento, a agulha estéril (25 x 0,8 mm/ 21G) foi rosqueada no adaptador (canhão), sem remover a capa protetora da agulha. Em sequência, o garrote foi ajustado no braço da voluntária, a veia escolhida e realizado antissepsia do local da coleta com algodão umedecido em álcool 70% e, após remover a capa protetora da agulha, a punção foi realizada. Para a coleta do sangue, um tubo contendo EDTA foi introduzido no adaptador e assim que o sangue começar a fluir no tubo, o garrote foi solto. Quando a quantidade de sangue necessária foi atingida (20mL), a agulha foi retirada delicadamente e, a fim de evitar o extravasamento sanguíneo e formação de hematomas, a voluntária foi orientada a pressionar com algodão a parte puncionada, mantendo o braço estendido, sem dobrá-lo por alguns minutos. Uma vez estancado o sangramento, foi colocado um penso adesivo no local da punção. A agulha foi descartada em um recipiente estanque, rígido, com tampa e identificado (tipo descartpack). O algodão foi descartado em saco branco leitoso devidamente identificado como infectante. Todas as coletas foram realizadas por profissionais habilitados utilizando-se de material estéril e equipamento de proteção individual (EPI).

4.4.3.1 Isolamento de monócitos periféricos humanos (hPMs)

As células mononucleares do sangue periférico (PBMC) podem ser extraídas do sangue usando Ficoll, um polissacarídeo hidrofílico que separa as camadas do sangue. Uma vez obtidos os PBMC, é possível separar monócitos de linfócitos por técnicas baseadas em diferentes propriedades dos monócitos, como seu tamanho único e densidade comparados aos linfócitos, além da habilidade de aderir ao vidro ou plástico. Devido ao risco de contaminação linfocitária foi utilizado Percoll, um gradiente percossolar hiperosmolar (densidade=1.064g/ml). O sangue periférico foi misturado com PBS em uma proporção 1:1. Os PBMCs foram separados por centrifugação em coluna de Ficoll (400g durante 20min),

lavados e centrifugados com PBS 1x por duas vezes (100g durante 10 minutos). Posteriormente, os hPMs foram separados em uma solução por centrifugação em coluna de Percall (400g durante 35min) e ressuspensos em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10% (Sigma Aldrich) e ciprofloxacina (20µg/mL) (Sigma Aldrich). Após a avaliação da viabilidade e confluência adequada (2×10^5 /mL), as células foram alocadas em placas de 24 poços de poliestireno e mantidas em estufa por 24 horas a 37°C com 5% de CO₂. (ALMAEIDA et al., 2000; CAMPESI et al., 2012; SANTO-JUNIOR et al., 2018). Este procedimento permitiu obter uma população homogênea de hPMs, que se apresentaram como células aderentes. Após o período de cultivo, antes da inoculação com *G. vaginalis*, todos os poços com os hPMs foram lavados com 100µl de RPMI 1640 (Gibco™) e, posteriormente, adicionado apenas 500µl de RPMI 1640 (Gibco™), sem suplementação.

4.4.3.2 Inoculação de hPMs com *G. vaginalis* ou solução salina estéril e tratamento com 17β-estradiol

Os hPMs das voluntárias em idade reprodutiva ou na menopausa foram estimuladas com 10µl do inóculo *G. vaginalis* (UFC 10⁸) ou 10µl de salina estéril (DE OLIVEIRA, et al., 2015; SIRAIT et al., 2017), por 6h, em 5% de CO₂ 95% de ar umidificado a 37°C. Para os grupos de tratamento, as células foram pré-tratadas com 100µl de 17β-estradiol (10⁻⁷ M) (AOMATSU et al., 2013) (Sigma Aldrich) por 6h a 37°C (GARCIA-DURAN M et al, 1999) antes da estimulação com *G. vaginalis* ou salina estéril. Os hPMs das voluntárias foram divididas nos seguintes grupos:

- Fértil + GV: hPMs de mulheres fértil infectadas com *G. vaginalis*;
- Fértil + Salina: hPMs de mulheres fértil infectadas tratadas com salina;
- Menopausa + GV: hPMs de mulheres na menopausa infectadas com *G. vaginalis*;
- Menopausa + Salina: hPMs de mulheres na menopausa tratadas com salina
- Menopausa + E2 + GV: hPMs de mulheres na menopausa, pré-tratadas com de 17β-estradiol e infectadas com *G. vaginalis*.

Os sobrenadantes foram utilizados para dosagem de citocinas, nitritos totais e peróxido de hidrogênio. Os hPMs foram desaderidos das placas com auxílio de 50µl tripsina, mantidos em 5% de CO₂ 95% de ar umidificado a 37°C por aproximadamente 7min e estabilizados com 200 µl RNA later para realização de expressão gênica.

4.4.3.3 Dosagem de citocinas

As citocinas GM-CSF, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-23, IL-27 e IL-10, proveniente do sobrenadante da cultura, dos hPMs das mulheres em período fértil e menopausa foram analisadas pela técnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), utilizando kits comerciais ProcartaPlex™ Simplex Kit Invitrogen (Thermo Fisher, São Paulo, Brasil). O ensaio foi realizado seguindo as instruções do fabricante e os níveis de citocinas foram demonstrados em valores absolutos (pg/mL). Todos os grupos foram analisados em triplicata.

4.4.3.4 Concentração de nitritos totais

A produção indireta de óxido nítrico por macrófagos foi realizada através da reação de Griess (GREEN; TANNENBAUM; GOLDMAN, 1981). Em uma placa de 96 poços, uma alíquota do sobrenadante da cultura de células (50 μ L) reagiu com 50 μ L de solução reagente de Griess a 0,1% (dicloridrato de naftaleno - NEED) diluído em água destilada, incubada por 10 minutos sem luz direta e 50 μ L de solução de e-sulfanilamida a 1% (Sigma, São Paulo, Brasil) diluída em ácido fosfórico a 5% (Merck SA, Rio de Janeiro, Brasil) novamente incubada por 10 min sem luz direta. Finalmente, todos os grupos foram analisados em níveis triplicados de NO-2 medidos na absorbância (550nm) em um espectrofotômetro. Todos os grupos foram analisados em triplicata

4.4.3.5 Dosagem de peróxido de hidrogênio

Dosagem de peróxido de hidrogênio proveniente do sobrenadante da cultura celular dos hPMs oriundos das mulheres em idade fértil na pós-menopausa. Em uma placa de 96 poços foi adicionada uma alíquota do sobrenadante proveniente da cultura de células e a reação de dosagem de H₂O₂ ocorreu com quantificação com curva padrão seguindo as instruções do fabricante do kit Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase (Invitrogen). Finalmente, todos os grupos foram analisados em níveis triplicados medidos na absorbância (560nm) em um espectrofotômetro.

4.5 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada usando o programa GraphPad-Prism 5.0 (GraphPad Softwear, San Diego, CA-EUA). As comparações realizadas nos diferentes experimentos foram determinadas por meio de análise paramétrica, teste T de Student ou não-paramétrica, teste Mann-Whitney One-tailed, após realizada a avaliação da normalidade dos dados. Os resultados foram expressos como média mais ou menos o desvio padrão da média (DPM). As diferenças

estatísticas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$, utilizando um intervalo de confiança de 95%. Para curva de crescimento a análise estatística foi realizada através do two-way ANOVA com "Bonferroni posttests".

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do 17 β -estradiol sobre a curva de crescimento *G. vaginalis*

Com a finalidade de compreender se o 17 β -estradiol (E2) exerce alguma atividade bactericida ou bacteriostática sobre a *G. vaginalis* foi realizado a curva de crescimento pelo período de 24 horas, onde pode se observar a influência inibitória desse hormônio. Na análise do gráfico relacionado a absorbância nota-se que a partir da hora 1 (figura 2a), do crescimento da curva, o E2 exerce de forma significativa a ação inibitória sobre a *G. vaginalis*. Na análise em relação a contagem de colônia essa influência só foi significativa a partir das 16 horas (figura 2b).

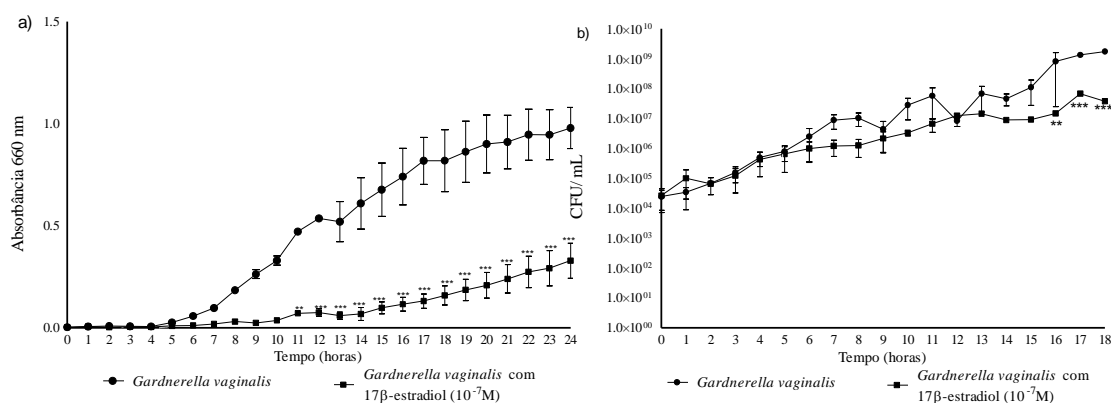


Figura 2. Curva de crescimento da *G. vaginalis* (UFC 108). *G. vaginalis* reativo em BHI por 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Curva Controle Positivo, *G. vaginalis* (1mL) em meio BHI (100mL). Curva Tratamento (E2) *G. vaginalis* (1mL) em meio BHI (100mL) + 17 β -estradiol [10⁻⁷M] (5,25mL), mantidas a 37°C com 5% de CO₂ por um período de zero a vinte e quatro horas (T0-T24). (a) Leitura da absorbância; (b) Contagem manual de colônias. Os dados são expressos como média \pm DPM. ** p<0,01, ***p<0,001

5.2 Experimentos com Camundongos

5.2.1 Modelo In Vivo

5.2.1.1 Índice uterino, concentração sérica 17 β -estradiol e peso corporal

Para avaliar a eficácia da ovariectomia, o índice uterino, dosagem do estradiol sérico e peso corporal foram determinados comparando as fêmeas SHAM, no proestro, em relação às OVX. Deficiência de estrógeno pode causar atrofia uterina. Na figura 3a, é possível observar a eficácia do procedimento da ovariectomia devido a diferença entre os pesos uterinos dos animais. O grupo SHAM apresenta maior peso comparado ao OVX ($p < 0,0002$). Ao realizar a dosagem do estradiol no soro dos animais, pode-se observar que as fêmeas SHAMs apresentam maior concentração de estradiol no soro ($p < 0,0001$, figura 3b). Outra característica pertinente deficiência estrogênica está relacionada à alteração da massa corpórea. Neste contexto, o grupo OVX apresentou um aumento significativo de peso corporal em relação ao SHAM ($p < 0,05$, figura 3c).

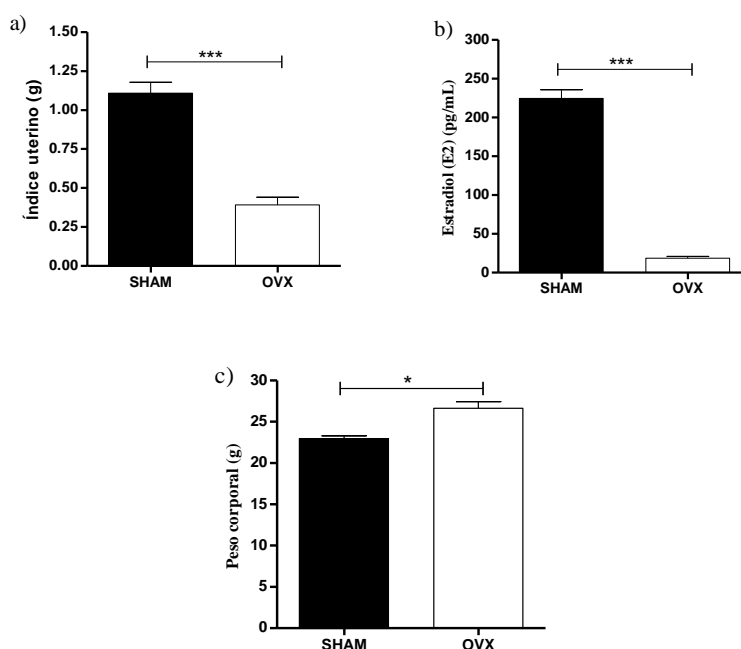


Figura 3. Avaliação da eficácia da ovariectomia. (a) Peso do útero corrigido pelo peso corporal de camundongos fêmeas SHAM e OVX. (b) Dosagem de 17 β -estradiol no soro das fêmeas SHAM e OVX. (c) Peso corporal de camundongos fêmeas SHAM e OVX. Dados são expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.

5.2.2 Modelo *In Vitro*

5.2.2.1 Concentração de citocinas em MPMs de fêmeas SHAM e OVX

As citocinas, IL-6, IL-8 e IL-10, foram mensuradas nos sobrenadantes de cultura produzidos pelos MPMs. Os resultados deste estudo apresentaram uma maior produção de todas as citocinas para os MPMs do grupo infectado com *G. vaginalis*, tanto SHAM quanto OVX, quando comparados com o grupo apenas com salina estéril. Para a citocina IL-6 este resultado pode ser observado para o modelo SHAM ($p < 0.0048$, figura 4a) e modelo OVX ($p < 0.0048$, figura 4b). Em relação a citocina IL-8, observa-se para o modelo SHAM ($p < 0.0001$, figura 4c) e modelo OVX ($p < 0.0048$, figura 3d) e para IL-10 SHAM ($p < 0.0001$, figura 4e) e modelo OVX ($p < 0.0001$, figura 4f).

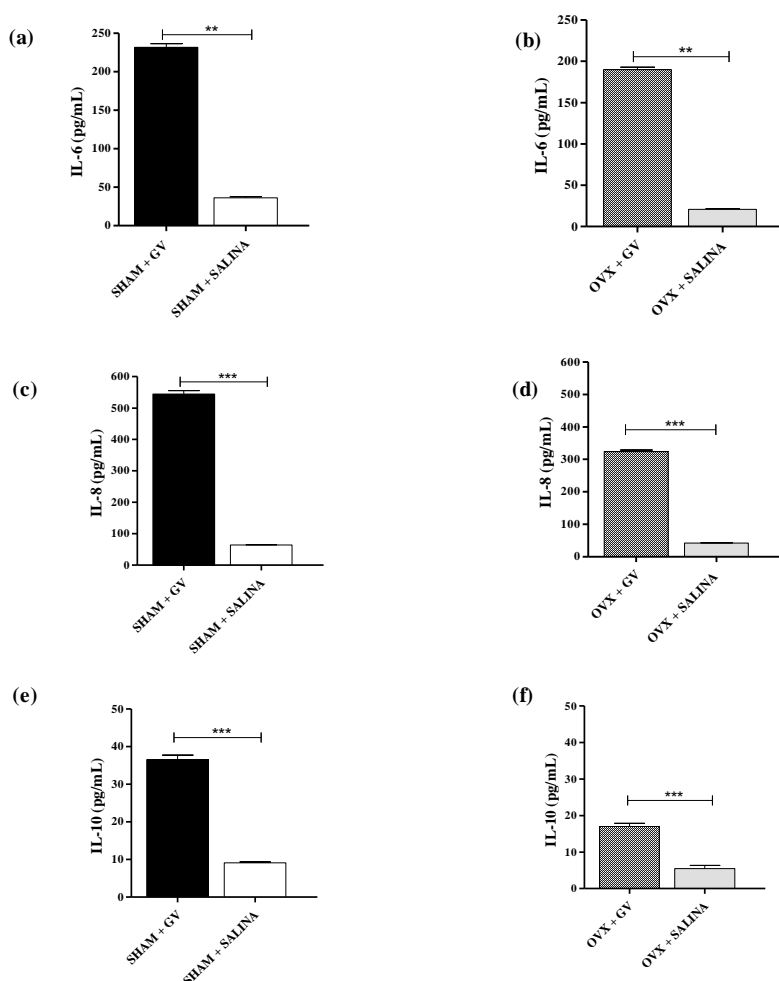


Figura 4. Concentração de citocinas IL-6 (a) e (b), IL-8 (c) e (d), IL-10 (e) em sobrenadante de cultura de MPMs (2×10^5 /mL) de fêmeas SHAM e OVX. MPMs inoculados com $10 \mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV) (10^8 UFC), grupos: (SHAM + GV) e (OVX + GV) ou $10 \mu\text{l}$ salina estéril, grupos: (SHAM + SALINA) e (OVX + SALINA). Todos os experimentos foram realizados pelo tempo de seis horas. Avaliação realizada por ELISA. Dados são expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.2.2.2 Concentração de citocinas em MPMs de fêmeas SHAM e OVX tratados ou não com 17 β -estradiol (E2)

Foi realizado a comparação entre os MPMs das fêmeas SHAM e OVX, infectados com *G. vaginalis* e OVX tratada com 17 β -estradiol (E2) e, posteriormente, infectados com *G. vaginalis*. Neste contexto, observa-se o aumento nas concentrações das citocinas, dos MPMs do grupo SHAM infectados em relação aos MPMs do grupo OVX infectados e OVX tratado com E2 e infectado, respectivamente: IL-6 ($p < 0.0011$; $p < 0.0048$, figura 5a), IL-8 ($p < 0.0048$; $p < 0.0001$, figura 5b) e IL-10 ($p < 0.0001$; $p < 0.0005$, figura 5c). Entre os grupos ovariectomizados, as concentrações para o grupo OVX infectados apresentaram um nível de significância elevada de IL-6 ($p < 0.0048$, figura 5a) e IL-8 ($p < 0.0001$, figura 5b) em relação ao grupo OVX tratado com E2 e infectado. Entretanto, para a dosagem de IL-10 ($p < 0.0005$, figura 5c), o resultado demonstrou uma maior concentração desta citocina para o grupo das fêmeas OVX tratado com E2 e infectado quando comparado com o grupo OVX infectado.

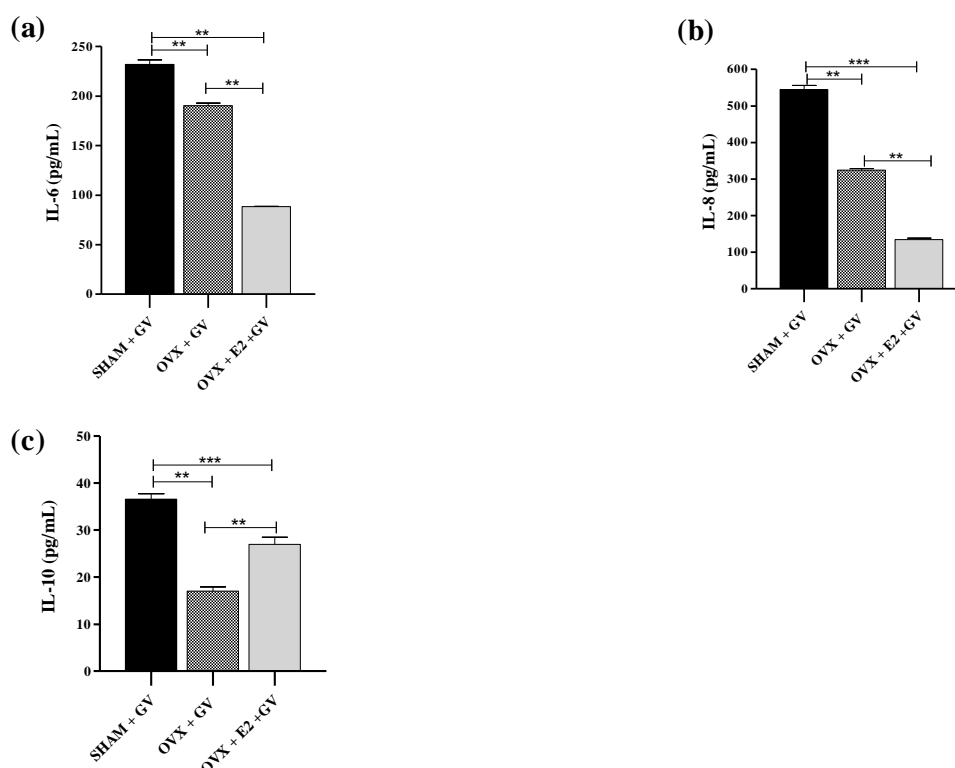


Figura 5. Concentração de citocinas IL-6 (a), IL-8 (b) e IL-10 (c) no sobrenadante de MPMs (2×10^5 /mL) de fêmeas SHAM e OVX. MPMs inoculados com $10 \mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV) (10^8 UFC), por 6 horas, grupos: (SHAM + GV) e (OVX + GV). MPMs de fêmeas OVX pré-tratadas com $100 \mu\text{l}$ 17 β -estradiol (E2) (10^{-7} M), por 6 horas e inoculados $10 \mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV), pelo tempo de seis horas, grupo: (OVX + E2 + GV). Avaliação realizada por ELISA. Dados são expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.2.2.3 Concentração de nitrito totais e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em MPMs de fêmeas SHAM e OVX

Para mensuração dos níveis de nitrito totais e peróxido de hidrogênio, nos sobrenadantes de cultura dos MPMs. Os resultados deste estudo também demonstraram que tanto os MPMs das fêmeas SHAM quanto das fêmeas OVX apresentaram uma maior produção destes mediadores inflamatórios pelas células do grupo infectado com *G. vaginalis* em relação ao grupo salina estéril. Para a dosagem de nitrito totais este resultado pode ser observado para o modelo SHAM ($p < 0.0042$, figura 6a) e modelo OVX ($p < 0.0298$, figura 6b). Em relação ao peróxido de hidrogênio, observa-se este resultado para o modelo SHAM ($p < 0.0009$, figura 6c) e modelo OVX ($p < 0.0048$, figura 6d).

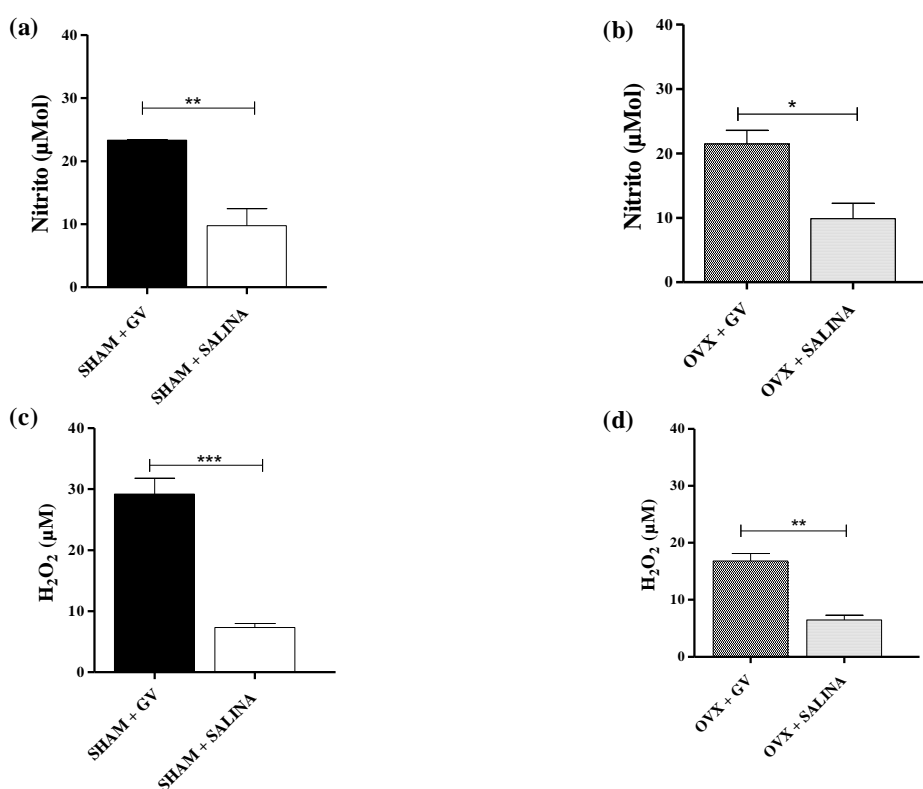


Figura 6. Concentração de nitritos totais (a) e (b) e peróxido de hidrogênio (c) e (d) em sobrenadante de cultura de MPMs (2×10^5 /mL) de fêmeas SHAM e OVX. MPMs inoculados com $10 \mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV) (10^8 UFC), grupos: (SHAM + GV) e (OVX + GV) ou $10 \mu\text{l}$ salina estéril, grupos: (SHAM + SALINA) e (OVX + SALINA). Todos os experimentos foram realizados pelo tempo de seis horas. Avaliação realizada por reação de Griess para nitrito totais e Kits comerciais para peróxido de hidrogênio. Dados são expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.2.2.4 Concentração de nitrito totais e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em MPMs de fêmeas SHAM e OVX tratados ou não com 17β -estradiol (E2)

Foi realizado a comparação entre os MPMs dos grupos experimentais SHAM, OVX, infectados com *G. vaginalis* e OVX tratada com 17β -estradiol (E2) e, posteriormente, infectados com *G. vaginalis*. Neste contexto, não foi observado diferença da concentração de nitritos totais entre os grupos. Entretanto, ao analisar a figura 7b observa-se que tanto os MPMs do grupo infectado com *G. vaginalis* das fêmeas SHAM ($p < 0.0048$) quanto os MPMs das fêmeas OVX tratados com E2 e posteriormente infectados com *G. vaginalis* ($p < 0.0048$) apresentaram maiores concentrações de H_2O_2 em relação aos MPMs do grupo OVX apenas infectado.

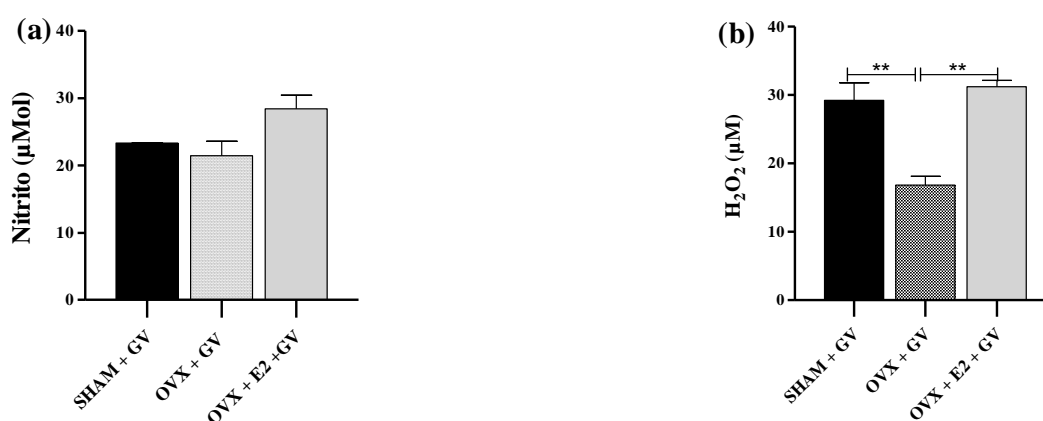


Figura 7. Concentração nitrito totais (a) e peróxido de hidrogênio (b) no sobrenadante de MPMs (2×10^5 /mL) de fêmeas SHAM e OVX. MPMs inoculados com $10\mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV) (10^8 UFC), por 6 horas, grupos: (SHAM + GV) e (OVX + GV). MPMs de fêmeas OVX pré-tratadas com $100\mu\text{l}$ 17β -estradiol (E2) (10^{-7} M), por 6 horas e inoculados $10\mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV), todos pelo tempo de seis horas, grupo: (OVX + E2 + GV). Avaliação realizada por reação de Griess para nitrito totais e Kits comerciais para peróxido de hidrogênio. Dados são expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.2.2.5 Expressão gênica relativa do receptor Toll-Like 2 (TLR2) e o Fator nuclear kappa ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) em MPMs de fêmeas SHAM e OVX

Em relação a expressão gênica do receptor TLR2 e o $\text{NF-}\kappa\text{B}$ pelos MPMs da cultura celular, os resultados deste estudo demonstraram que tanto os MPMs das fêmeas SHAM quanto das fêmeas OVX apresentaram uma maior expressão destes genes pelas células do grupo infectado com *G. vaginalis* em relação ao grupo salina estéril. Para a expressão de TLR2 este resultado pode ser observado para o modelo SHAM ($p < 0.0003$, figura 8a) e modelo OVX ($p < 0.0048$, figura 8b). Em relação ao gene do $\text{NF-}\kappa\text{B}$, observa-se este resultado para o modelo SHAM ($p < 0.0007$, figura 8c) e modelo OVX ($p < 0.0048$, figura 8d).

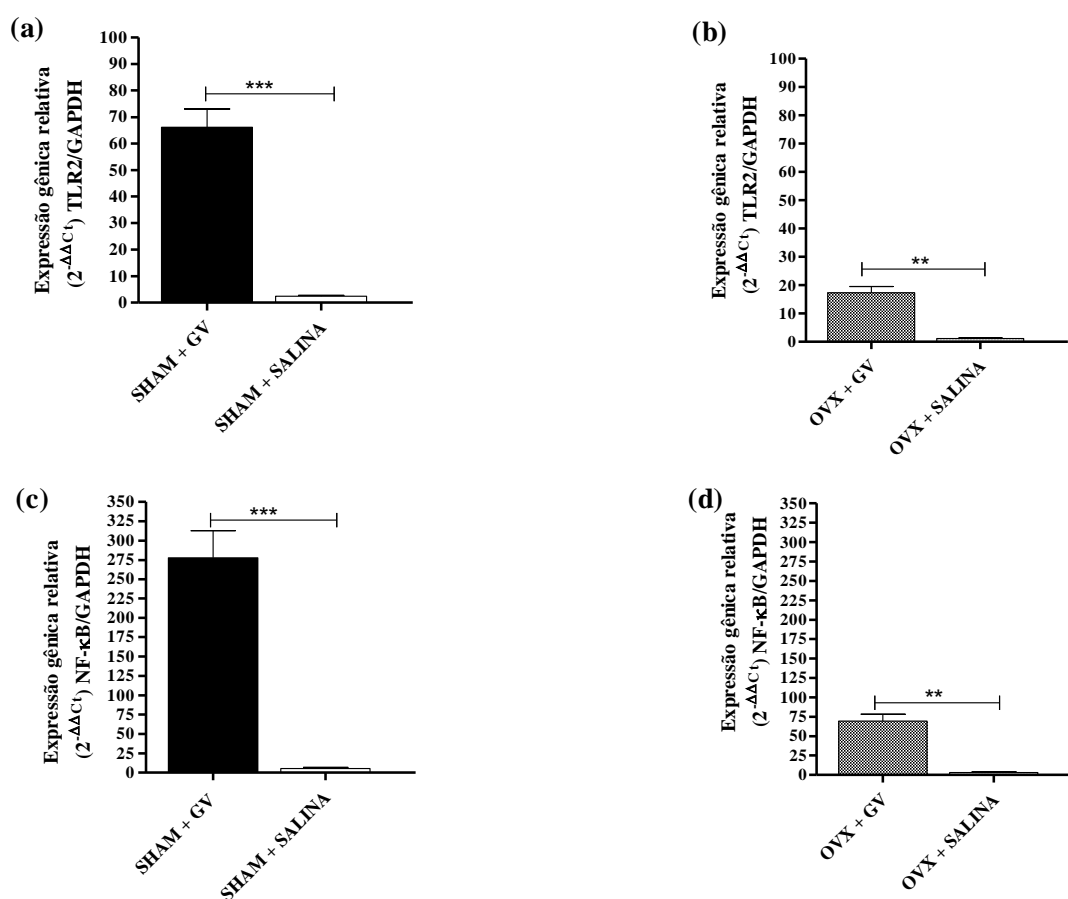


Figura 8. Expressão gênica relativa TLR2 (a) e (b) e $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (c) e (d) em MPMs de cultura celular ($2 \times 10^5/\text{mL}$) de fêmeas SHAM e OVX. MPMs inoculados com $10 \mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV) (10^8 UFC), grupos: (SHAM + GV) e (OVX + GV) ou $10 \mu\text{l}$ salina estéril, grupos: (SHAM + SALINA) e (OVX + SALINA). Todos os experimentos foram realizados pelo tempo de seis horas. Avaliação realizada por RT-qPCR array. Dados são expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.2.2.6 Expressão gênica relativa do receptor Toll-Like 2 (TLR2) e o Fator nuclear kappa (NF- κ B) em MPMs de fêmeas SHAM e OVX tratados ou não com 17 β -estradiol (E2)

Ao realizar a comparação entre os MPMs dos grupos experimentais SHAM, OVX infectados com *G. vaginalis* e OVX tratado com E2 e infectados, pode ser observado que ambos os genes foram mais expressos pelos MPMs das fêmeas SHAM infectado quando comparados com OVX infectado e OVX tratado e infectado. Estes resultados estão demonstrados, respectivamente, de acordo com as comparações entre os grupos para o TLR2 ($p < 0.0011$; $p < 0.0048$, figura 9a) e NF- κ B ($p < 0.0048$; $p < 0.0001$, figura 9b). Entretanto, os MPMs do grupo OVX tratado com E2 apresentou uma maior expressão desses genes quando comparados com os MPMs do grupo apenas infectado das fêmeas ovariectomizadas como apresentados para TLR2 ($p < 0.0001$, figura 9a) e NF- κ B ($p < 0.0001$, figura 9b)

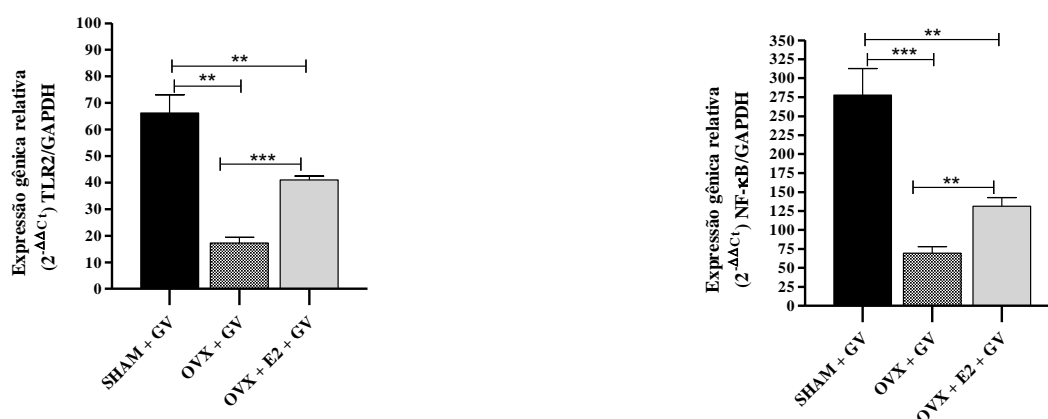


Figura 9. Expressão gênica relativa TLR2 (a) e NF- κ B (b) em MPMs de cultura celular (2×10^5 /mL) de fêmeas SHAM e OVX. MPMs inoculados com $10 \mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV) (10^8 UFC), por 6 horas, grupos: (SHAM + GV) e (OVX + GV). MPMs de fêmeas OVX pré-tratadas com $100 \mu\text{l}$ 17 β -estradiol (E2) (10^{-7} M), por 6 horas e inoculados $10 \mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV), pelo tempo de seis horas, grupo: (OVX + E2 + GV). Avaliação realizada por RT-qPCR array. Dados são expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.2.2.7 Expressão gênica relativa dos receptores estrogênicos intracelulares alfa (ER- α) e beta (ER- β) em MPMs de fêmeas SHAM e OVX

Para a expressão gênica dos ER- α e ER- β pelos MPMs da cultura celular, os resultados deste estudo demonstraram que tanto os MPMs das fêmeas SHAM quanto das fêmeas OVX apresentaram uma maior expressão destes genes pelas células do grupo infectado com *G. vaginalis* em relação ao grupo salina estéril. Para a expressão de ER- α este resultado pode ser observado para o modelo SHAM ($p < 0.0006$, figura 10a) e modelo OVX ($p < 0.0048$, figura 10b). Em relação ao gene do ER- β , observa-se este resultado para o modelo SHAM ($p < 0.0048$, figura 10c) e modelo OVX ($p < 0.0048$, figura 10d).

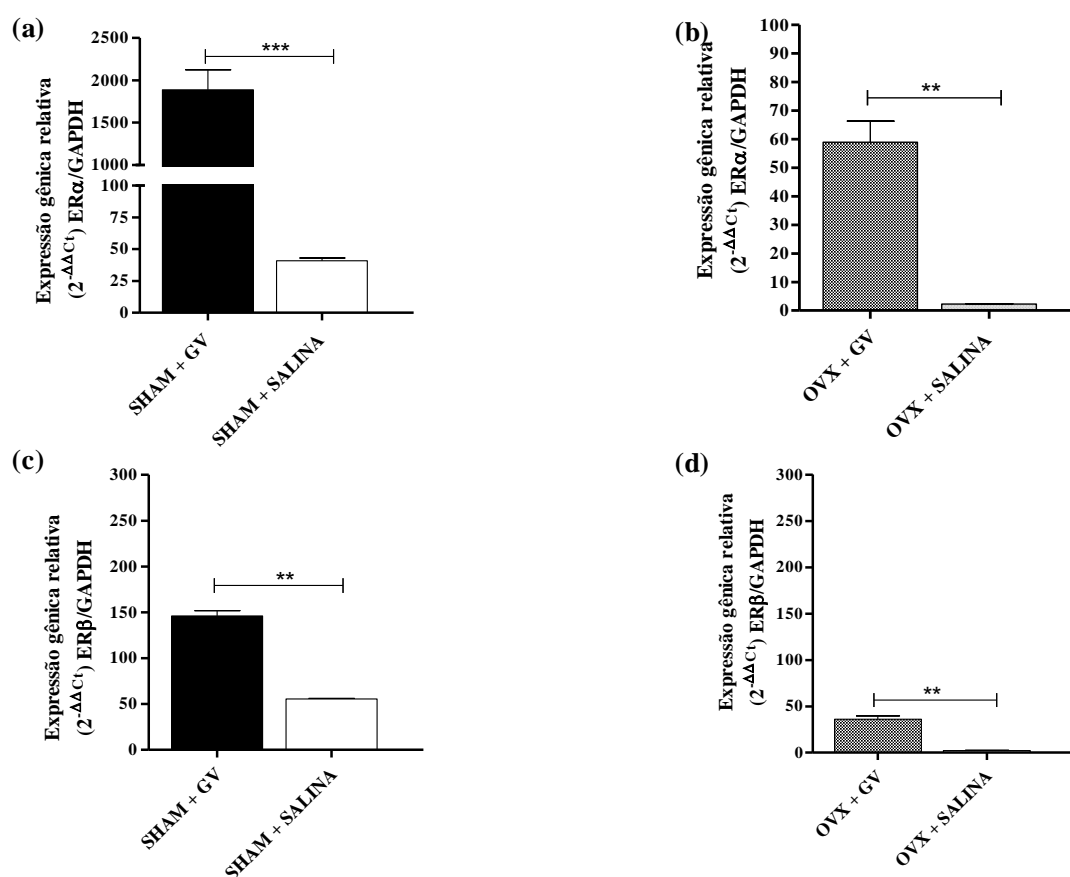


Figura 10. Expressão gênica relativa TLR2 (a) e (b) e NF- κ B (c) e (d) em MPMs de cultura celular (2×10^5 /mL) de fêmeas SHAM e OVX. MPMs inoculados com $10 \mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV) (10^8 UFC), grupos: (SHAM + GV) e (OVX + GV) ou $10 \mu\text{l}$ salina estéril, grupos: (SHAM + SALINA) e (OVX + SALINA). Todos os experimentos foram realizados pelo tempo de seis horas. Avaliação realizada por RT-qPCR array. Dados são expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.2.2.8 Expressão gênica relativa dos receptores estrogênicos intracelulares alfa (ER- α) e beta (ER- β) em MPMs de fêmeas SHAM e OVX tratados ou não com 17 β -estradiol (E2)

Ao realizar a comparação das expressões dos receptores ER- α e ER- β entre os MPMs dos grupos das fêmeas SHAM, OVX e OVX tratado com E2 infectados com *G. vaginalis* (GV), pode ser observado uma maior expressão destes receptores entre os MPMs das fêmeas SHAM infectados e OVX tratados com E2 e infectados quando comparados com OVX infectados. Os resultados são demonstrados, respectivamente, para ER- α ($p < 0.0005$; $p < 0.0048$, figura 11a) e ER- β ($p < 0.0048$; $p < 0.0006$, figura 11b). Para a comparação entre os MPMs das fêmeas SHAM e OVX tratados com E2 infectados os resultados apresentaram diferença entre os receptores. Para o ER- α os MPMs das fêmeas SHAM apresentaram uma maior expressão ($p < 0.0048$, figura 11a), enquanto que para o ER- β a expressão foi maior para os MPMs das fêmeas OVX tratadas e infectadas ($p < 0.0048$, figura 11b).

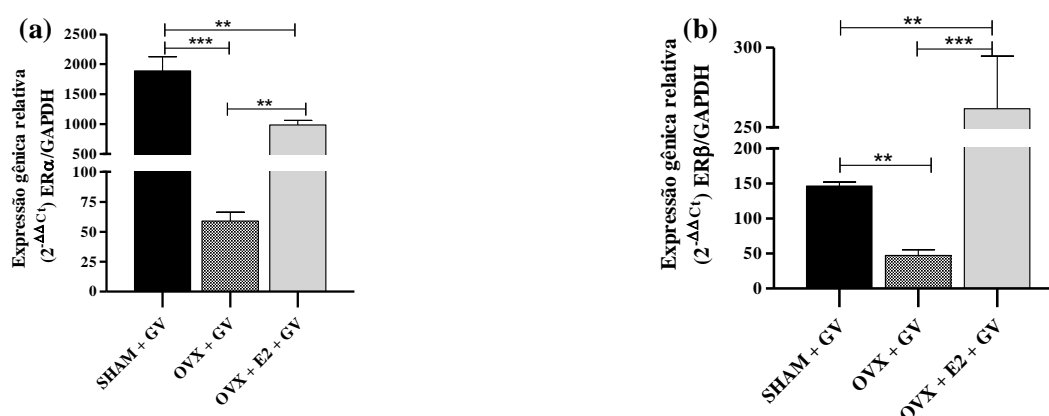


Figura 11. Expressão gênica relativa TLR2 (a) e NF- κ B (b) em MPMs de cultura celular (2×10^5 /mL) de fêmeas SHAM e OVX. MPMs inoculados com $10 \mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV) (10^8 UFC), por 6 horas, grupos: (SHAM + GV) e (OVX + GV). MPMs de fêmeas OVX pré-tratadas com $100 \mu\text{l}$ 17 β -estradiol (E2) (10^{-7} M), por 6 horas e inoculados $10 \mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV), pelo tempo de seis horas, grupo: (OVX + E2 + GV). Avaliação realizada por RT-qPCR array. Dados são expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.3 Experimentos com Seres Humanos

5.3.1 Modelo *In vivo*

5.3.1.1 Avaliação de saúde geral dos sujeitos da pesquisa

A avaliação do estado de saúde dos voluntários foi importante para a exclusão de indivíduos com parâmetros que poderiam vir a interferir na cultura hPMs e na resposta imunológica dessas células. Conforme os resultados dos exames realizados, todos os sujeitos de pesquisa incluídos neste estudo estavam saudáveis (Tabela 1). Foi observado que as mulheres na idade reprodutiva apresentaram um maior número de eritrócitos. As mulheres na menopausa as concentrações de glicose; colesterol total; LDL, e TGP apresentaram maiores concentrações. Contudo, tais alterações não comprometem os resultados dos experimentos realizados, pois individualmente os resultados estavam dentro dos valores de referência.

Tabela 1. Avaliação de estado de saúde geral dos (as) voluntários (as).

Avaliação de Estado de Saúde Geral dos (as) Voluntários (as)				
	Mulheres reprodutivas (n=9)	Mulheres pos-menopausa (n=9)	Valor de referência	p-valor
Eritrócitos	4,71 ± 0,27	4,51 ± 0,37	4,0 a 5,2 (milhões/mm ³)	0.1923
Leucócitos	6697,89 ± 1936,16	4588,63 ± 1207,25	4000 a 10000 /mm ³	0.0106*
Plaquetas	251400,00 ± 55194,67	211160,38 ± 26138,30	150000 a 450000	0.1135
Glicose	69,88 ± 29,65	89,25 ± 5,44	65 a 99 mg/dL	0.0420*
Colesterol total	180 ± 27,30	214,15 ± 21,15	< 190 mg/dL	0.0252*
LDL	104,6 ± 23,40	134,6 ± 22,94	< 130 mg/dL	0.0281*
HDL	55,11 ± 16,24	54,56 ± 9,88	> 40 mg/dL	0.9238
Triglicérides	106,6 ± 63,32	126,2 ± 32,58	< 175 mg/dL	0.0920
TGO	18,56 ± 3,7	20,44 ± 3,20	< 35U/L	0.3394
TGP	15,33 ± 3,42	21,22 ± 3,47	7 a 52U/L	0.0236*

Dados são expressos como média ± DPM. *p<0,05.

5.3.1.2 Níveis dos hormônios sexuais femininos das voluntárias

A dosagem nos níveis dos hormônios sexuais femininos referentes as coletas de sangue periférico das voluntárias revelam que durante o período reprodutivo existe uma elevada concentração de 17β -estradiol ($p < 0,000$, figura 12a) e Progesterona ($p < 0,0031$, figura 12b) quando comparado a mulheres na pós-menopausa. Em contraste, observa-se elevadas concentrações dos hormônios folículo estimulante (FSH) ($p < 0,0009$, figura 12c) e luteinizante (LH) ($p < 0,0008$, figura 12d) em mulheres pós-menopausa quando comparadas a mulheres em idade fértil.

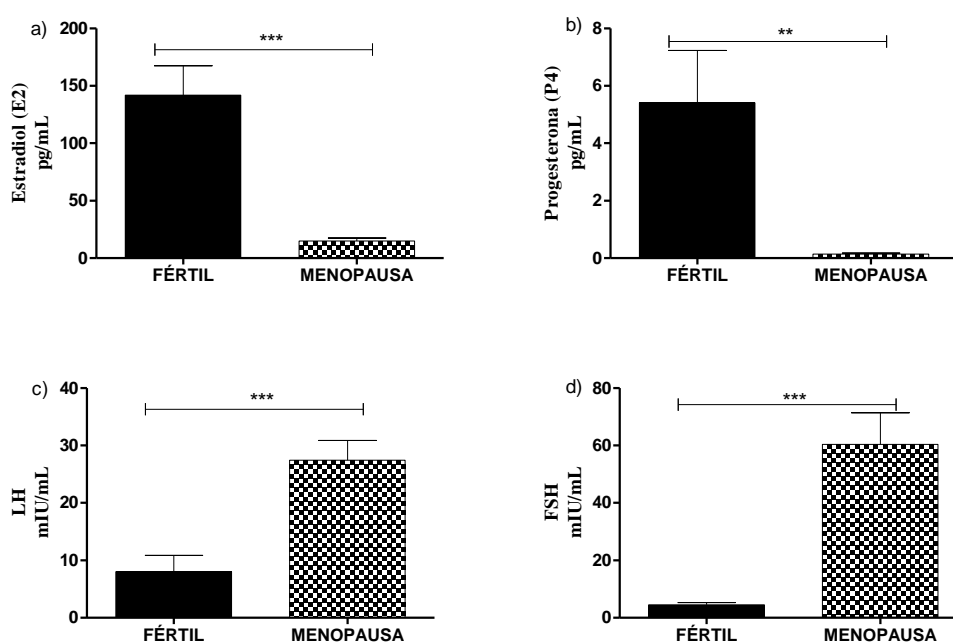
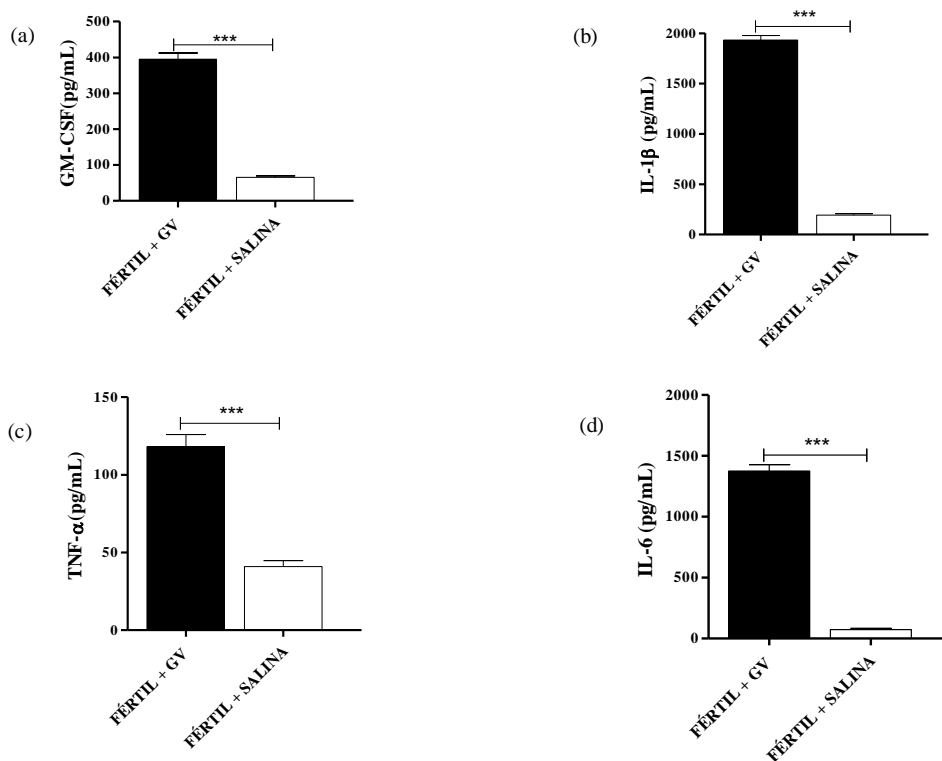


Figura 12. Concentração dos hormônios sexuais femininos entre mulheres na fase reprodutiva e da pós-menopausa. (a) Concentração sérica de estradiol (E2). (b) Concentração sérica de progesterona (c) Concentração sérica de FSH (Hormônio folículo estimulante). (D) Concentração sérica de LH (Hormônio luteinizante). Os dados são expressos como média \pm DPM. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$

5.3.2 Modelo *In vitro*

5.3.2.1 Concentração de citocinas em hPMs de mulheres no período fértil

As citocinas, GM-CSF, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-23, IL-27 e IL-10, foram mensuradas nos sobrenadantes de cultura produzidos pelos hPMs. Os resultados deste estudo apresentaram uma maior produção de todas as citocinas para os hPMs do grupo infectado com *G. vaginalis*, quando comparado com o grupo apenas com salina estéril. Para a citocina GM-CSF este resultado pode ser observado para o modelo FÉRTIL ($p < 0.0001$, figura 13a). Em relação a citocina IL-1 β , observa-se maior expressão para esta citocina na figura 13b ($p < 0.0001$). TNF- α : ($p < 0.0004$, figura 13c) IL-6: ($p < 0.0004$, figura 13d), IL-12: ($p < 0.0001$, figura 13e), IL-23: ($p < 0.0001$, figura 13f), IL-27: ($p < 0.0001$, figura 13g), IL-10: ($p < 0.0001$, figura 13h).



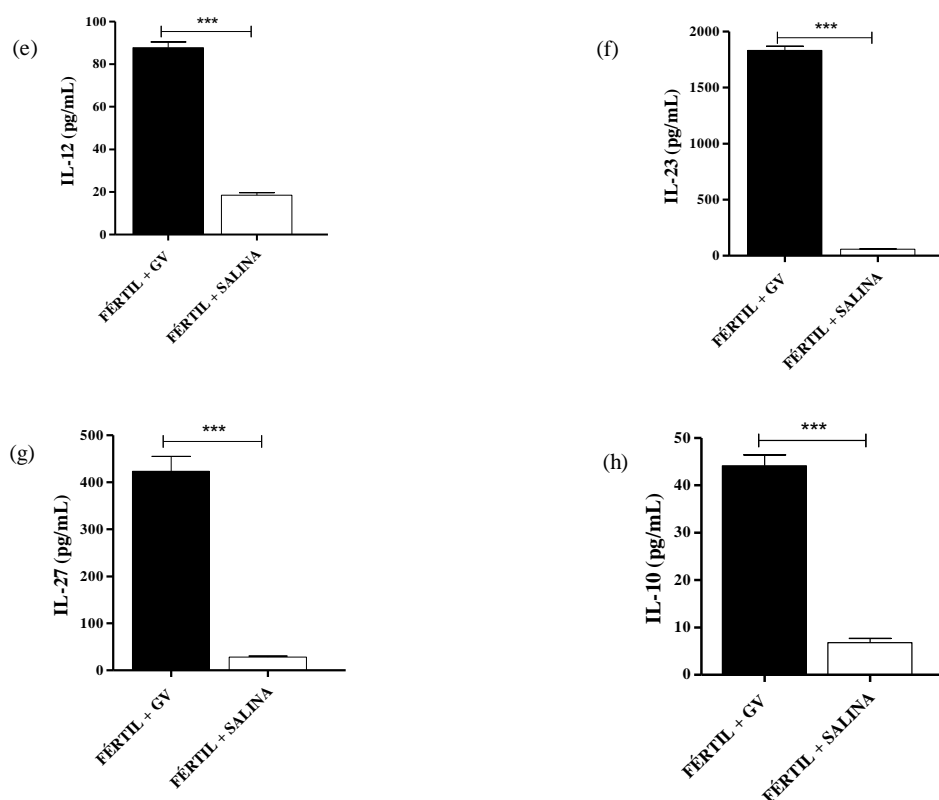


Figura 13. Concentração de citocinas GM-CSF (a), IL-1 β (b), TNF- α (c), IL-6 (d), IL-12 (e), IL-23 (f), IL-27 (g) (o) e IL-10 (h) em sobrenadante de cultura de hPMs (2×10^5 /mL) de mulheres em período fértil. hPMs inoculados com 10 μ l *G. vaginalis* (GV) (10^8 UFC), grupos: (FÉRTIL + GV) ou 10 μ l salina estéril, grupos: (FÉRTIL + SALINA). Todos os experimentos foram realizados pelo tempo de seis horas. Avaliação realizada por ELISA. Dados são expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.3.2.2 Concentração de citocinas em hPMs de mulheres na menopausa

As citocinas, GM-CSF, IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12, IL-23, IL-27 e IL-10, foram mensuradas nos sobrenadantes de cultura produzidos pelos hPMs. Os resultados deste estudo apresentaram uma maior produção de todas as citocinas para os hPMs do grupo infectado com *G. vaginalis*, quando comparados com o grupo apenas com salina estéril. Para a citocina GM-CSF este resultado pode ser observado para o modelo MENOPAUSA ($p < 0.0001$, figura 14a). Em relação a citocina IL-1 β , observa-se a maior expressão desta citocina na figura 14b ($p < 0.0001$). TNF- α : ($p < 0.0005$, figura 14c); IL-6: ($p < 0.0001$, figura 14d); IL-12: ($p < 0.0001$, figura 14e); IL-23: ($p < 0.0001$, figura 14f), IL-27: ($p < 0.0001$, figura 14g), IL-10: ($p < 0.0001$, figura 14h).

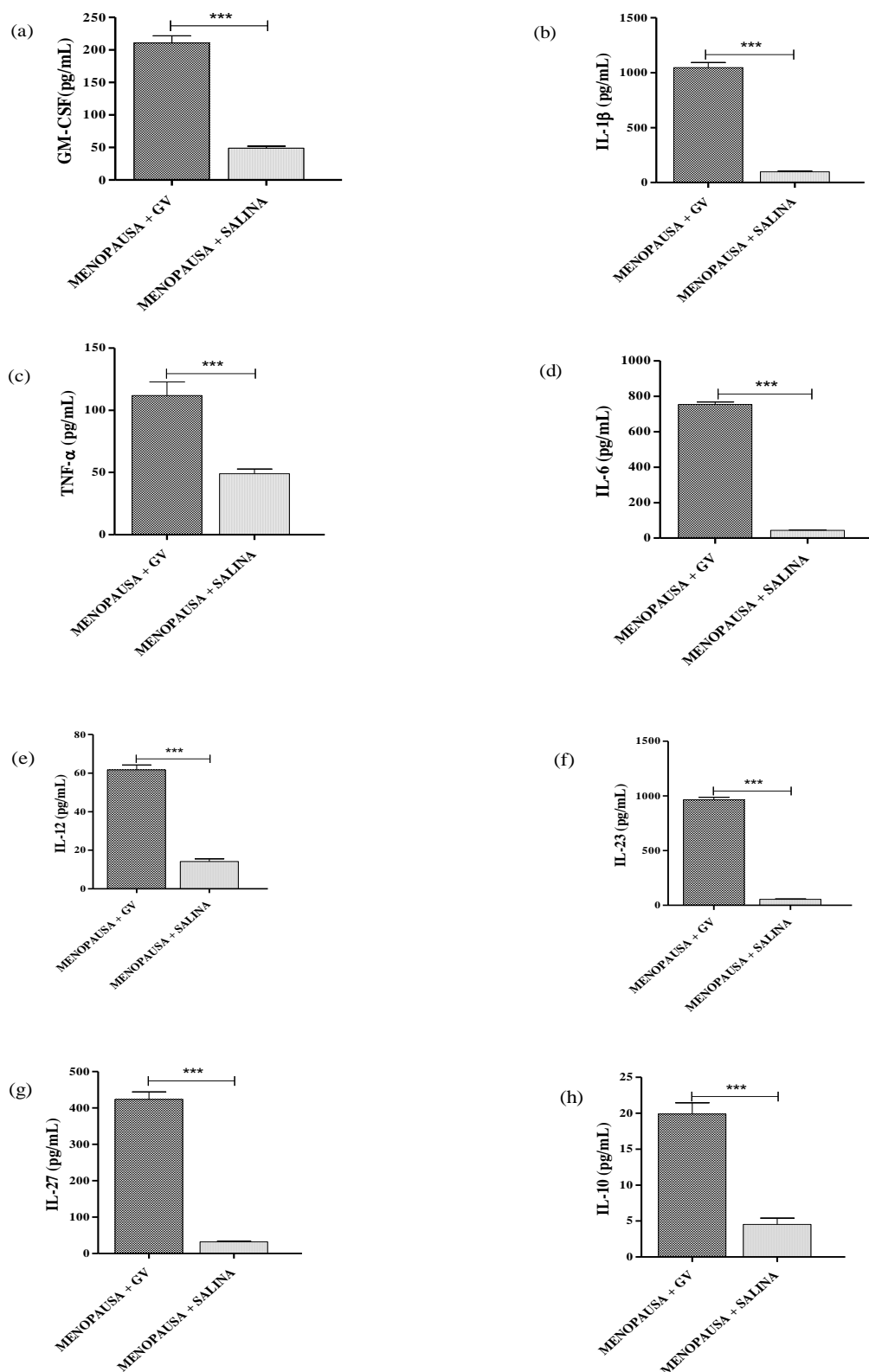


Figura 14. Concentração de citocinas GM-CSF (a), IL-1 β (b), TNF- α (c), IL-6 (d), IL-12 (e), IL-23 (f), IL-27 (g) (o) e IL-10 (h) em sobrenadante de cultura de hPMs (2×10^5 /mL) de mulheres em período da menopausa. hPMs inoculados com 10 μ l *G. vaginalis* (GV) (10^8 UFC), grupos: (MENOPAUSA + GV) ou 10 μ l salina estéril, grupos: (MENOPAUSA + SALINA). Todos os experimentos foram realizados pelo tempo de seis horas. Avaliação realizada por ELISA. Dados são expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.3.2.2 Concentração de citocinas em hPMs de mulheres no período fértil e menopausa tratados ou não com 17β -estradiol (E2)

Foi realizado a comparação entre os hPMs das mulheres do grupo fértil e menopausa, infectados com *G. vaginalis* e menopausa tratada com 17β -estradiol (E2) e, posteriormente, infectados com *G. vaginalis*. Neste contexto, observa-se o aumento nas concentrações das citocinas, dos hPMs do grupo fértil infectados em relação aos hPMs do grupo OVX infectados e OVX tratado com E2 e infectado, respectivamente: GM-CSF ($p < 0.0001$; $p < 0.0001$, figura 15a), IL-1 β ($p < 0.0001$; $p < 0.0001$, figura 15b), IL-6 ($p < 0.0001$; $p < 0.0001$, figura 15d), IL-12 ($p < 0.0001$; $p < 0.0001$, figura 15e), IL-23 ($p < 0.0001$; $p < 0.0001$, figura 15f). Para TNF- α o grupo fértil apenas apresentou maior concentração apenas quando comparado com menopausa submetido ao tratamento com E2 ($p < 0.0383$, figura 15c). Entre os grupos de mulheres na menopausa, as concentrações para os hPMs infectados apresentaram um nível de significância para GM-CSF ($p < 0.0001$, figura 15a), IL-1 β ($p < 0.0016$, figura 15b), IL-6 ($p < 0.0008$, figura 15d), IL-12 ($p < 0.0016$, figura 15e), IL-23 ($p < 0.0016$, figura 15f) em relação as células tratadas com E2 e infectado. Entretanto, para a dosagem de IL-10 ($p < 0.0001$, figura 15h), o resultado demonstrou uma maior concentração desta citocina para o grupo de hPMs de mulheres na menopausa tratado com E2 e infectado quando comparado com o grupo de menopausa infectado. A citocina IL-27 não apresentou diferença entre as comparações.

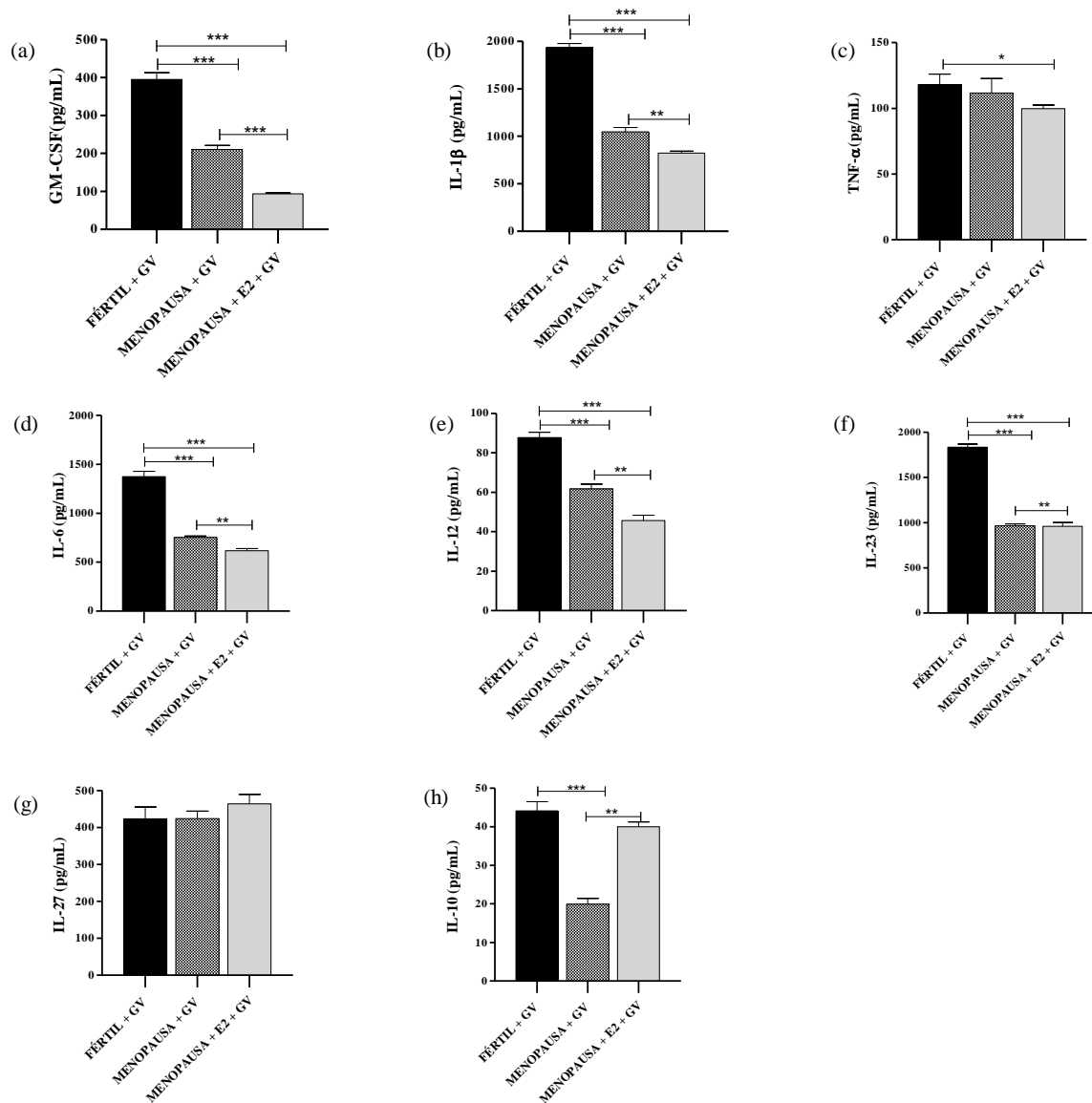


Figura 15. Concentração de citocinas GM-CSF (a) IL-1 β (b), TNF- α (c), IL-6 (d) IL-12 (e), IL-23 (f), IL-27 (g) e IL-10 (h) no sobrenadante de hPMs (2×10^5 /mL) de mulheres em período fértil e menopausa, respectivamente. hPMs inoculados com $10 \mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV) (10^8 UFC), por 6 horas, grupos: (FÉRTIL + GV) e (MENOPAUSA + GV). hPMs de mulheres na menopausa pré-tratadas com $100 \mu\text{l}$ 17β -estradiol (E2) (10^{-7} M), por 6 horas e inoculados $10 \mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV), pelo tempo de seis horas, grupo: (MENOPAUSA + E2 + GV). Avaliação realizada por ELISA. Dados são expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.3.2.3 Concentração de nitrito totais e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em hPMs de mulheres no período fértil e menopausa

Os hDMs apresentaram maiores produções de nitritos totais ($p < 0.0424$, figura 16a) e peróxido de hidrogênio ($p <$ figura 16b) para as células inoculadas com *G. vaginalis* quando comparados com as inoculadas com salina estéril apenas para mulheres em idade fértil. Não houve diferença estatística quanto a comparação entre as células inoculadas com *G. vaginalis* e salina estéril de mulheres na pós-menopausa (figura 16b e 16d).

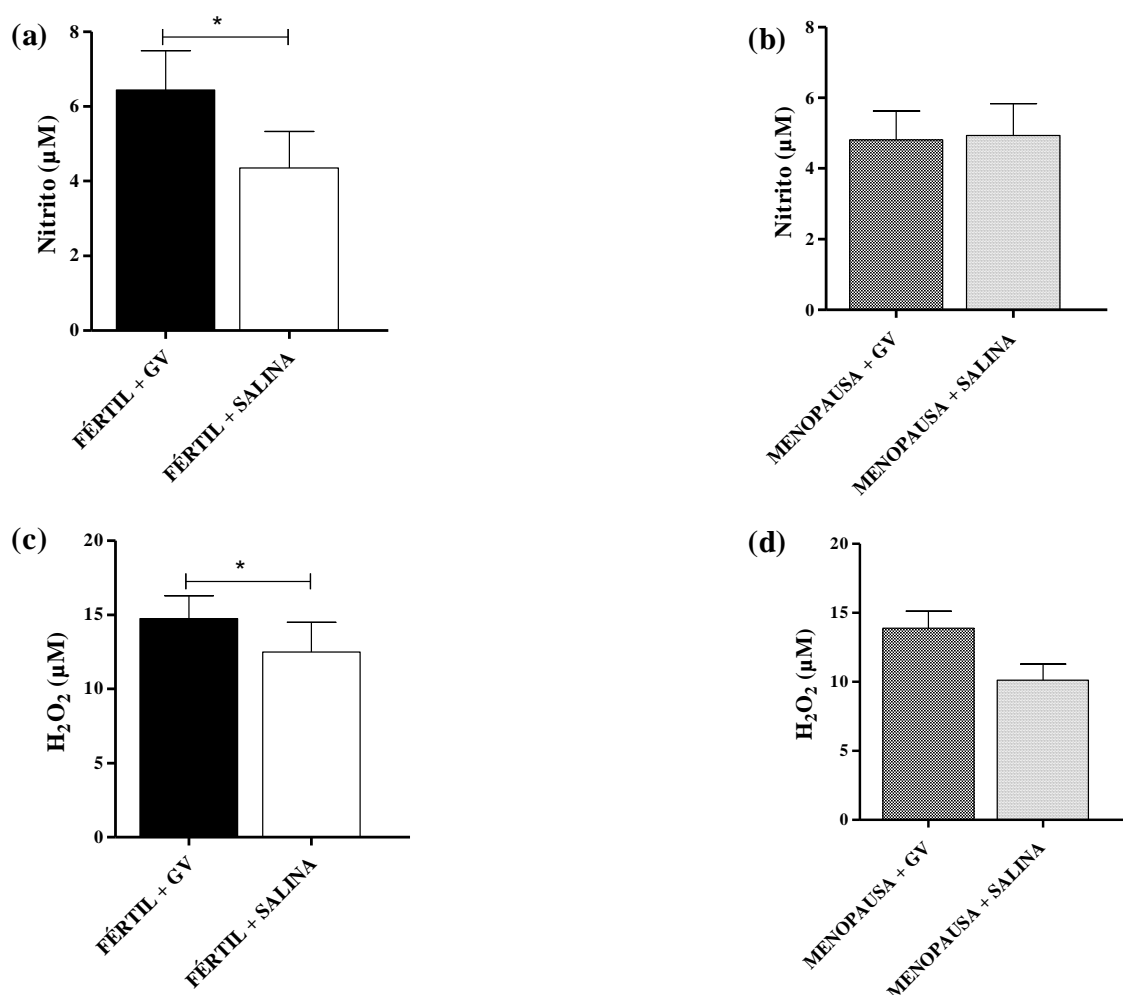


Figura 16. Concentração de nitritos totais (a) e (b) e peróxido de hidrogênio (c) e (d) em sobrenadante de cultura de hPMs (2×10^5 /mL) de mulheres em período fértil e menopausa. hPMs inoculados com $10 \mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV) (10^8 UFC), grupos: (FÉRTIL + GV) e (MENOPAUSA + GV) ou $10 \mu\text{l}$ salina estéril, grupos: (FÉRTIL + SALINA) e (MENOPAUSA + SALINA). Todos os experimentos foram realizados pelo tempo de seis horas. Avaliação realizada por reação de Griess para nitrito totais e Kits comerciais para peróxido de hidrogênio. Dados são expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

5.3.2.4 Concentração de nitrito totais e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em hPMs de mulheres no período fértil e menopausa tratados ou não com 17β -estradiol (E2)

Para a comparação entre os hPMs dos grupos experimentais FÉRTIL, MENOPAUSA, infectados com *G. vaginalis* e MENOPAUSA tratada com 17β -estradiol (E2) e, posteriormente, infectados com *G. vaginalis*, não foi observado diferença da concentração de nitritos totais entre os grupos. Entretanto, ao analisar a figura 17b observa-se que os hPMs do grupo infectado com *G. vaginalis* das mulheres na menopausa ($p < 0.0208$) apresentaram maior produção deste reativo de oxigênio quando comparadas com mulheres férteis e mulheres na menopausa com tratamento.

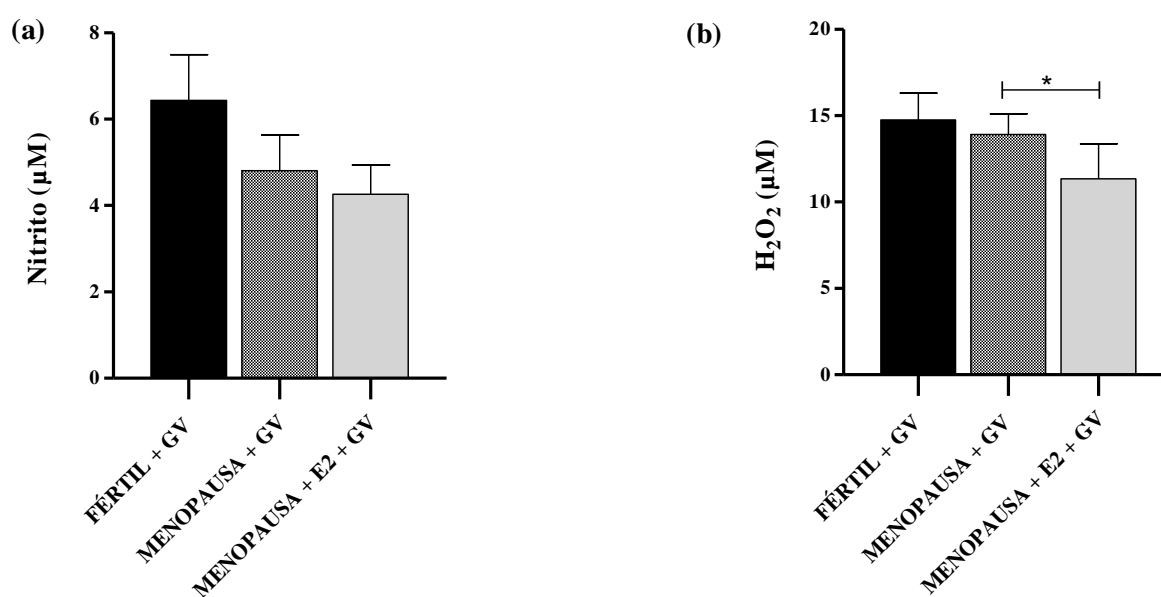


Figura 17. Concentração nitritos totais (a) e peróxido de hidrogênio (b) no sobrenadante de hPMs (2×10^5 /mL) de mulheres em período fértil e menopausa. hPMs inoculados com $10 \mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV) (10^8 UFC), por 6 horas, grupos: (FÉRTIL + GV) e (MENOPAUSA + GV). hPMs de mulheres na menopausa pré-tratadas com $100 \mu\text{l}$ 17β -estradiol (E2) (10^{-7} M), por 6 horas e inoculados $10 \mu\text{l}$ *G. vaginalis* (GV), todos pelo tempo de seis horas, grupo: (MENOPAUSA + E2 + GV). Avaliação realizada por reação de Griess para nitrito totais e Kits comerciais para peróxido de hidrogênio. Dados são expressos como média \pm DPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

6 DISCUSSÃO

G. vaginalis é um bacilo facultativo e gram-variável, residente da microbiota vaginal, sendo o principal agente etiológico da vaginose bacteriana (VB) (CASTRO et al., 2017). Por razões ainda não muito esclarecidas, a resposta imune tanto à *G. vaginalis* quanto à VB apresentam dados da literatura díspares e pouco caracterizadas (GARCIA et al., 2019). A resposta a esse patógeno, em sua maioria, apresenta-se com pouca resposta inflamatória, sendo relacionada na literatura sua capacidade de evasão do sistema imune (SMITH; RAVEL, 2017). Entretanto é reconhecido na literatura complicações como doença inflamatória pélvica, aborto e parto pré-maturo, mesmo que, na maioria dos casos, a afecção se mostre assintomática (CAUCI et al., 2002). A VB é considerada a principal desordem vaginal que acomete as mulheres em fase reprodutiva (SCHWEBKE et al., 2014). Nesta fase ocorrem os maiores níveis de hormônios ovarianos, estrógeno e progesterona; hormônios que modulam o sistema imune sob diversas influências (VILLA et al., 2015), alterando-se conforme a fase do ciclo menstrual (folicular e lútea) e na pós-menopausa (FISH, 2014). Estas alterações influenciam a capacidade fagocítica, quimiotática, como também na inibição ou produção de citocinas e anticorpos (BOUMAN, HEINEMAN, FAAS, 2005). O 17 β -estradiol (E2) é o principal hormônio estrogênico e conhecido na literatura pela sua atividade anti-inflamatória (AOMATSU et al., 2013; SHIVERS et al., 2015). Seus mecanismos de ação são estudados prioritariamente através dos seus receptores intracelulares, que se apresentam em duas isoformas: alfa (ER α) e beta (ER- β) (GHOSH, RODRIGUEZ-GARCIA, WIRA, 2015). Não é conhecido na literatura uma relação direta entre *G. vaginalis* e estradiol. No entanto, este hormônio tem uma relação direta com a alteração da microbiota vaginal de fêmeas (SMITH; RAVEL, 2017). Em período reprodutivo, fêmeas produzem altos níveis de estradiol resultando em mais depósitos de glicogênio nas células epiteliais e glicogênio livre disponível para *Lactobacillus spp* (MUHLEISEN, HERBST-KRALOVETZ, 2016). A patogenia da VB está relacionada com a depleção *Lactobacillus spp* e aumento de bactérias anaeróbicas hipotetizando que alterações estrogênicas induziriam ao estabelecimento da vaginose bacteriana (SMITH; RAVEL, 2017).

Para melhor compreender a interação do E2 com a capacidade proliferativa de microrganismos, foi realizado uma curva de crescimento, no qual foi observado a capacidade bacteriostática do 17 β -estradiol sob *G. vaginalis*. Essa característica inibitória também foi observada por Guess e colaboradores (2019), ao quantificarem *Cryptococcus neoformans*, que evidenciaram uma maior capacidade proliferativa em células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de homens em comparação com mulheres, exceto quando as células

foram tratadas com 17- β estradiol. Por outro lado, camundongos machos e fêmeas, suplementados com E2, demonstraram diminuição da depuração de *Pseudomonas aeruginosa*, independente da progesterona, indicando que o estradiol (E2) tem ação proliferativa (ABID et al., 2017). Essas informações contraditórias, juntamente com o resultado do presente estudo, indicam que o E2 não tem características exclusiva de inibição ou proliferação, mas que sua influência sob a capacidade de proliferação de patógenos tende a ser microrganismo dependente.

As fêmeas OVX deste estudo apresentaram maior peso corporal e menor peso uterino devido a atrofia uterina, quando comparadas com as SHAMs. Estes resultados são corroborados com literatura em que pesquisadores observaram ganho de massa corporal após procedimento de ovariectomia em animais (LAMAS et al., 2015, MELI et al., 2004). YAO e colaboradores (2018) demonstraram uma redução significativa do peso do útero das fêmeas ovariectomizadas quando comparadas ao peso das fêmeas SHAMs. Da mesma maneira, De Oliveira e colaboradores (2010) observaram que fêmeas submetidas à ovariectomia apresentam menores níveis séricos de estradiol quando comparadas com SHAM na fase do ciclo proestro. Esta informação confirma o resultado do presente estudo, no qual o grupo OVX também apresentou menores níveis de estradiol ao ser comparados com o grupo de fêmeas SHAMs. Estes resultados são amplamente discutidos na literatura onde fêmeas sem atividade ovariana apresentam redução estrogênica, bem como, elevação da massa corpórea (HEINE et al., 2000; KO e KIM, 2020). Além disso, esses resultados mostram que o útero é um órgão-alvo do estradiol exercendo ação proliferativa no endométrio e hipoestrogesterismo interfere diretamente no peso deste órgão (WOOD et al., 2007).

Quando observado os resultados referentes às mulheres, constata-se que a transição do período reprodutivo para a menopausa é marcada por profundas alterações hormonais ocasionadas pela inatividade ovariana (COSTA, 2014). Tal fato pode ser evidenciado neste estudo, no qual é possível perceber uma redução acentuada dos hormônios estradiol e progesterona em mulheres no período da menopausa quando comparado a mulheres reprodutivas. Em contrapartida, na menopausa ocorre hiperatividade do eixo hipotalâmico-hipofisário-gônadas que estimula o ovário a produzir estradiol (RETTBERG; YAO; BRINTON, 2014). Porém, como esse período é marcado pela falência ovariana, ocorre uma retroalimentação estimulando a hipófise a liberar os hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) continuamente (RETTBERG; YAO; BRINTON, 2014, ROBKER et al., 2018). Esse cenário também pode ser constatado neste estudo ao comparar as mulheres férteis

com as que estão no período da menopausa, demonstrando assim, um aumento nos níveis dos hormônios hipofisários nas mulheres sem atividade ovariana.

No presente estudo, foram realizadas as dosagens de citocinas, *in vitro*, em macrófagos peritoneais de murinos (MPMs) e monócitos de sangue periférico humanos (hPMs). As citocinas IL-6, IL-8 e IL-10 foram mensuradas nos sobrenadantes de cultura de MPMs e hPMs e as citocinas GM-CSF, IL-1 β , TNF- α , IL-12, IL-23, IL-27 apenas no sobrenadante de hPMs. Todas as citocinas testadas apresentaram maiores concentrações quando desafiadas com *G. vaginalis* em comparação com células apenas com salina estéril. CAUCI e colaboradores, (2004) e SMITH e RAVEL, (2017) encontraram maiores níveis de IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-8, IL-10, IL-12p70, no lavado vaginal de mulheres na fase reprodutiva com característica de microbiota de VB. Outros estudos reafirmam este papel estimulador da resposta imune da microbiota relacionada a mulheres positivas para vaginose bacteriana (ANAHTAR et al, 2015; SHIPITSYNA et al, 2012). As citocinas são produzidas em decorrência a alguma alteração no organismo (LIN, CALVANO, LOWRY, 2000; ROSE-JOHN, 2018). Elas são moléculas que estimulam ou inibem diversas células com função de característica imunológica para o reestabelecimento da homeostase do organismo (LIN, CALVANO, LOWRY, 2000; ROSE-JOHN, 2018). As ações das citocinas são redundantes, ou seja, uma mesma ação pode ser desencadeada por mais de um tipo de citocina (ZHANG, 2007; MURAKAMI. KAMIMURA e HIRANO, 2019) e, frequentemente, estimula suas células alvo a produzirem mais citocinas, tendo um efeito do tipo cascata (SOMMER, WHITE, 2010; GANDHI et al. 2016).

Para GM-CSF, foram observados maiores níveis desta citocina nos hPMs oriundos de mulheres em fase reprodutiva quando comparados com hPMs de mulheres na menopausa. No entanto, hPMs de mulheres submetidas ao pré-tratamento com E2, produziram menores níveis de GM-CSF tanto em comparação com células de mulheres férteis quanto no período da menopausa, indicando uma possível atividade anti-inflamatória ao tratamento isolado com E2. GM-CSF tem como principais fontes de produção macrófagos, células endoteliais atuando nos progenitores da medula óssea, (MO) tendo como função aumentar a produção de leucócitos inflamatórios eficazes na cicatrização de feridas (HAMILTON, 2020). Da mesma maneira que o presente estudo, Suzuki e colaboradores (2007) observaram uma diminuição de GM-CSF em fêmeas ovariectomizadas pré-tratadas com E2. Porém, os autores também observaram que o tempo de tratamento das fêmeas influencia nos níveis de GM-CSF, pois, fêmeas tratadas por 10 semanas, apresentaram níveis elevados de GM-CSF. De maneira contrária ao presente estudo, em uma pesquisa com queratinócitos humanos foi observado um

aumento de GM-CSF ao tratamento do estradiol (KANADA e WATANABE, 2004). Entretanto, nestes contextos, para a GM-CSG, pode-se avaliar que o estradiol tem uma relação dicotômica indicando uma característica imunomodulatória. Todavia, para o resultado do nosso estudo, o E2 apresentou uma característica anti-inflamatória.

IL-1 β é principalmente produzida por monócitos/macrófagos ativados e células endoteliais. Existem duas espécies conhecidas de IL-1: IL1 α e IL1 β . A IL-1 α está predominantemente associada às membranas celulares e exerce sua influência por meio de contatos entre células (DINARELLO, 2018). A IL-1 β é mais facilmente detectável na circulação e é capaz de induzir alterações fisiológicas e metabólicas semelhantes às induzidas pelo TNF- α (DINARELLO, 1991; FONG et al., 1996; MANTOVANI et al., 2019). No presente estudo, observou-se resultando semelhante ao anterior. Mulheres em idade reprodutiva apresentaram maiores níveis desta citocina quando comparadas com mulheres no período da menopausa. Além disso, para os hPMs tratados com E2 obteve-se mesmo padrão da resposta anterior. O tratamento ao E2 exógeno demonstrou diminuir os níveis de IL-1 β quando comparadas com células sem tratamento para ambos os períodos reprodutivos e menopausa. Em um estudo *in vivo* com ratas mantidas em níveis hormonais de pseudoestro, Joo e colaboradores (2011) infectaram intravaginalmente animais com *G. vaginalis* e observaram níveis elevados de IL-1 β , TNF- α e IL-6, sendo esses níveis reduzidos pelo tratamento oral e intravaginal de *L. johnsonii*. Níveis elevados de IL-1 também foram observados por Anderson e colaboradores (2011) em esfregaços vaginais de gestantes positivas para VB, com detecção de *G. vaginalis* quando comparados com VB negativas.

Quando se observa estudos ao tratamento do E2, os dados em literatura são controversos. Kramer e colaboradores (2004) ao dosarem IL-1 em macrófagos derivados de pacientes com leucemia aguda e tratados com E2, observaram uma redução de IL-1 e outras citocinas inflamatórias dependente do tempo de cultivo, quando comparados com células sem tratamento. Isso foi visto por Zhang e colaboradores (2015) que observaram uma redução da resposta inflamatória em cultura de células ATCC RAW 264.7. No entanto, no estudo de Calippe e colaboradores (2010) esta redução não foi observada, onde MPMs de OVX tratadas *in vivo* com E2, apresentaram uma maior expressão quando comparadas com OVX sem tratamento e SHAM. Neste contexto, assim como a citocina anterior, a literatura não apresenta um consenso sob a modulação do E2 em relação à resposta inflamatória. Porém, para o resultado deste estudo, o E2 apresentou resposta de característica anti-inflamatória.

Para TNF- α , os resultados do presente trabalho não indicam maiores produções destas citocinas pelos hPMS oriundo das mulheres reprodutivas quando comparados com as células

das mulheres na menopausa. Além disso, o tratamento do E2 exógeno os hPMs apresentaram uma redução desta citocina quando comparadas com células com E2 endógeno. TNF- α está entre as primeiras e mais potentes citocinas das respostas subsequentes à lesão aguda e à outros estímulos, sendo que as fontes primárias de síntese de TNF- α incluem monócitos/macrófagos e células T (VAN et al., 1998; KANY; VOLLRATH e RELJA, 2019). Apresenta diversas funções orgânicas como: indutor de catabolismo muscular e caquexia, ativação da coagulação, promoção da expressão ou liberação de moléculas de adesão, prostaglandina E2, fator de ativação plaquetária (PAF), além de induzir a produção de outras citocinas (VAN DER et al., 1995; VOLLRATH e RELJA, 2019). Prigione (2012) confere uma característica bifásica a esta citocina. Em se tratando das células epiteliais vaginais primárias, estas apresentam suprarregulação de TNF- α em resposta à estimulação pelos compostos microbianos como LPS e peptidoglicano (WIRA et al., 2010). Para COVID-19, DING e colaboradores (2021) relataram a regulação negativa de TNF- α em mulheres no período reprodutivo e que a menopausa é considerada indício de fator de risco para o agravamento dessa enfermidade. A ação de E2 sobre a modulação de TNF também foi relatada em outros estudos (KRAMER et al., 2004 e ZHANG et al., 2015).

No que diz respeito a IL-6, observou-se que os MPMs oriundos das fêmeas SHAM e os hPMS das mulheres em período reprodutivo apresentaram maiores níveis desta citocina quando comparadas com células das fêmeas ovariectomizadas e células das mulheres no período da menopausa. Contudo, tanto os MPMs quanto os hPMs apresentaram menores níveis de IL-6 quando foram submetidas ao tratamento do E2. A produção IL-6 ocorre a partir de praticamente todas as células e tecidos, tendo como potentes indutores TNF- α e a IL-1 (LIN, CALVANO, LOWRY, 2000; TANAKA et al. 2014) e apresenta características pró-inflamatória, sendo um mediador importante da resposta de fase aguda (HEINRICH, CASTELL, ANDUS, 1990; ROSE-JOHN, 2018), portanto, tem um papel fundamental para o desenvolvimento da resposta imune inata adequada (XING, et al, 1998; ROSE-JOHN et al. 2015). A função de controle sobre infecção desta citocina foi observada por Kovacs e colaboradores (2014), em modelo murino fêmea de infecção sistêmica por *C. albicans*. Os níveis séricos de IL-6 apresentaram maior concentração em comparação com os animais não infectados, o que mostrou que camundongos deficientes em IL-6 são mais suscetíveis a infecções (Romani e colaboradores (1996) e Van e colaboradores (1999).

Em um estudo sobre a COVID-19 utilizando fêmeas SHAM e mulheres reprodutivas, demonstrou-se que o E2 foi negativamente correlacionado com IL-6 em mulheres no período reprodutivo. Os pesquisadores sugerem que o suplemento hormonal pode ser uma terapia

potencial para pacientes com COVID-19, devido a potencialidade do E2 na regulação de citocinas relacionadas à imunidade e inflamação (DING et al., 2021). Esta potencialidade do estradiol pode ser observada também nos resultados obtidos no presente estudo, os quais MPMs e hPMs tratados com E2 apresentaram menores níveis desta citocina ao desafio por *G. vaginalis*. Kramer e colaboradores (2004) também observaram uma redução de IL-6 relacionado ao tratamento com E2. No entanto, Calippe e colaboradores (2010) observaram uma maior expressão de IL-6 e outras citocinas em MPMs de OVX tratadas *in vivo* com E2, quando comparadas com OVX sem tratamento e fêmeas SHAM ao estímulo de LPS. Como padrão observado neste estudo, o tratamento do estradiol reduziu a produção de citocinas em células após tratamento com o E2, destacando a características anti-inflamatórias desta citocina ao estímulo de *G. vaginalis*.

Após o reconhecimento ao estímulo que possa alterar o equilíbrio homeostático, células do sistema imunológicos são recrutadas para o reestabelecimento da homeostasia. Uma das citocinas produzidas para o recrutamento é IL-8. No presente estudo, os MPMs oriundos das fêmeas SHAM e os hPMS das mulheres em período reprodutivo apresentaram maiores níveis desta citocina quando comparadas com células das fêmeas ovariectomizadas e células das mulheres no período menopausa. Entretanto, tanto para os MPMs quanto para os hPMs apresentaram menores níveis de IL-8 quando foram submetidas ao tratamento do E2 em relação as células sem tratamento. IL-8 é produzida por diversas células do sistema imunológico, incluindo, monócitos/macrófagos (ZHANG, 2007; KANY; VOLLRATH e RELJA, 2019). Seus estímulos normalmente são as citocinas IL-1, TNF- α e IFN- γ , e tem como principal função a migração de leucócitos, como neutrófilos, ao local da infecção (CURFS, MEIS, HOOGKAMP-KORSTANJE, 1997; ZHANG, 2007, ABBADIE et al., 2009; KANY; VOLLRATH e RELJA, 2019). Especificadamente para vaginose bacteriana, Eade e colaboradores (2012) observou a regulação positiva de IL-8 em co-cultura de células epiteliais (EADE et al., 2012). Fichorova e colaboradores (2013) também observaram característica de mediadores da inflamação em isolado primário de *G. vaginalis* obtido de mulher positivas para VB demonstrando uma suprarregulação de fatores quimiotáticos como IL-8 e RANTES. No entanto, Cauci e colaboradores (2002, 2004) identificaram níveis baixos de IL-8 em mulheres positivas para VB. Sob a interação entre E2 e IL-8, Kramer e colaboradores (2004), não observaram alteração dos níveis de esta citocina em macrófagos tratados com E2. Para Shi e colaboradores (2006), E2 inibiu a produção de IL-8 em linhagem celular de monócitos (U-937), quando comparadas com esta mesma linhagem celular que produziu IL-8 naturalmente. IL-8 possui importante papel de recrutamento de outros leucócitos para o sítio

da inflamação apresenta na literatura resultados conflitantes. Embora no resultado do presente estudo indique o potencial de recrutamento, vale ressaltar que diversos estudos de Cauci e colaboradores (2002, 2004 e 2008) sempre relatam a presença mínima de IL-8 de mulheres positivas para VB mesmo com a elevação de outras citocinas, como a IL-1 β .

IL-12 pertence a uma família de citocinas que incluem IL-12, IL-23, IL-27 e IL-35 (GUO, CAO e ZHU, 2019). No presente estudo foi observado que hPMs de mulheres em períodos reprodutivos apresentaram maiores níveis de IL-12, IL-23 que mulheres na menopausa. Em se tratando da IL-27 não foi observado diferença estatística entre hPMS de mulheres no período fértil e na menopausa. Para as células submetidas ao tratamento com E2, apenas IL-12 apresentou, pós-tratamento, menores níveis dessa citocina. IL-12 e IL-23 são citocinas predominantemente pró-inflamatórias/prostimulatórias que contribuem com papéis importantes no desenvolvimento de células Th1 e Th17, respectivamente (VIGNALI e KUCHROO, 2012). Embora a IL-27 tenha sido inicialmente considerada uma citocina pró-inflamatória com algumas observações recentes apoiando essa visão (COX et al, 2011; YOSHIDA, HUNTER, 2015), atualmente é considerada, na maioria dos estudos, uma citocina imunorreguladora (VIGNALI e KUCHROO, 2012). IL-27 apresenta capacidade de modificar diretamente as funções efetoras das células T CD4+ e CD8+ para induzir IL-10 e para promover respostas de células T reguladoras especializadas (YOSHIDA, HUNTER, 2015). Onderdonk e colaboradores (2015), em uma análise genômica de esfregaços vaginais, observou que a detecção de *G. vaginalis* estava relacionada com aumento dos níveis IL-12. Outro estudo com mulheres VB positivas em comparação com negativas também evidenciou elevados níveis de IL-12 em lavado cervicovaginal (KYONGO et al., 2015). Em relação IL-23 e IL-27 *versus G. vaginalis*, os dados em literatura são bastante escassos. Já em relação a interação entre E2 e IL-12, Bouman e colaboradores (2004a) não observaram diferença em monócitos estimulados com LPS à níveis fisiológicos E2 em diferentes fases do ciclo reprodutivo. No entanto, Elenkov e colaboradores (2001) observaram que durante a gravidez, mulheres tiveram menor produção de IL-12 comparados aos níveis observados no período pós-parto. Este resultado é similar ao encontrado no presente estudo, com uma redução de IL-12 sob níveis gravídicos de E2. É importante ressaltar que em condições de gravidez ocorrem elevados níveis de progesterona e no presente estudo o tratamento ocorreu apenas com E2. A interação de E2 em relação a IL-23 e IL-27 é bastante escassa na literatura. Entretanto, para IL-27, embora este estudo não tenha apresentado resultado estatístico ao tratamento com E2, esta citocina tem característica anti-inflamatória, resposta observada pelo aumento de IL-10 nas análises dos MPMs e hPMs deste estudo.

Com atividade anti-inflamatória, a IL-10 surgiu como um modulador da atividade do TNF- α (LIN, CALVANO, LOWRY, 2000; OUYANG W e O'GARRA, 2019), porém, atua também na inibição de outras citocinas como IL-1 e IL-6 (THOMPSON-SNIPES et al., 1991; OUYANG W e O'GARRA, 2019). Outra característica é a inibição da produção de IFN- γ pelas células NK (THOMPSON-SNIPES et al., 1991; BEDKE et al., 2019). Contudo, a produção de IL-10 é negativamente regulada por muitas citocinas, como IL-4, IL-13 e IFN- γ , e também pela sua própria autorregulação (BENJAMIN et al., 1992; VAN et al., 1995, BEDKE et al., 2019). No presente estudo, para IL-10, um padrão de resposta diferente das outras citocinas analisadas foi observado. As células MPMs e hPMs, pré-tratadas com E2 apresentaram maiores níveis quando comparadas com células de fêmeas OVX e mulheres no período da menopausa sem tratamento, demonstrando similaridade de resposta com as células com E2 endógeno. No entanto, quando observado os resultados, apenas entre células infectadas e células com salina, Joo e colaboradores (2011), observaram resultados diferente do resultado do presente estudo. Estes pesquisadores destacaram uma menor produção de IL-10 em ratas infectadas intravaginalmente com *G. vaginalis* quando comparadas com as não infectadas. Um aumento convergente em relação a IL-10 e E2 foi observado por Marks e colaboradores (2010) em PBMCs. Estes pesquisadores avaliaram a vacina contra papiloma vírus humano (HPV 16) em PBMCs de mulheres saudáveis na pré-menopausa estimulados com vacina, demonstrando um aumento da citocina IL-10 quando as células foram tratadas com E2.

Com isso, em relação as citocinas analisadas no presente estudo e a análise da influência do estradiol, foi observado que o tratamento com E2 além de não equiparar a dosagem da maioria das citocinas das células MPMs e hPMs com atividade endógena dos hormônios sexuais, ainda reduziu seus níveis na presença do E2 exógeno, com exceção para IL-10. Essa não equiparação das citocinas em células pré-tratadas com E2 quando comparadas com células oriundas de fêmeas e mulheres com atividade ovariana preservada pode estar relacionada à influência da progesterona endógena na resposta inflamatória. Esta hipótese pode ser observada no trabalho de Marks e colaboradores (2010). Estes pesquisadores observaram o aumento significativo nos níveis de diversas citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em PBMCs estimulados com E2 e P4 endógenos, quando estimulados com a vacina VLP e comparação com células não estimuladas.

Outro estudo realizado em camundongos SHAM e OVX, tratados com E2 ou P4 infectados com o vírus da influenza H1N, identificou que camundongos OVX tratados com estradiol demonstraram diminuição da caquexia, menor duração da doença, início tardio da

morbidade, menos morbidade e mortalidade geral do que OVX tratados com progesterona. Nessa mesma pesquisa, o estradiol desempenhou um papel protetor e a progesterona um papel prejudicial na fisiopatologia (DAVIS et al., 2017). Fêmeas OVX pré-tratadas com progesterona apresentaram níveis significativamente maiores de TNF- α em um modelo de alergia (De OLIVEIRA et al., 2010). Uma outra hipótese pode estar relacionada à dose utilizada no tratamento que se equipara a dose gravídica (STARUB, 2007). Pesquisas sugerem que altas doses de E2 podem inibir a produção de citocinas inflamatórias, enquanto a estimulação com E2 em seu nível fisiológico aumenta sua produção (KLEIN et al., 2016; DING et al., 2021). Estes dados podem ser verificados no estudo de Bouman e colaboradores (2005) no qual foi observado que o E2 tem efeito bipotencial em monócitos e macrófagos derivados de humanos, com baixas doses aumentando a produção de citocinas pró-inflamatórias (como IL-1, IL-6 e TNF) e altas concentrações, reduzindo a produção dessas citocinas. Essas diferenças de respostas entre os níveis de E2 também foram observadas no tratamento de camundongos ovariectomizados com doses fisiológicas de E2. Essa dose foi capaz de aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias por células dendríticas CD11c⁺ (AHARKOVA-VATCHKOVA et al., 2004). Em contrapartida, Littauer, Skountzou (2018) descreveram que durante a gravidez, o estradiol (E2) pode ter efeitos bifásicos, com a estimulação da sinalização pró-inflamatória e ativação de Natural Killer (NK) em baixas concentrações ou o aumento da expressão de PD-L1 em células T e a síntese de TGF- β e IL-10, quando em alta concentrações (ROBINSON, KLEIN, 2012).

Com a finalidade de entender o mecanismo de ação do E2 na modulação da resposta induzida por *G. vaginalis*, nosso estudo buscou avaliar a expressão de Toll-like 2 (TLR-2) e do Fator nuclear kappa B (NF- κ B). A escolha desses genes foi baseada em estudos anteriores do grupo de pesquisa (dados submetidos a publicação), no qual essa via foi principalmente regulada na modulação exercida pelo E2 na resposta de *Staphylococcus aureus*. Além disso, a molécula TLR2 poder estar relacionada a ativação da resposta inflamatória induzida por *G. vaginalis* (ZARIFFARD et al., 2005). Os dados do presente trabalho demonstram o aumento na expressão do receptor *Toll-like-2* (TLR-2) nos MPMs das fêmeas SHAMs ou OVX quando estimulados *in vitro* com *G. vaginalis* em comparação com células apenas com salina. Além disso, o tratamento com E2 nas fêmeas OVX induziu um aumento da expressão dos genes do TLR-2 em comparação com OVX sem tratamento. Os receptores Toll-Like (TLR 1-10) são proteínas transmembranas altamente conservadas (ARANCIBIA et al., 2007, ANTHONY, FOLDI e HIDALGO, 2018). E que funcionam como receptores de reconhecimento padrão (PRR) presentes nos macrófagos, nas células dendríticas e nos neutrófilos, responsáveis pelo

reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) (BOWIE, 2007; KANY; VOLLRATH e RELJA, 2019). No caso do TLR-2, estes podem funcionar formando dímeros como TLR1-TLR2, TLR2-TLR6 (UEMATSU, AKIRA, 2007; KUMAR, KAWA, AKIRA, 2007; LEIFER e MEDVEDEV, 2016). Após o reconhecimento de um PAMP, a via de sinalização é ativada dependente de proteínas do tipo TIR (MyD88, TIRAP, TRIF e TRAM) (MCGETTRICK, O'Neill, 2010; KANY; VOLLRATH e RELJA, 2019). Estas proteínas recrutam quinases ativando o principal fator de transcrição para resposta inflamatória “Fator nuclear kappa B” (NF- κ B) (ARANCIBIA et al., 2007; HENNESSY, PARKER, O'NEILL, 2010, ANTHONY, FOLDI e HIDALGO, 2018). Mares e colaboradores (2008) demonstraram a indução da expressão de TLR2 em lavado cervicovaginal de mulheres em idade reprodutiva com VB. Também foi descrito que microrganismos como *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trichomatis* ou *Candida albicans* também podem estimular células via TLR2 (DEVA et al., 2003; DARVILLE et al., 2003; FISETTE et al., 2003). Sob a análise da influência do estradiol, resultados semelhantes foram observados por Soucy e colaboradores (2005) que demonstraram que a ovariectomia resulta em menor expressão de TLR-2 em micróglias após desafio com lipopolissacarídeo (LPS) em comparação com fêmeas não ovariectomizadas. No entanto, Jitprasertwong e colaboradores (2016) observaram uma diminuição significativa da expressão de TLR-2 em monócitos estimulados com estradiol. Esses resultados demonstram a não existência de um consenso na literatura sobre influência de E2 sob receptores do tipo TLR2 sugerindo sua ação conforme os níveis desse hormônio ou tipos celulares estudados (GIANNONI et al., 2011, LASHKARI et al., 2017, JITPRASERTWONG et al., 2016).

Da mesma maneira que para TLR2, os dados deste estudo demonstram o aumento da expressão do NF- κ B nos MPMs das fêmeas SHAMs ou OVX quando estimulados com *G. vaginalis* em comparação com células inoculadas apenas com salina. No tratamento com E2, os MPMs das fêmeas OVX apresentaram um aumento da expressão dos genes do NF- κ B em comparação as células das OVX sem tratamento, embora não tenha chegado ao nível das fêmeas SHAM. Em termos da resposta celular às condições inflamatórias, a mais significativa delas é, sem dúvida, a ativação da transcrição via NF- κ B (LIN, CALVANO, LOWRY, 2000, ANTHONY, FOLDI e HIDALGO, 2018). Diversas proteínas quinases adaptadoras tem sido relacionada a ativação desta via. Estas são fosforiladas exercendo efeito adjunsante ativado o NF- κ B por desassociação do I κ B, proteína membro da família inibidora do NF- κ B (ANTHONEY, FOLDI e HIDALGO, 2018). Esta desassociação permite a translocação do núcleo para ativação dos genes de transcrição (VAN, LOWRY, 1995; VILLA et al., 2015).

Joo e colaboradores (2011) também verificaram que a infecção por *G. vaginalis* aumenta a expressão de NF- κ B em fêmeas infectadas intravaginalmente com *G. vaginalis* quando comparadas com o tratamento com *Lactobacillus johnsonii*. Em se tratando da ação do estradiol, contraditoriamente ao resultado do presente estudo, Yun e colaboradores (2018) observaram que camundongos ovariectomizados possuem maior ativação da sinalização de NF- κ B em comparação com camundongos de controle simulado em um modelo de comprometimento da memória induzida por beta-amilóide (A β) *in vivo*. Giannoni e colaboradores. (2011) também verificaram que o E2 tem atividade anti-inflamatória reduzindo a expressão de NF κ B em células mononucleares de sangue umbilical. No entanto, Villa e colaboradores (2015) demonstram que, apesar da ativação, 17 β -estradiol pode inibir sua translocação para o núcleo influenciando, desta forma, induzindo a uma ação anti-inflamatória do estradiol.

Tratando-se de estresse oxidativo, no presente estudo foi realizado a dosagem de nitritos totais, subprodutos do óxido nítrico (ON), uma espécie reativa de nitrogênio e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), espécie reativa de oxigênio. O perfil de resposta de nitritos deste estudo pelas células MPMs das fêmeas SHAM e OVX e hPMS das mulheres no período reprodutivo demonstrou que *G. vaginalis* modula de maneira positiva maiores níveis quando comparadas com estas mesmas células apenas com salina estéril. Ao tratamento exógeno com E2 estas células tratadas não apresentaram diferença estatística em comparação as células com o E2 endógeno. A síntese do ON é intermediada por enzimas denominadas óxido nítrico sintase (NOS) (MARLETTA, 1994, LIND et al., 2017). No sistema imunológico, dentre diversas funções, ON está envolvido no controle de doenças infecciosas tendo como a iNOS (óxido nítrico induzível) a sua principal forma sintetizada, sendo induzida por uma variedade de células imunológicas, incluindo macrófagos e monócitos (MONCADA et al., 1991, LIND et al., 2017, KANY; VOLLRATH e RELJA, 2019). Os resultados do presente estudo podem ser correlacionados com os achados de Joo e colaboradores (2011). Os pesquisadores observaram que animais, inoculados com *G. vaginalis* intravaginalmente, apresentaram maiores níveis da enzima óxido nítrico sintase quando comparado com os animais infectados e tratados com *Lactobacillus johnsonii* (JOO e colaboradores 2011). Ao considerar a função antioxidante do E2, seria esperado que as células MPMs e hPMs com E2 endógeno obtivessem menores concentrações em comparação com as células oriundas das fêmeas e mulheres sem atividade ovariana (AL-GUBORY et al., 2008; KUMAR, KAWAI, AKIRA., 2009). No entanto, os dados do presente estudo não apresentaram diferença nos níveis de nitritos totais entre as células de fêmeas e mulheres com ação fisiológica do E2, bem como induzido pelo estímulo

exógeno. Porém, De Oliveira e colaboradores (2010) descreveram que tratamento com estradiol tem ações diversificadas de acordo com a dose, tipo celular e estímulo. Ao analisar nitritos totais e em modelo murino de alergia, os pesquisadores observaram que estes marcadores reduziram os níveis desse marcador nas células de medula óssea e aumentaram no lavado broncoalveolar de fêmeas OVX tratadas com E2.

Da mesma maneira que para nitritos totais, no presente estudo, os níveis de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram maiores em MPMs inoculados com *G. vaginalis* quando comparado com o grupo salina. No tratamento com o E2, os MPMs do grupo Sham apresentaram níveis elevados de H_2O_2 quando comparadas com células de fêmeas OVX. Para os hPMS a ação do E2, endógeno ou exógeno, demonstrou o mesmo padrão de resposta. Neste contexto as células oriundas de mulheres na menopausa e sem tratamento apresentaram maiores níveis de H_2O_2 . Esses dados são compatíveis com a literatura onde é observado um maior estresse oxidativo em mulheres na menopausa. Peróxido de hidrogênio é uma das espécies reativa de oxigênio (ERO) (DING et al., 1988, URBAN et al., 2017). As células imunológicas, as fagocíticas, atuam pela capacidade microbicida dada pela explosão respiratória resultante da produção de espécies reativas (PAAPE et al., 2002, AL-GUBORY et al., 2012; KANY; VOLLRATH e RELJA, 2019). As ERO, como H_2O_2 , são deletérias aos microrganismos. Uma das formas de eliminação ocorre através da oxidação da membrana formando pontes dissulfeto entre os aminoácidos cisteína, assim eliminando a bactéria (EATON, 1991; URBAN et al., 2017). O presente estudo verificou um aumento de produção de H_2O_2 pelos MPMs e hPMs infectados por *G. vaginalis*. Essa característica pode estar ligada a uma tentativa de eliminação desse microrganismo pelas células estudadas. Outros estudos associaram o aumento da infecção por *G. vaginalis* com a diminuição de *Lactobacillus* produtores de H_2O_2 (DEMBA et al., 2005; MITCHELL et al., 2011). Embora a produção desta espécie reativa controle a infecção por *G. vaginalis*, um estudo demonstrou que a produção de ácido láctico é mais supressora que H_2O_2 contra *G. vaginalis* (O'HANLON et al., 2011). Na relação da modulação desse marcador pelo E2, Heinrich *et al.* (2013) observaram a capacidade do 17β -estradiol em reduzir a produção desse marcador inflamatório em um modelo experimental com porcos, sendo a modulação ocorrida dependente da dose de E2 administrada. Os dados obtidos no presente estudo, apenas para o modelo murino, confrontam dados da literatura que indicam que E2 atua como agente antioxidante. Narumi e colaboradores (2018) observaram que mulheres em idade reprodutiva apresentaram níveis reduzidos de H_2O_2 quando comparadas com mulheres no período da menopausa. Esses mesmos dados foram observados com as células hPMs, de mulheres no período da menopausa

no presente estudo. No presente trabalho foi testado apenas MPMs e hPMS, em condições específicas de cultivo. Com isso, a utilização de outros tipos celulares, bem como alterações nos parâmetros de cultivo e tratamento podem trazer outros resultados em relação a produção de citocinas e demais marcadores inflamatórios.

Para a análise dos receptores estrogênicos intracelulares ER- α (alfa) e ER- β (beta) em MPMs infectados por *G. vaginalis*, os resultados deste estudo demonstraram regulação positiva das duas isoformas. Os MPMs sob modulação do E2 endógeno das fêmeas SHAM, quanto E2 exógeno no tratamento das fêmeas OVX apresentaram maior expressão quando comparado aos MPMs das OVX sem tratamento. Ainda, o tratamento com E2 em MPMs de fêmeas OVX apresentaram maior expressão de ER- β quando comparado com MPMs de fêmeas SHAM. Efeito similar de regulação positiva do receptor ER- β em fêmeas OVX foi observado por Esqueda e colaboradores (2007) onde o tratamento com E2 em um modelo murino de hipertensão, aumentou a expressão de ER- β , mas não teve efeito sobre os receptores ER- α . Da mesma maneira, macrófagos oriundos de fêmeas ovariectomizadas foram estimulados com LPS e verificou-se uma expressão negativa de ER- α . Porém, o tratamento com estradiol não restaurou a expressão desse receptor. A expressão foi restaurada somente quando as células foram tratadas com interleucina 4 (IL-4) (VILLA et al, 2015). Os receptores ER- α e ER- β fazem parte da família dos receptores ligados ao núcleo e são expressos em diversas células imunológicas como os monócitos e macrófagos (KOVATS et al 215). Estes resultados indicam que a regulação relativa dos genes ER- α e ER- β do 17 β -estradiol pode diferir entre as isoformas desses receptores e conforme os tipos celulares. Outro fator importante a ser analisado, no presente estudo, é que apenas a inoculação bacteriana foi capaz de induzir a expressão desses receptores. Similaridade de resultado foi descrito por Marks e colaboradores (2010) onde PBMCs estimulados com a vacina contra HPV-16, resultou em um aumento de 10 e 11 vezes nos níveis de expressão de ER- α e ER- β , respectivamente. É importante considerar que o 17 β -estradiol também pode sinalizar por meio de receptores não ligados ao núcleo ou por mecanismos independentes de receptor, como a sinalização da proteína G e Map quinases (MAPK) (STAUB, 2007). Não existem dados em literatura sobre qual mecanismo uma estimulação não estrogênica pode estar relacionada à expressão dos receptores intracelulares, ER- α e ER- β . Para este mecanismo trabalhos futuros serão necessários para avaliar as vias alternativas de sinalização.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A inflamação aguda, através da liberação de mediadores, tem um papel crucial no início e progressão de doenças, sendo cada vez mais reconhecido como um importante mecanismo de defesa não específico diante de injúrias contra o organismo vivo. Na literatura, E2 é um hormônio reconhecido por sua ação anti-inflamatória e antioxidante. No entanto, no presente estudo, os resultados indicaram uma imunomodulação na resposta inflamatória do 17 β -estradiol mediante a infecção por *G. vaginalis*, principal agente da vaginose bacteriana. Esta modulação é devido a presença de alta produções de citocinas pró-inflamatórias em fêmeas SHAM e mulheres reprodutivas, superior a produção em fêmeas ovariectomizadas e mulheres no período da menopausa. Embora, o tratamento com E2 não tenha elevado a produção de citocinas nos MPMs das fêmeas OVX e hPMS das mulheres no período da menopausa, exceto a IL-10, foi observado neste estudo o aumento na expressão dos receptores TLR-2 e do NF- κ B com o tratamento com estradiol nos MPMs tratados com estradiol, sugerindo um perfil pro-inflamatória deste hormônio no contexto de expressão de gênica.

Entretanto, à análise das dosagens no sobrenadante ocorreu a equiparação de resposta para IL-10 das células MPMs e hPMS tratadas com o E2 com as células oriundas de fêmeas e mulheres com E2 endógeno, indicando uma ação de regulação da resposta inflamatória. Este resultado pode estar relacionado com alteração, *in vitro*, do fenótipo celular, embora essa análise não foi testada no presente estudo.

Uma outra explicação para a redução na liberação de citocinas em MPMs e hPMS tratados com E2 pode estar ligado a características da bactéria em estudo. Foi demonstrado efeito bacteriostático desse hormônio observado durante a curva de crescimento, em que o estradiol diminuiu a capacidade proliferativa de *G. vaginalis*, com isso, induzindo uma menor estimulação nas células infectadas. Além disso, uma outra explicação é que *G. vaginalis* produz enzimas hidrolíticas, como vaginolisina, sialidade e prolidase, que possuem capacidade imunomodulatória, sendo essas mais produzidas durante a VB, mais frequente em mulheres em período fértil. Ou seja, pode existir um efeito direto do E2 na expressão desses fatores de virulência. No entanto, mais estudos são necessários para fundamentar essa hipótese.

Embora, clinicamente a VB ainda seja considerada uma condição não inflamatória, a aparente discrepância entre sinais e sintomas clínicos (falta de neutrófilos/inflamação evidente) não é totalmente compreendida nesta desordem vaginal. No entanto, os resultados aqui apresentados convergem com diversos resultados publicados que identificam medidores

inflamatórias em mulheres reprodutivas com desenvolvimento de vaginose bacteriana sugerindo uma influência hormonal na condição inflamatória subclínica desta afecção.

REFERÊNCIAS

- ABRAÃO H. Vaginose Bacteriana e Gardnerella vaginalis. **J bras Doenças Sex Transm.** p. 67-69, 1989.
- ABBADIE C., et al. Chemokines and pain mechanisms. **Brain Res Rev.** p. 125-134, 2009
- ABID S., et al. 17 β -Estradiol Dysregulates Innate Immune Responses to Pseudomonas aeruginosa Respiratory Infection and Is Modulated by Estrogen Receptor Antagonism. **Infect Immun.** 2017
- AL-GUBORY, K.H; BOLIFRAUD, P; GARREL, C. Regulation of key antioxidant enzymatic systems in the sheep endometrium by ovarian steroids. **Endocrinology.** 2008
- AL-GUBORY, K.H; GARREL, C; FAURE, P; SUGINO, N. Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. **Reprod Biomed Online.** p. 51-60, 2012.
- ALMEIDA, M.,C de., et al. A simple method for human peripheral blood monocyte Isolation. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro, v. 95, n. 2, p. 221-223, 2000
- ALEXANDER, H.,S; RAOUF, A.K. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. **Biochemical Pharmacology.** p. 539-552, 2009.
- AMSEL, R., et al. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. **The American journal of medicine,** v. 74, n. 1, p. 14-22, 1983.
- ANAHTAR, M.N., et al. Cervicovaginal bacteria are a major modulator of host inflammatory responses in the female genital tract. **Immunity,** v. 42, n. 5, p. 965-976, 2015.
- ANTHONEY, N; FOLDI, I; HIDALGO, A. Toll and Toll-like receptor signalling in development. **Development.** 2018.
- AOMATSU, M., KATO, T., KASAHARA, E., KITAGAWA, S. Gender difference in tumor necrosis factor- α production in human neutrophils stimulated by lipopolysaccharide and interferon- γ . **Biochem Biophys Res Commun,** v. 441, n. 1, p. 220-225, 2013.
- ARANCIBIA, S.A., et al. Toll-like Receptors are key participants in innate immune responses. **Biol Res.** p. 97-112, 2007.
- AROUTCHEVA, A., et al. Defense factors of vaginal lactobacilli. **Am J Obstet Gynecol.** 2001a.
- ATRI, C.; GUERFALI, F. Z.; LAOUINI, D. Role of Human Macrophage Polarization in Inflammation during Infectious Diseases. **Int J Mol Sci,** v. 19, n. 6, p. 1-15, 2018.
- AUFFRAY, C.; SIEWEKE, M. H.; GREISSMANN, F. **Annu Rev Immunol,** v. 27, p. 669-692, 2009.

BARBIERI, R. L. The Endocrinology of the Menstrual Cycle. **Human Fertility**. p. 145–169, 2014.

BARUAH, F.K., et al. Role of *Gardnerella vaginalis* as an etiological agent of bacterial vaginosis. **Iranian Journal of Microbiology**. p 409-414, 2014.

BEDKE, T.; et al. Title: IL-10-producing T cells and their dual functions. **Semin Immunol**. 2019

BENJAMIN, D; KNOBLOCK, T. J; DAYTON M. A. Human B cell interleukin-10 cell lines derived from patients with acquired immunodeficiency syndrome and Burkitt's lymphoma constitutively secrete large quantities of interleukine-10. **Blood**. p. 1289-1298, 1992

BREGANTE, M. A., et al. Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin in mice, rats, rabbits, sheep, and cows. **Am J Vet Res**, v. 60, n. 9, p. 1111-1116, 1999

BUSSOLO, F., BARATTO, T., BERTOLONI, G., GROSSATO, A. Survival of genital mycoplasma on various bacteriological swabs and transport media. **Boll. Ist. Sieroter. Milan**, v. 60, n. 1, p. 31-40, 1981.

BOUMAN, A; HEINEMAN, M. J; FAAS, M. M. Sex hormones and the immune response in humans. **Hum Reprod Update**. p. 411-423, 2005.

BOUMAN, A., et al. Gender difference in the non-specific and specific immune response in humans. **Am J Reprod Immunol**, v. 52, n. 1, p. 19-26, jul. 2004.

BOUMAN, A; SCHIPPER, M; HEINEMAN, M. J; FAAS M. 17 β -estradiol and progesterone do not influence the production of cytokine from lipopolysaccharide-stimulated monocytes in humans. **Fertil Steril 82 (Suppl 3)**; p. 1212–1219, 2004

BOWIE, A. G. Translational mini-review series on Toll-like receptors: recent advances in understanding the role of Toll-like receptors in anti-viral immunity. **Clin Exp Immunol**. p. 217-226, 2007.

BROTMAN, R. M., et al. Association between the vaginal microbiota, menopause status, and signs of vulvovaginal atrophy. **Menopause**. 2014

CAMPESI, I., et al. Oral contraceptives modify DNA methylation and monocyte-derived macrophage function. **Biol Sex Differ**, v. 27, p. 3-4, 2012.

CATLIN, B.W. "Gardnerella Vaginalis: Characteristics, Clinical Considerations, and Controversies." **Clinical Microbiology Reviews**, p 213–237, 1992

CAUCI, S., et al. Correlation of local interleukin-8 with immunoglobulin A against *Gardnerella vaginalis* hemolysin and with prolidase and sialidase levels in women with bacterial vaginosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 11, p. 1614-1620, 2002.

CAUCI, S., et al. Correlation of local interleukin-1 β levels with specific IgA response against *Gardnerella vaginalis* cytolyisin in women with bacterial vaginosis. **Am J Reprod Immunol**. p. 257-264, 2002.

CAUCI, S., et al. Vaginal immunity in bacterial vaginosis. **Current infectious disease reports**, v. 6, n. 6, p. 450-456, 2004.

CAUCI, S., et al. Among pregnant women with bacterial vaginosis, the hydrolytic enzymes sialidase and prolidase are positively associated with interleukin-1beta. **Am J Obstet Gynecol**. 2008.

CASTRO, J., et al. Using an in-vitro biofilm model to assess the virulence potential of bacterial vaginosis or non-bacterial vaginosis Gardnerella vaginalis isolates. **Sci Rep**. 2015

CASTRO, J., et al. Comparative transcriptomic analysis of Gardnerella vaginalis biofilms vs. planktonic cultures using RNA-seq. **NPJ Biofilms Microbiomes**. 2017

CALIPPE, B., et al. 17 β -Estradiol Promotes TLR4-Triggered Proinflammatory Mediator Production through Direct Estrogen Receptor α Signaling in Macrophages In Vivo. **J Immunol**, v. 185, p. 1169-1176, 2010.

CHAN, L. C., et al. Protective immunity in recurrent Staphylococcus aureus infection reflects localized immune signatures and macrophage-conferred memory. **Proc Natl Acad Sci**, v. 115, n. 47, p. E11111–E11119, 2018.

COHEN, C., et al. “Bacterial Vaginosis Associated with Increased Risk of Female-to-Male HIV-1 Transmission: A Prospective Cohort Analysis among African Couples.” Ed. Heather Watts. **PLoS Medicine**; 1-9 13, 2012.

Cox, J. H., et al. IL-27 promotes T cell-dependent colitis through multiple mechanisms. **J Exp Med**. p. 115-123, 2011.

CUNNINGHAM, M.; GILKESON, G. Estrogen Receptors in Immunity and Autoimmunity. **Clinic Rev Allerg Immunol**, v. 40, p. 66-73, 2011.

CURFS, J.H; MEIS, J. F; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. **Clin Microbiol Rev**, 1997;10:742-780.

DATCU, R. Characterization of the vaginal microflora in health and disease. **Dan Med J**. 2014.

DAVIS, S. M., et al. Estradiol and progesterone influence on influenza infection and immune response in a mouse model. **Am J Reprod Immunol**. 2017

DEVA, R., et al. Candida albicans induces selectively transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in HeLa cells: pivotal roles of Toll-like receptors, p38 mitogen-activated protein kinase, and NF-kappa. B. **J. Immunol**. p. 3047–3055, 2003.

DARVILLE, T., et al. Toll-like receptor-2, but not Toll-like receptor-4, is essential for development of oviduct pathology in chlamydial genital tract infection. **J. Immunol**. p. 6187–6197, 2003.

DEMBA, E., et al. Bacterial vaginosis, vaginal flora patterns and vaginal hygiene practices in patients presenting with vaginal discharge syndrome in The Gambia, West Africa. **BMC Infect Dis.** 2005.

DE ANDRADE E.N, et al. Natriuretic peptide system: a link between fat mass and cardiac hypertrophy and hypertension in fat-fed female rats. **Regulatory peptides**, v.167, p.149-155. 2011

DE OLIVEIRA T.H., et al. Sepsis induced by Staphylococcus aureus: participation of biomarkers in a murine model. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**; p. 345-355, 2015.

DE OLIVEIRA, A.P., et al. Female sex hormones mediate the allergic lung reaction by regulating the release of inflammatory mediators and the expression of lung E-selectin in rats. **Respir Res.** 2010;

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. **Blood.** 1991.

DINARELLO, C. A Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. **Immunol Rev.** 2018.

DING, A. H., et al.. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J Immunol.** 1988

DING, T., et al. Potential Influence of Menstrual Status and Sex Hormones on Female Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection: A Cross-sectional Multicenter Study in Wuhan, China. **Clin Infect Dis.** p. 240-e248, 2021.

EATON, J. W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. **J Lab Clin Med.** 1991.

EADE, C.R., et al. Identification and characterization of bacterial vaginosis-associated pathogens using a comprehensive cervical-vaginal epithelial coculture assay. **PLoS One.** 2012.

EREN, A.M., et al. Exploring the diversity of Gardnerella vaginalis in the genitourinary tract microbiota of monogamous couples through subtle nucleotide variation. **PloS One** 2011.

ESQUEDA, M. E., et al. Effect of ovariectomy on renal estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta in young salt-sensitive and -resistant rats. **Hypertension.** 768-p. 772, 2007.

ELENKOV, I. J., et al. IL-12, TNF-alpha, and hormonal changes during late pregnancy and early postpartum: implications for autoimmune disease activity during these times. **J Clin Endocrinol Metab.** 2001.

FAN, H. H.; KLEVEN, S. H.; JACKWOOD, M. W. Application of polymerase chain reaction with arbitrary primers to strain identification of Mycoplasma gallisepticum. **Avian Diseases**, v. 39, p. 729-735, 1995.

FICHOROVA, R. N., et al. Baseline variation and associations between subject characteristics and five cytokine biomarkers of vaginal safety among healthy non-pregnant women in microbicide trials. **Cytokine**. p. 134-140, 2011

FISH, E. N. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 9, p. 737, 2008.

FISETTE, P. L., et al. The Lip lipoprotein from *Neisseria gonorrhoeae* stimulates cytokine release and NF-kappaB activation in epithelial cells in a Toll-like receptor 2-dependent manner. **J. Biol. Chem.** 2003.

FONG, Y; LOWRY, S.F. Cytokines and the cellular response to injury and infection. In: Wilmore DW, Cheung LY, Harken AH, Holcroft JW, Meakins JL, editors. *Surgery*. **New York: Scientific American**. p. 1-21, 1996.

GARCIA, E.M., et al. Interaction of *Gardnerella vaginalis* and Vaginolysin with the Apical versus Basolateral Face of a Three-Dimensional Model of Vaginal Epithelium. **Infect Immun**. 2019

GARCIA-DURAN, M., et al Estrogen stimulates neuronal nitric oxide synthase protein expression in human neutrophils. **Circulation research**. p. 1020–1026, 1999.

GARCÍA-GONZÁLEZ, V.J., et al., Novel β -adaplin/c-Myc Complex Formation Modulated by Oxidative Stress in the Control of the Cell Cycle in 12. Macrophages and its Implication in Atherogenesis. **Nature SCientiFiC REPOrtS**. 2017.

GARDNER, H. L; DUKES, C. D. *Haemophilus vaginalis* vaginitis. A newly defined specific infection previously classified nonspecific vaginitis **Am J Obstet Gynecol**; p. 962-976; 1955.

GANDHI, N. A., et al. Targeting key proximal drivers of type 2 inflammation in disease. **Nat Rev Drug Discov**. p. 35–50, 2016.

GHOSH, M; RODRIGUEZ-GARCIA, M; WIRA, C. R. The immune system in menopause: pros and cons of hormone therapy. **J Steroid Biochem Mol Biol**. p. 171-175, 2014.

GIANNONI, E., et al. Estradiol and progesterone strongly inhibit the innate immune response of mononuclear cells in newborns. **Infect Immun**. p. 2690-2698, 2011.

Giefing-Kröll C, Berger P, Lepperdinger G, Grubeck-Loebenstien B. How sex and age affect immune responses, susceptibility to infections, and response to vaccination. **Aging Cell**. 2015 Jun;14(3):309-21

GILBERT N.M; LEWIS W.G; LEWIS AL. Clinical features of bacterial vaginosis in a murine model of vaginal infection with *Gardnerella vaginalis*. **PLoS One**. 2013.

GIRALDO, P.C et al. O frequente desafio do entendimento e do manuseio da vaginose bacteriana / Challenge of understanding and dealing with bacterial vaginosis. **DST j. bras. doenças sex. Transm**. p. 84-91, 2007.

GIRALDO, P. C., et al. Identification of immune cells by flow cytometry in vaginal lavages from women with vulvovaginitis and normal microflora. **Am J Reprod Immunol.** p. 198-205, 2012.

GAUTAM R, et al. Vaginal Biomarkers Study Group. Correlates of the molecular vaginal microbiota composition of African women. **BMC Infect Dis.** 2015

GONDO, D.C et al Vaginal Flora in Low-Risk Pregnant Women Cared for by a Public Health Service: prevalence and Association with Symptoms and Findings from Gynecological Exams. **Rev. Latino-Am. Enfermagem.** p. 919-927, 2010.

GUESS, T. E., et al. An inherent T cell deficit in healthy males to *C. neoformans* infection may begin to explain the sex susceptibility in incidence of cryptococcosis. **Biol Sex Differ.** 2019.

GUO, Y., et al., Immunoregulatory Functions of the IL-12 Family of Cytokines in Antiviral Systems. **Viruses.** 2019.

HAMILTON, J. A. GM-CSF in inflammation. **J Exp Med.** 2020.

GREEN LC, WAGNER D, GLOGOWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK, JS, TANNENBAUM SR. Analysis of nitrate, nitrite, and nitrite in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, p. 131-138, 1982.

HAO, S., et al. Modulation of 17 β -estradiol on the number and cytotoxicity of NK cells in vivo related to MCM and activating receptors. **International immunopharmacology**, v. 7, n. 13, p. 1765-1775, 2007.

HAMILTON, J.A. GM-CSF in inflammation. **J Exp Med.** 2020.

HEINE, P. A, et al. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2000.

HEINRICH, P.C et al. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochem J.** p. 621-636, 1990.

HENNESSY, E.J; PARKER, A. E; O'NEILL, L. A.J. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? **Nature Rev Drug Discov.** p. 293- 307, 2010.

HERRERO R.D; DOMINGO A.A. Bacterial vaginosis. **Enferm Infec Microbiol Clin.** 2016.

JENSEN, K. J., et al. The effects of vitamin A supplementation with measles vaccine on leucocyte counts and in vitro cytokine production. **Br. J. Nutr.** p. 619–628, 2016.

JITPRASERTWONG, P., et al. Female sex hormones modulate *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced Toll-like receptor signaling in primary human monocytes. **J Periodontal Res.** p. 395-406, 2016.

JOO, H. M., et al. Lactobacillus johnsonii HY7042 ameliorates Gardnerella vaginalis-induced vaginosis by killing Gardnerella vaginalis and inhibiting NF- κ B activation. **Int Immunopharmacol.** p. 1758-1765, 2011.

JOSEPH, R. J., et al. Finding a Balance in the Vaginal Microbiome: How Do We Treat and Prevent the Occurrence of Bacterial Vaginosis?. **Antibiotics (Basel).** 2021

KANDA, N.; WATANABE, S. 17 β -Estradiol Enhances the Production of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor in Human Keratinocytes. **J Invest Dermatol**, v. 123, p. 329–337, 2004.

KANY, S; VOLLRATH, J. T; RELJA, B. Cytokines in Inflammatory Disease. **Int J Mol Sci.** 2019.

KARSCH, F. J., et al Induced LH surges in the rhesus monkey: strength-duration characteristics of the estrogen stimulus. **Endocrinology** p. 1740–1747, 1973.

KENYON C, COLEBUNDERS R, CRUCITTI T. The global epidemiology of bacterial vaginosis: A systematic review. **Am J Obstet Gynecol.** p. 505-523, 2013

KESNER, J., et al. Unexpected responses of the hypothalamic gonadotropin-releasing hormone ‘pulse generator’ to physiological estradiol inputs in the absence of the ovary. **Proc Natl Acad Sci.** p. 8745–8749, 1987.

KLEIN, S. L; FLANAGAN, K. L. Sex differences in immune responses. **Nat Rev Immunol.** 2016.

KO, S. H; KIM, H. S. Menopause-Associated Lipid Metabolic Disorders and Foods Beneficial for Postmenopausal Women. **Nutrients.** 2020.

KOVÁCS, R., et al. Serum interleukin-6 levels in murine models of Candida albicans infection. **Acta Microbiol Immunol Hung.** p. 61-69, 2014.

KOVATS, S. Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways. **Cellular Immunology**, v. 294, n. 2, p. 63-69, 2015.

KYONGO, J. K, et al. Cross-Sectional Analysis of Selected Genital Tract Immunological Markers and Molecular Vaginal Microbiota in Sub-Saharan African Women, with Relevance to HIV Risk and Prevention. **Clin Vaccine Immunol.** p. 526-538, 2015.

Kramer, P. R., et al. 17 beta-estradiol regulates cytokine release through modulation of CD16 expression in monocytes and monocyte-derived macrophages. **Arthritis Rheum.** p.1967-1975, 2004.

KUMAR H., et al. Toll-like receptors and innate immunity. **Biochem Biophys Res Commun.** 2009.

LAMAS A.Z., et al. Comparative effects of estrogen, raloxifene and tamoxifen on endothelial dysfunction, inflammatory markers and oxidative stress in ovariectomized rats. **Life Sci.** p.101-109, 2015.

LASHKARI, B; ANUMBA, D. O. Estradiol alters the immune-responsiveness of cervical epithelial cells stimulated with ligands of Toll-like receptors 2 and 4. **PLoS One**. 2017.

LASARTE, S., et al. Sex hormones coordinate neutrophil immunity in the vagina by controlling chemokine gradients. **Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 3, p. 476-484, 2016.

LAYOUN, A.; SAMBA, M.; SANTOS, M. M. Isolation of Murine Peritoneal Macrophages to Carry Out Gene Expression Analysis Upon Toll-like Receptors Stimulation. **J Vis Exp**, v. 98, 2015.

LEIFER C.A., et al. Molecular mechanisms of regulation of Toll-like receptor signaling. **J Leukoc Biol**. 2016.

LEWIS, W. G. et al. Hydrolysis of secreted sialoglycoprotein immunoglobulin A (IgA) in ex vivo and biochemical models of bacterial vaginosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 3, p. 2079-2089, 2012.

LEWIS, W. G. et al. Degradation, foraging, and depletion of mucus sialoglycans by the vagina-adapted Actinobacterium *Gardnerella vaginalis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 17, p. 12067-12079, 2013.

LIBBY, E. K., et al. Atopobium vaginae triggers an innate immune response in an in vitro model of bacterial vaginosis. **Microbes and Infection**, v 10, p 439-446, 2008.

LIN, E; CALVANO, S. E; LOWRY, S. F. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. **Surgery**, p. 117-126, 2000.

Lind M, Hayes A, Caprnda M, Petrovic D, Rodrigo L, Kruzliak P, Zulli A. Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? **Biomed Pharmacother**. 2017 Sep;93:370-375.

Littauer EQ, Skountzou I. Hormonal Regulation of Physiology, Innate Immunity and Antibody Response to H1N1 Influenza Virus Infection During Pregnancy. **Front Immunol**. 2018 Oct 29;9:2455.

LU, M.; VARLEY, A. W. Harvest and Culture of Mouse Peritoneal Macrophages. **BioProtocol**, v. 3, n. 2, 2013.

MACHADO, D et al. Bacterial vaginosis biofilms: challenges to current therapies and emerging solutions. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

MARIETA, M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cells** p. 927-930, 1994.

MARES, D., et al. TLR2-mediated cell stimulation in bacterial vaginosis. **J Reprod Immunol**. p. 91-99, 2008.

MARKS, M. A, et al. Progesterone and 17beta-estradiol enhance regulatory responses to human papillomavirus type 16 virus-like particles in peripheral blood mononuclear cells from healthy women. **Clin Vaccine Immunol**. p. 609-617, 2010.

MARTINEZ, F. O; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. **F1000 Prime Rep.** 2014.

MANTOVANI, A., et al. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. **Immunity.** p. 778-795, 2019.

MCGETTRICK, A. F; O'NEILL, L. A. J. Localisation and trafficking of Tolllike receptors: an important mode of regulation. **Curr Opin Immunol.** p, 20-27, 2010.

MELI, R., et al. Esposito E, Coppola A, Nasti A, et al. Estrogen and raloxifene modulate leptin and its receptor in hypothalamus and adipose tissue from ovariectomized rats. **Endocrinology.** p. 3115-3121, 2004.

MILLER, L. S.; CHO, J. S. Immunity against *Staphylococcus aureus* cutaneous infections. **Nat Rev Immunol,** v. 11, n. 8, p. 505–518, 2011.

MITCHELL, C., et al. Effect of sexual activity on vaginal colonization with hydrogen peroxide-producing lactobacilli and *Gardnerella vaginalis*. **Sex Transm Dis.** p. 1137-1144, 2011.

MITCHELL, C; MARRAZZO, J. Bacterial vaginosis and the cervicovaginal immune response. **Am J Reprod Immunol.** p. 555-563, 2014.

MIRBAHA, H., et al. Estrogen pretreatment modulates morphine-induced conditioned place preference in ovariectomized mice. **Pharmacology, biochemistry, and behaviour.** p. 399-403, 2009.

MOHAMMADZADEHR. et al. Prevalence of vaginolysin, sialidase and phospholipase genes in *Gardnerella vaginalis* isolates between bacterial vaginosis and healthy individuals. **Med J Islam Repub Iran.** 2019.

MONCADA, S., PALMER, R.M.J., HIGGS, E.A. Nitric oxide: pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev.** p.109-142, 1991

MORRILL S, GILBERT N.M, LEWIS A.L. *Gardnerella vaginalis* as a Cause of Bacterial Vaginosis: Appraisal of the Evidence From in vivo Models. **Front Cell Infect Microbiol.** 2020.

MORSELLI, E. et al. The effects of oestrogens and their receptors on cardiometabolic health. **Nat Rev Endocrinol,** v. 13, n. 6, p. 352-364, 2017.

MOSSER DM, et al. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol.** p. 958-69, 2008.

MUHLEISEN, A. L.; HERBST-KRALOVETZ, M. M. Menopause and the vaginal microbiome. **Maturitas,** v. 91, p. 42-50, 2016.

MURPHY, A. J., et al. Estradiol regulates expression of estrogen receptor ER alpha 46 in human macrophages. **PLoS One.** 2009.

MURAKAMI, M; KAMIMURA, D; HIRANO, T. Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines. **Immunity**. p. 812-831, 2019.

MURRAY, P. J. Macrophage Polarization. **Annu Rev Physiol**, v. 79, p. 541-566, 2017.

NARUMI, M., et al. Oxidative Stress in the Visceral Fat Is Elevated in Postmenopausal Women with Gynecologic Cancer. **J Womens Health (Larchmt)**. p. 99-106, 2018.

NUGENT, R. P., et al. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. **J Clin Microbiol**. p. 297-301, 1991.

O'Hanlon, D. E., et al. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. **BMC Infect Dis**. 2011.

ONDERDONK, A. B., et al. The human microbiome during bacterial vaginosis. **Clin Microbiol Rev**. 2016.

OUYANG, W; O'GARRA, A. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to **Clinical Translation**. **Immunity**. p. 871-891, 2019.

PAAPE, M. J.. et al. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear leukocytes. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v.7, p.109-121, 2002.

PAHARKOVA-VATCHKOVA, V., et al. Estrogen preferentially promotes the differentiation of CD11c+ CD11b(intermediate) dendritic cells from bone marrow precursors. **J Immunol**. p. 1426–1436, 2004.

PANDA, A., et al. Imunosenescência inata humana: causas e consequências para a imunidade na velhice. **Trends Immunol** . p. 325-333, 2009.

PINES, A. Microbiótica in women. **Climacteric**, p.1-3, 2015

PRIGIONE, Sabine Oertelt. The influence of sex and gender on the immune response. **Autoimmun Rev**, v. 11, p. A479-A485, 2012.

PRIYANKA, H.P. et al. Menstrual cycle and reproductive aging alters immune reactivity, NGF expression, antioxidant enzyme activities, and intracellular signaling pathways in the peripheral blood mononuclear cells of healthy women. **Brain Behav Immun**, v. 32, p. 131-143, ago. 2013.

RANCE, N. E., et al. Topography of neurons expressing luteinizing hormone releasing hormone gene transcripts in the human hypothalamus and basal forebrain. **J Comp Neurol** p. 573–586, 1994

REED, B, G; CARR, B. R. The Normal Menstrual Cycle and the Control of Ovulation. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279054/>, 2018.

RETTEW, J. A., et al. GPR30/GPER-1 mediates rapid decreases in TLR4 expression on murine macrophages. **Mol. Cell. Endocrinol**. p. 87–92, 2010.

RETTBERG, J. R.; YAO, J.; BRINTON, R. D. Estrogen: A master regulator of bioenergetic systems in the brain and body. **Front Neuroendocrinol.**, v. 35, n. 1, p. 8–30, 2014.

RICHARDS, J.S. et al. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. **Annual review of physiology**, v. 64, n. 1, p. 69-92, 2007

ROBINSON, D. P; KLEIN, S. L. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. **Horm Behav.** 2012

ROBKER, R. L, et al. Coordination of Ovulation and Oocyte Maturation: A Good Egg at the Right Time. **Endocrinology**. p. 3209-3218, 2018.

ROSE-JOHN, S; SCHELLER, J; SCHAPER, F. “Family reunion”—A structured view on the composition of the receptor complexes of interleukin-6-type and interleukin-12-type cytokines. **Cytokine Growth Factor Rev.** p. 471–474, 2015.

ROSE II, A., et al. Commensal bacteria modulate innate immune responses of vaginal epithelial cell multilayer cultures. **PloS one**, v. 7, n. 3, 2012.

ROTTINI, G., et al. Identification and partial characterization of a cytolytic toxin produced by *Gardnerella vaginalis*. **Infect Immun.** 1990

ROMANI, L., et al. Impaired neutrophil response and CD4+ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*. **J Exp Med.** p. 1345–1355, 1996.

ROSE-JOHN, S. Interleukin-6 Family Cytokines. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** 2018.

SAKIANI, S; OLSEN, Nancy J.; KOVACS, William J. Gonadal steroids and humoral immunity. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, n. 1, p. 56-62, 2013.

SANTOS-GREATTI, M. M. V et al. Cervicovaginal cytokines, sialidase activity and bacterial load in reproductive-aged women with intermediate vaginal flora. **J Reprod Immunol.** p.36-41, 2016.

SANTOS-JUNIOR, M. N. et al. *Ureaplasma diversum* and its membrane-associated lipoproteins activate inflammatory genes through the NF-Kb pathway via toll-like receptor 4 **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1538, p. 2018.

SCHWEBKE, J. R., et al.. Role of *Gardnerella vaginalis* in the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis—A Conceptual Model. **Journal of Infectious Diseases.** 2014.

SIRAIT, L., et al. Animal Modeling Try Strain Balb/c Mice with *Gardnerella Vaginalis*. **International Journal of Sciences: Basic and Applied Research.**, p.261-267, 2017.

SOUZA, Clarissa Leal Silva e. **Efeito do Papel do Estrogênio na Resposta Imunológica de Monócitos /Macrófagos Induzida por *Staphylococcus aureus***, 2019, 131f. Tese (Doutorado) – Curso de Mestrado em Ciências Fisiológicas, Departamento de Instituto Multidisciplinar em Saúde – IMS, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2019.

- SOPER, D. E. Bacterial vaginosis and surgical site infections. *Am J Obstet Gynecol*. 2020
- SHI, Y. L., et al.. Effects of combined 17beta-estradiol with TCDD on secretion of chemokine IL-8 and expression of its receptor CXCR1 in endometriotic focus-associated cells in co-culture. *Hum Reprod*. p. 870-879, 2006.
- SCHWEBKE, J. R., et al. Role of Gardnerella vaginalis in the pathogenesis of bacterial vaginosis: **A conceptual model**. *J Infect Dis*. p. 338-343, 2014.
- SHIPITSYNA, E., et al. Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age--sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible?. *PLoS One*. 2013.
- SMITH, S. B.; RAVEL, J. The vaginal microbiota, host defence and reproductive physiology. *The Journal of physiology*, v. 595, n. 2, p. 451-463, 2017.
- SPIEGEL CA. Bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Rev*. p. 485-502, 1991.
- STRAUB, R. H. et al. The Complex Role of Estrogens in Inflammation. *Endocrine Reviews*, v. 28, n. 5, p. 521–574, 2007
- SHIVERS, K. Y., et al. Estrogen alters baseline and inflammatory-induced cytokine levels independent from hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity. *Cytokine*. p. 121-129, 2015.
- SHAPOURI-MOGHADDAM, A. et al. Macrophage plasticity, polarization and function in health and disease. *J Cell Physiol*, v. 233, n. 9, p. 6425-6440, 2018.
- SOLAR, P; VELASQUEZ, L. Consequences of nongenomic actions of estradiol on pathogenic genital tract response. *J Mol Signal*. 2013,
- SOMMER, C; WHITE, F. Cytokines, Chemokines, and Pain. *Pharmacology of Pain*. p. 279-302, 2010.
- SOUICY, G. et al. Estradiol Is Required for a Proper Immune Response to Bacterial and Viral Pathogens in the Female Brain. *J Immunol*, v. 174, p. 6391-6398, 2005
- STRAUB, R. H. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev*. 2007.
- SUZUKI, S. et al. Timing of estrogen therapy after ovariectomy dictates the efficacy of its neuroprotective and antiinflammatory actions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 104, n. 14, p. 6013-6018, 2007.
- TAGA, T., et al. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell*. p. 573–581, 1989.
- THOMPSON-SNIPES, L., et al. Interleukin 10: a novel stimulatory factor mast cells and their progenitors. *J Exp Med*. p. 507-510, 1991.
- TOMAR, N.; DE, R. K. A Brief Outline of the Immune System. *Methods Mol Biol*, v. 1184, p. 3-12, 2014.

TONINATO, L. G.D. Vaginose bacteriana diagnosticada em exames citológicos de rotina: prevalência e características dos esfregaços de Papanicolaou. **Brazilian Journal of Clinical Analysis**, v. 48, n. 2, p. 165-9, 2016. Uematsu S, Akira S. Toll-like receptors and type I interferons. **J Biol Chem**. 2007;282(21):15319-24.

TSOU, C. L. et al. Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. **J Clin Invest**, v. 117, n. 4, p. 902-909, 2007.

URBAN, M.V., et al. Hydrogen peroxide (H₂O₂): a review of its use in surgery. **Wien Med Wochenschr**. 2019 Jun;169(9-10):222-225. English. doi: 10.1007/s10354-017-0610-2. Epub 2017 Nov 16

VAN BERGE HENEGOUWEN. M. I, et al. Peritoneal cytokine release after elective gastrointestinal surgery and postoperative complications. **Am J Surg** p. 311-316, 1998.

VAN DER POLL; LOWRY S. F. Endogenous mechanisms regulating TNF and IL-1 during sepsis. In: Vincent JL, editor. Yearbook of intensive care and emergency medicine. **Berlin: Springer-Verlag**; 385-397, 1995;

VAN DER POLL, T., et al. Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis. **J Immunol** 1995.

VAN ENCKEVORT, F.H.J., et al. Increased susceptibility to systemic candidiasis in interleukin-6 deficient mice. **Med Mycol** 37, 419–426 (1999).

VÁZQUEZ-MARTÍNEZ, E. D. et al. Sexual dimorphism in bacterial infections. **Biol Sex Differ**, v.9, n. 1, 2018.

VETRANO, M., et al. Serum IL-1RA levels increase from follicular to luteal phase of the ovarian cycle: A pilot study on human female immune responses. **PLoS One**. 2020.

VIGNALI, D. A, KUCHROO, V. K. IL-12 family cytokines: immunological playmakers. **Nat Immunol**. 2012.

VILLA, A., et al. Estrogen accelerates the resolution of inflammation in macrophagic cells. **Nat Publ Gr**. 2015.

VILELA, M.G; SANTOS JÚNIOR, J.L dos; SILVA, J.G. Determinação do Ciclo Estral em Ratas Por Lavado Vaginal, Minas Gerais. **FEMINA**, v. 35, n. 10, p.667-670, 2007.

XING, Z., et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. **J Clin Invest** 1998.

WIRA, C.R. et al. Review article: sex hormone regulation of innate immunity in the female reproductive tract: the role of epithelial cells in balancing reproductive potential with protection against sexually transmitted pathogens. **American journal of reproductive immunology**, v. 63, n. 6, p. 544-565, 2010.

WIRA, C.R. et al. Regulation of mucosal immunity in the female reproductive tract: the role of sex hormones in immune protection against sexually transmitted pathogens. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 72, n. 2, p. 236-258, 2014.

WIRA, C.R.; RODRIGUEZ-GARCIA, M; PATEL, M.V. The role of sex hormones in immune protection of the female reproductive tract. **Nature reviews Immunology**, v. 15, n. 4, p. 217-230, 2015.

WITKIN, S.S. et al. An altered immunity hypothesis for the development of symptomatic bacterial vaginosis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 44, n. 4, p. 554-557, 2007.

WOOD G; A., et al. Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. **Reproduction**. p.1035-1044, 2007.

YOSHIDA, H; HUNTER, C. A. The immunobiology of interleukin-27. **Annu Rev Immunol**. 2015.

YUN, J., et al. Estrogen deficiency exacerbates A β -induced memory impairment through enhancement of neuroinflammation, amyloidogenesis and NF- κ B activation in ovariectomized mice. **Brain Behav Immun**. p. 282-293, 2018.

ZARIFFARD, M. R., et al. Induction of tumor necrosis factor- alpha secretion and toll-like receptor 2 and 4 mRNA expression by genital mucosal fluids from women with bacterial vaginosis. **J Infect Dis**. p. 1913-1921, 2005.

ZHANG J.M. Cytokines, inflammation, and pain. **Int Anesthesiol Clin**. n. 45, p. 27-37, 2007.

ZHANG, X.; GONÇALVES, R.; MOSSER, D. M. The Isolation and Characterization of Murine Macrophages. **Curr Protoc Immunol**, 2008.

ZHANG X., et al., 17 β -estradiol attenuates homocysteine-induced oxidative stress and inflammatory response as well as MAPKs cascade via activating PI3-K/Akt signal transduction pathway in Raw 264.7 cells. **Acta Biochim Biophys Sin** (Shanghai). p. 65-72. 2015.

ZIMMERMMANN, JB et al. Vaginose bacteria na: frequência entre usuárias do serviço público e da rede privada de saúde. **HU Revista**, v. 35, n. 2, 2009.

APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu, _____, profissão _____, residente e domiciliado na _____

_____, portador da Cédula de identidade, RG _____, e inscrito no CPF/MF _____ nascido(a) em ____ / ____ / _____, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo “*Avaliação da influência do estradiol na resposta imunológica à infecção a G. vaginalis*”. Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

- I) O estudo se faz necessário para que se possam descobrir as possíveis causas da doença denominada Vaginose Bacteriana avaliando a influência do estradiol na resposta imunológica à infecção por *G. vaginalis* a ser estudada no projeto *Avaliação da influência do estradiol na resposta imunológica a infecção a G. vaginalis*”;
- II) Serei questionada sobre: **Dados pessoais:** nome; idade; altura; peso; escolaridade. **Saúde geral:** hábitos como álcool; tabagismo; alguma doença a declarar (no coração, rim, câncer, diabetes, alergia, pisiíquicas, outras); uso de medicamento. **História menstrual:** menarca; data da última menstruação. História Obstétrica: aborto (espontâneo ou provocados); parto. **História sexual:** vida sexual ativa; dor, odor e sangramento nas relações; uso de preservativo; anticoncepcional; doença sexualmente prévia e portadora de vírus como HIV, HPV, Hepatites. **História ginecológica:** corrimento; dor ao urinar; odor; dor pélvica; prurido; hiperemia; verruga; bolha/vesícula; ferida/úlceras; petéquias (pontos vermelhos) e algum tratamento ginecológico. **Se menopausa:** tratamento de reposição hormonal; medicação e dosagem; algum sintoma. Serei informada que os critérios de exclusão são: ter tido relação sexual nas últimas 48 horas, o uso de ducha ou creme vaginal nas últimas 48 horas, hábitos como álcool ou tabagismo, uso de medicamentos (antibióticos, antifúngicos e contraceptivos) nos três meses que antecederem à coleta, grávidas, puérperas ou amamentando, nos últimos seis meses, assim como portadoras do vírus HIV e HPV, diagnosticadas para infecções sexualmente transmissíveis, diabéticas, hipertensas e ainda que apresente sinais e sintomas clínicos como: vesículas, verruga, erupções, petéquias ou úlceras. A seção “**EXAME GINECOLÓGICO**” será preenchido pelo profissional de saúde durante o atendimento e “**OUTRAS INFORMAÇÕES**” por membro da equipe de pesquisa. Além disso, todas as pacientes serão submetidas à realização de hemograma completo para confirmação de bom estado de saúde geral das doadoras. A **enfermeira Rafaela de Souza Bittencourt** estará presente durante todo o momento de aplicação do questionário para o esclarecimento de eventuais dúvidas;
- III) Recebi a informação da disponibilidade, gratuita, do serviço de apoio psicológico realizado pelo NASF (Núcleo de Apoio à Saúde da Família), vinculado às Unidades de Saúde da Família, pois conteúdo o questionário pode vir a gerar constrangimento podendo envolver sofrimento psicológico. Posteriormente ocorrerá a coleta dos materiais clínico do estudo.

- IV) A minha pressão arterial será aferida uma vez pela enfermeira Rafaela de Souza Bittencourt para averiguar o bom estado de saúde geral;
- V) Serão feitas uma coleta de amostras de fluido vaginal, e sangue periférico, cerca de 10mL. Todos os materiais serão coletados no consultório da Unidade de Saúde da Família;
- VI) No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor suportável decorrente da punção da pele. Para minimizar essa possível dor, é recomendado a escolha do membro sem nenhum tipo de lesão, e mantê-lo apoiado com uma leve inclinação para baixo, garrotear acima do local a ser puncionado introduzir a agulha em um ângulo adequado com o bisel voltado para cima. Será utilizado um sistema fechado, a vácuo, totalmente descartável. As agulhas deste sistema destacam-se pelo corte de seu bisel e sua excelente capacidade de deslizamento durante a punção, minimizando o desconforto da punção durante a coleta de sangue. Também é recomendado caminhar, se possível, enquanto espera o exame, para aumentar o fluxo do sangue e manter as veias cheias. Em caso de ansiedade, é recomendado que o (a) voluntário (a) converse ou lembre-se de algo agradável enquanto espera pela coleta. Também é interessante ler ou ouvir música ou gravações que sejam relaxantes;
- VII) Devo informar caso apresente tendência para sentir tontura ou desmaiar, para que a coleta seja realizada comigo deitado (a) em maca para prevenir um desmaio e/ou queda. Caso eu sinta tontura ou sensação de desmaio em qualquer momento, abaixar a cabeça e colocá-la entre as pernas ou deitar-se vai ajudar-me a melhorar;
- VIII) Se houver pequena perda de sangue da veia no local da punção geralmente há um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. Se uma mancha roxa, eventualmente, aparecer no local da coleta, é recomendado que eu faça uma compressa de gelo no local, quatro vezes ao dia, nas primeiras 24 horas. Caso sinta alguma dor, é recomendado fazer uso de meu analgésico de costume. Complicações de coleta de sangue rotineira são raras e geralmente de pequeno porte.
- IX) No momento da coleta do fluido vaginal poderá ocorrer desconforto devido a fricção na vagina e colo do útero, para atenuar possíveis desconforto será utilizado espéculos descartáveis para auxiliar na abertura do canal vaginal, os materiais serão friccionados de maneira suave, porém coletando a maior quantidade de fluido possível.
- X) A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me acarretará qualquer despesa financeira com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados no estudo;

- XI) Após a coleta das amostras o fluido vaginal será submetido à metodologia de qPCR para análise da carga bacteriana total, *G. vaginalis* e lactobacilos. As amostras sanguíneas serão submetidas ao hemograma completo, para atestar o bom estado de saúde da voluntária, e, também será realizado a seleção de monócitos para melhor compreensão da resposta imunológica quando infectado por *G. vaginalis*. Para esta compreensão serão utilizadas as seguintes metodologia: ELISA para mensurar níveis de citocinas, que são substâncias importantes no processo de combate à infecção; Inibir a redução do citocromo C pela superóxido dismutase para detecção de espécie reativas de oxigênio, importante no processo de envelhecimento celular; detectar os níveis de nitrito e nitrato para mensurar a produção de óxido nítrico, substância importante no combate a infecção por bactéria e a técnica de PCR array para avaliar os marcadores inflamatórios;
- XII) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- XIII) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;
- XIV) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- XV) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa.
- Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- XVI) Este material não será utilizado em outros projetos de pesquisa.
- IX) Poderei contactar O Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Multidisciplinar em Saúde (CEP-SERES HUMANOS - IMS/CAT - UFBA) -, no Fone (77) 3429-2720 (e-mail: cepims@ufba.br), endereço: Rua Hormindo Barros, 58, Quadra 17, Lote 58, Bairro Candeias, CEP: 45.029-094, Vitória da Conquista – BA, para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.
- X) Poderei contactar o pesquisador responsável, Professor Dr Lucas Miranda do Instituto Multidisciplinar em Saúde (IMS/CAT - UFBA), pelo telefone (77) 3429-2719, e-mail lucasm@ufba.br ou endereço: Rua Hormindo Barros, 58, Quadra 17, Lote 58, Bairro Candeias, CEP: 45.029-094, Vitória da Conquista – BA, para qualquer esclarecimento ou reclamação em relação ao presente estudo.
- XI) O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- XII) O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE– apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

XIII) Resolução 196/96 - Estou recebendo uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Vitória da Conquista, de de 20____

() Paciente / () Responsável

Impressão Datiloscópica:

Responsável pelo Projeto: _____

PROF. DR. LUCAS MIRANDA MARQUES

APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO DE ESTADO DE SAÚDE

Esse questionário tem como objetivo averiguar os critérios de inclusão necessários às voluntárias para pesquisa do estudo intitulado “AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO ESTRADIOL NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA A INFECÇÃO A *G. VAGINALIS*”.
Agradecemos a sua colaboração!

FICHA DE ATENDIMENTO GINECOLÓGICOS E OBSTÉTRICOS		
NÚMERO:	DATA:	
UNIDADE DE SAÚDE DA FAMÍLIA		
DADOS PESSOAIS		
NOME:	IDADE (Anos):	ALTURA
	PESO	ESCOLARIDADE
HISTÓRIA DA SAÚDE EM GERAL		
1. HÁBITO DE FUMAR 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO	2. HÁBITO DE BEBER 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO	3. DOENÇA NO CORAÇÃO 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO
4. DOENÇA NOS RINS 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO	5. JÁ TEVE CÂNCER 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO	6. DIABÉTICA 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO
7. ALÉRGICA 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO	8. ALTERAÇÕES PSÍQUICAS 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO	9. OUTRA DOENÇA _____
USO DE MEDICAMENTO? _____		
HISTÓRICO MENSTRUAL		
MENARCA (IDADE)	DATA DA ÚLTIMA MENSTRUÇÃO	
HISTÓRICO OBSTÉTRICO		
ABORTAMENTOS		
ESPONTÂNEOS	PROVOCADOS	
PARTOS		
PREMATUROS (ANTES DO TEMPO) 1. <input type="checkbox"/> NORMAL	NORMAL NO TEMPO CERTO 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO	CEÁREA NO TEMPO CERTO 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO

2. <input type="checkbox"/> CESÁTEA		
AMAMENTANDO 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO	TEVE FILHO NOS ÚLTIMOS 3 MESES 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO	
HISTÓRICO SEXUAL		
1. VIDA SEXUAL ATIVA 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO	2. DOR NAS RELAÇÕES SEXUAIS 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO	3. ODOR NAS RELAÇÕES SEXUAIS 1. <input type="checkbox"/> FÉTIDO 2. <input type="checkbox"/> CARACTERÍSTICO
4. SANGRAMENTO NAS RELAÇÕES SEXUAIS 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO	5. USO DE PRESERVATIVO (CAMISINHA) 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO 3. <input type="checkbox"/> AS VEZES	6. USO DE ANTICONCEPCIONAL NO MOMENTO 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO
7. USO DE ANTICONCEPCIONAL NOS ÚLTIMOS 3 MESES 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO	8 OUTRO CONTRACEPTIVO _____	
DOENÇAS SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS (DST) / PORTADORA DE VÍRUS		
DST 1. <input type="checkbox"/> PRÉVIA E TRATADA 2. <input type="checkbox"/> DESCONHECE OU NEGA 3. <input type="checkbox"/> PRÉVIA E NÃO TRATADA	HIV 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO 3. <input type="checkbox"/> NÃO SABE	
HPV 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO 3. <input type="checkbox"/> NÃO SABE	HEPATITE B ou HEPATITE C 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO 3. <input type="checkbox"/> NÃO SABE Se SIM qual? 1. <input type="checkbox"/> B 2. <input type="checkbox"/> C	
HISTÓRICO GINECOLÓGICO		
1. CORRIMENTO 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO	2. DISÚRIA (Dor ao urinar) 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO	3. ODOR 1. <input type="checkbox"/> FÉTIDO 2. <input type="checkbox"/> CARACTERÍSTICO
4. DOR PÉLVICA 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO	5. PRURIDO (Coceira) 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO	6. HIPEREMIA (Vermelhidão) 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO
7. VERRUGA 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO 3. <input type="checkbox"/> NÃO SABE	8. BOLHA/VESÍCULA 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO 3. <input type="checkbox"/> NÃO SABE	9. FERIDA/ÚLCERA 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO 3. <input type="checkbox"/> NÃO SABE
10. PETÉQUIAS (Bolinhas vermelhas) 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO 3. <input type="checkbox"/> NÃO SABE	11 EM ALGUM TRATAMENTO GINECOLÓGICO? _____	
MENOPAUSA (EXCLUSIVO PARA MULHERES NA MENOPAUSA)		
REALIZA TERAPIA DE REPOSIÇÃO HORMONAL 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO Qual a medicação e dosagem? _____	SINTOMAS 1. <input type="checkbox"/> SECURA VAGINAL 2. <input type="checkbox"/> ATROFIA 3. <input type="checkbox"/> DISPAREUNIA (DOR DURANTE A RELAÇÃO SEXUAL)	
HISTÓRICO DAS ÚLTIMAS 48 HORAS		
2. RELAÇÃO SEXUAL 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO	2. USO DE DUCHA VAGINAL 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO	3. USO DE MÉDICAMENTO NA VAGINA 1. <input type="checkbox"/> SIM 2. <input type="checkbox"/> NÃO

EXAME GINECOLÓGICO (PREENCHIDO PELO PROFISSIONAL DE SAÚDE)

ACHADOS EM GENITÁLIA EXTERNA

1. SÍCULA2. RRUGA3. CERA4. LHA5. TÉQUIAS6. OR

7. OUTRO (Descrever)

ACHADOS EM GENITÁLIA INTERNA

1. COPUS ENDOCERVICAL2. RRIMENTO VAGINAL3. LO FRIÁVEL4. ASSA ANORMAL DE TECIDO NO COLO

5. OUTRO (Descrever):

OUTRAS INFORMAÇÕES (PREENCHIDO POR MEMBRO DA EQUIPE DE PESQUISA)

PRESSÃO ARTERIAL

____/____/____

ASSINATURA DA VOLUNTÁRIA

ASSINATURA E CARIMBO

DATA

ANEXO A – PARECER DO CEUA




Universidade Federal da Bahia
 Instituto Multidisciplinar em Saúde - Campus Anísio Teixeira
 COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS
 (CEUA - IMS/CAT - UFBA)

**PARECER DE APROVAÇÃO**

PROJETO DE PESQUISA - Protocolo 049/2017 - Apreciação em 08/02/2018 - Aprovado sem restrições
<p>Título: Avaliação da influência do estradiol na resposta imunológica a infecção a <i>Gardnerella Vaginalis</i>.</p> <p>Protocolo: 049/2017</p> <p>Pesquisador: Lucas Miranda Marques.</p> <p>Instituição: Instituto Multidisciplinar em Saúde - Campus Anísio Teixeira – UFBA</p>
CERTIFICADO
<p>A Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA - IMS/CAT - UFBA) certifica que o projeto de pesquisa “Avaliação da influência do estradiol na resposta imunológica a infecção a <i>Gardnerella Vaginalis</i>.”, Protocolo nº 049/2017, do pesquisador Lucas Miranda Marques, que foi submetido à avaliação desta Comissão, está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal e foi aprovado na 18ª reunião ordinária no dia 20/12/2017.</p>
CERTIFICATE
<p>The Committee on Ethics in Animal Use (CEUA - IMS / CAT - UFBA) certifies that the research project “ Evaluation of the influence of estradiol on the immunological response to infection with <i>Gardnerella Vaginalis</i>”, Protocol No. 049/2017, by researcher Lucas Miranda Marques, which was submitted to the evaluation of this Commission, is in accordance with the ethical principles of animal experimentation and was approved at the 18th ordinary meeting on 12/20/2017.</p>

Vitória da Conquista, 18 de fevereiro de 2018.


 Ricardo Evangelista Fraga
 Coordenador CEUA - IMS/CAT – UFBA