



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



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

FERNANDA KAROLINE ALMEIDA FREIRE

**Marcadores de estresse oxidativo no contexto do aborto
espontâneo associado a infecção por *Ureaplasma parvum***

Vitória da Conquista – BA
2023

FERNANDA KAROLINE ALMEIDA FREIRE

Marcadores de estresse oxidativo no contexto do aborto espontâneo associado a infecção por *Ureaplasma parvum*

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas/Sociedade Brasileira de Fisiologia, na área de conhecimento em Fisiologia de órgãos e sistemas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Barreto Campos
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Caline N. Teixeira Oliveira
Universidade Federal da Bahia - UFBA

Vitória da Conquista – BA
2023

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – SIBI/UFBA

F866

Freire, Fernanda Karoline Almeida.

Marcadores de estresse oxidativo no contexto do aborto espontâneo associado a infecção por *Ureaplasma parvum* / Fernanda Karoline Almeida Freire. -- Vitória da Conquista, BA: UFBA, 2023.

76 f.; il.; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Barreto Campos.

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Caline N. Teixeira Oliveira.

Dissertação (Mestrado – Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas/Sociedade Brasileira de Fisiologia) - Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, 2023.

1. Aborto. 2 Estresse oxidativo. 3. *Ureaplasma parvum*. I. Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Campos, Guilherme Barreto. III. Oliveira, Caline N. Teixeira. IV. Título.

CDU: 618.39-021.3

FERNANDA KAROLINE ALMEIDA FREIRE

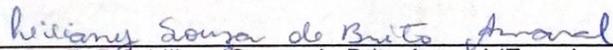
“Marcadores de estresse oxidativo no contexto do aborto espontâneo associado a infecções por *Ureaplasma parvum*”

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de mestre em Ciências Fisiológicas e aprovada em sua forma final pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal da Bahia.

Vitória da Conquista – BA, 27 de julho de 2023.



Prof. Dr. Guilherme Barreto Campos (Orientador)
Universidade Federal da Bahia - UFBA/IMS



Prof.ª Dr.ª Lilianny Souza de Brito Amaral (Examinadora Interna)
Universidade Federal da Bahia - UFBA/IMS



Prof.ª Dr.ª Clarissa Leal Silva e Souza (Examinadora Externa)
Faculdade Santo Agostinho - FASA

Em tudo daí graças!

*“Deus marcou o tempo certo para cada coisa”
(Eclésiastes 3:11)*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sua infinita bondade e misericórdia. E por me proporcionar viver esse processo.

Aos meus familiares, Manuela, Raissa e Laura minhas irmãs que representam minha força diária, o amor que sinto por vocês me impulsiona a vencer todos os dias. Meu grande amor, minha mãe Cris que sempre representou tudo que eu sou. Ao amor da minha vida, meu namorado Daniel, que sempre acreditou e confiou no meu potencial, me apoiando em todos os momentos e celebrando comigo todos os degraus alcançados até aqui. Agradeço imensamente a minha sogra Luciana, por ser minha eterna mentora de vida e grande incentivadora que sempre sonhou junto comigo. Sou grata a minha tia Nilde e Manu que me acolheram no início desse processo e sempre estão presentes na minha vida. Aos meus avós, Nelson e Zenaide por todos os ensinamentos. Meu eterno obrigada a todos vocês por terem contribuído com todo apoio, amor, força e incentivo durante essa caminhada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Guilherme Barreto, pela confiança depositada, pela receptividade no PPGMCF (IMS/UFBA), sempre tão solícito e resolutivo, com toda a sua simpatia e humildade me acolheu e me ensinou em todos os momentos. À minha orientadora Prof^a. Dr^a Caline Novais que também proporcionou o desenvolvimento dessa pesquisa, acreditando no meu potencial, sempre disponível com sua simplicidade e carisma.

Agradeço também a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, que compartilharam comigo muitos conhecimentos sobre as Ciências da Vida com muita competência e experiência. Agradecimento especial para o Prof^o. Dr. Lucas e Prof^a. Dr^a Lilianny.

Aos colegas do Programa de Ciências Fisiológicas e Biociências, Caio, Thaise e Anne que me apoiaram e me incentivaram. Muito obrigada principalmente à Caio que me recebeu nos laboratórios, me ensinando os processos e técnicas, com muita leveza e paciência. Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Fisiologia, Bia, Thiago e Lara que me ensinaram, me apoiaram, se disponibilizaram em me ajudar em todos os processos, sempre tornando o ambiente mais alegre, dinâmico e acolhedor.

Por fim, agradeço a todos aqueles que estiveram comigo nesse momento tão marcante da minha vida. Muito obrigada!

RESUMO

FREIRE, Fernanda Karoline Almeida. **Marcadores de estresse oxidativo no contexto do aborto espontâneo associado a infecção por *Ureaplasma parvum***. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2023.

Aborto é a interrupção da gestação antes da 22ª semana gestacional, ou o feto pesando menos de 500g. Podendo ser de maneira habitual ou induzida, possuindo uma multicausalidade, que englobam infecções genitais. As infecções do trato genital ascendem para cavidade uterina sendo responsável por 15% dos abortos precoces e 66% nos abortos tardios. As respostas inflamatórias exacerbadas oriundas do processo infeccioso acometem a homeostase gestacional, contribuindo com o perfil pró-inflamatório e modificando o estado oxidativo. Este trabalho teve como objetivo principal avaliar os marcadores de estresse oxidativo no contexto do aborto espontâneo associada a infecção por *Ureaplasma parvum*. Foram utilizadas amostras biológicas de tecido placentário de mulheres que evoluíram com aborto espontâneo e mulheres que tiveram parto a termo. Ao avaliar os marcadores de peroxidação lipídica e carbonilação proteica, foram identificados níveis elevados de (TBARS e proteína carbonilada) no aborto, bem como o aumento da atividade antioxidante pela CAT, e redução da atividade da GPx, além de uma resposta não alterada da SOD. Entretanto, o perfil da peroxidação lipídica foi acentuado no aborto infectado por UP. E os níveis da GPx foram reduzidos no aborto infectado por UP, comparado ao controle infectado, enquanto SOD e CAT não apresentaram diferenças; a razão SOD/CAT esteve reduzida e SOD/GPx elevada nos grupos de UP, comparado aos sem infecção. Na razão da expressão gênica, o aborto infectado contribuiu com a redução de Mn SOD/GPx além de reduzir a expressão de CuZn SOD/GPx e Mn SOD/GPx no grupo aborto e controle infectado, comparado aos grupos sem infecção. Em seguida, houve aumento dos níveis de nitrito no aborto infectado por UP. Este trabalho demonstrou que a infecção por UP pode contribuir para alterar o perfil oxidante, sugerindo, assim, que o desequilíbrio do estresse oxidativo pode contribuir com a ocorrência do aborto espontâneo associado a infecção bacteriana.

Palavras-chave: Aborto espontâneo, *Ureaplasma parvum*, estresse oxidativo.

ABSTRACT

FREIRE, Fernanda Karoline Almeida. **Marcadores de estresse oxidativo no contexto do aborto espontâneo associado a infecção por *Ureaplasma parvum***. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2023.

Abortion is the interruption of pregnancy before the 22nd gestational week or when the fetus weighs less than 500g. It can occur naturally or be induced and has multiple causes, including genital infections. Genital tract infections can ascend to the uterine cavity and account for 15% of early abortions and 66% of late abortions. Exacerbated inflammatory responses resulting from the infectious process affect gestational homeostasis, contributing to a pro-inflammatory profile and altering the oxidative state. The main objective of this study was to evaluate markers of oxidative stress in the context of spontaneous abortion associated with *Ureaplasma parvum* infection. Biological samples of placental tissue were collected from women who experienced spontaneous abortion and women who had full-term deliveries. When evaluating markers of lipid peroxidation and protein carbonylation, elevated levels of TBARS and protein carbonylation were identified in abortion cases, along with increased CAT antioxidant activity and reduced GPx activity, while SOD activity remained unchanged. However, the profile of lipid peroxidation was accentuated in UP-infected abortions. GPx levels were reduced in UP-infected abortions compared to infected controls, while SOD and CAT showed no differences. The SOD/CAT ratio was reduced, and the SOD/GPx ratio was elevated in the UP groups compared to those without infection. Regarding gene expression, infected abortions showed reduced Mn SOD/GPx and decreased CuZn SOD/GPx and Mn SOD/GPx expression in both abortion and infected control groups compared to those without infection. Additionally, nitrite levels increased in UP-infected abortions.

This study demonstrated that UP infection may contribute to altering the oxidant profile, suggesting that an imbalance in oxidative stress could play a role in spontaneous abortion associated with bacterial infection.

Keywords: Spontaneous abortion, *Ureaplasma parvum*, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Invasão bacteriana na interface materno-fetal.	29
Figura 2- Cadeia de transporte de elétrons.	31
Figura 3- Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS (A) e proteínas carboniladas (B) no tecido placentário de mulheres que evoluíram com aborto espontâneo (caso) e mulheres que tiveram parto a termo (controle).	44
Figura 4- Concentrações das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase no tecido placentário de mulheres que evoluíram com aborto espontâneo e mulheres que tiveram parto a termo.	45
Figura 5 - Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS (A) e proteínas carboniladas (B) no tecido placentário de mulheres que tiveram parto a termo sem infecção (controle absoluto), parto a termo e infecção por <i>U. parvum</i> (controle infectado), aborto com infecção por <i>U. parvum</i> e aborto sem infecção.	46
Figura 6- Concentração das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase no tecido placentário de mulheres que tiveram parto a termo sem infecção (controle absoluto), parto a termo e infecção por <i>U. parvum</i> (controle infectado), aborto com infecção por <i>U. parvum</i> e aborto sem infecção.	47
Figura 7- Razão das enzimas SOD/CAT e SOD/GPx no tecido placentário de mulheres que tiveram parto a termo sem infecção (controle absoluto), parto a termo e infecção por <i>U. parvum</i> (controle infectado), aborto com infecção por <i>U. parvum</i> e aborto sem infecção.	48
Figura 8- Expressão gênica de Cu/Zn SOD, Mn SOD, GPx, CAT e Nrf2 no tecido placentário de mulheres que tiveram parto a termo sem infecção (controle absoluto), parto a termo e infecção por <i>U. parvum</i> (controle infectado), aborto com infecção por <i>U. parvum</i> e aborto sem infecção.	48
Figura 9- Razão das enzimas Mn SOD/GPx; CuZn SOD/GPx, Mn SOD/CAT e CuZn SOD/CAT, por meio da expressão gênica, no tecido placentário de mulheres que tiveram parto a termo sem infecção (controle absoluto), parto a termo e	

infecção por U. parvum (controle infectado), aborto com infecção por U. parvum e aborto sem infecção. 50

Figura 10- Razão das enzimas CuZn SOD/GPx e Mn SOD/GPx, por meio da expressão gênica-no tecido placentário de mulheres que tiveram aborto com infecção por U. parvum e aborto sem infecção. 51

Figura 11- Dosagem de nitrito no tecido placentário de mulheres que tiveram parto a termo sem infecção (controle absoluto), parto a termo e infecção por U. parvum (controle infectado), aborto com infecção por U. parvum e aborto sem infecção..... 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers e sequências usadas nas análises de expressão gênica das enzimas antioxidantes: CAT, GPx, Cu/Zn SOD, Mn SOD e Nrf2.....	42
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE	Abortamento espontâneo
ARE	Elemento de resposta antioxidante
ATP	Adenosina trifosfato
CAT	Catalase
CMV	Citomegalovírus
CT	<i>Chlamydia trachomatis</i>
Cu/Zn SOD	Cobre/zinco superóxido dismutase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC	Estado de comunidade
EO	Estresse oxidativo
FADH	Dinucleótido de flavina e adenina
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
GSH	Glutationa reduzida
GSSG	Glutationa oxidada
GV	<i>Gardenerella vaginalis</i>
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HSV-1	Herpes simplex tipo 1
HSV-2	Herpes simplex tipo 2
IgA	Imunoglobulina A
IL	Interleucina
IL-1 α	Interleucina 1 alfa
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-15	Interleucina 15

INF- γ	Interferon gama
KEAP 1	Kelch-like associado a proteína 1
LM	<i>Listeria monocytogenes</i>
LOS	Lipooligossacarídeo
LPO	Peroxidação lipídica
MDA	Malondialdeído
MG	<i>Mycoplasma genitalium</i>
MH	<i>Mycoplasma hominis</i>
Mn SOD	Manganês superóxido dismutase
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NG	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
NK	Células natural killer
Nrf2	Fator nuclear eritróide 2
NO	Óxido nítrico
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
O ₂	Oxigênio molecular
OH•	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
PG's	Prostaglandinas
pH	Potencial hidrogeniônico
PNA	Pesquisa Nacional de Aborto
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TH1	T helper 1
TH2	T helper 2
TLR	Receptor do tipo toll (<i>Toll Like Receptor</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TREG	Células T reguladoras
UP	<i>Ureaplasma parvum</i>
UU	<i>Ureaplasma urealyticum</i>
VB	Vaginose bacteriana

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	Aborto espontâneo	17
2.1.1	Aborto espontâneo associado às infecções genitais	18
2.2	Microrganismos mais prevalentes nas infecções genitais de gestantes	19
2.2.1	Vírus	19
2.2.1.1	Citomegalovírus	19
2.2.1.2	<i>Herpes simplex</i>	19
2.2.2	BACTÉRIAS	20
2.2.2.1	<i>Mollicutes</i>	20
2.2.2.1.1	<i>Mycoplasma</i>	20
2.2.2.1.2	<i>Ureaplasma spp.</i>	22
2.2.2.2	<i>Chlamydia trachomatis</i>	23
2.2.2.3	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	23
2.2.2.4	<i>Gardnerella vaginalis</i>	24
2.3	O papel das infecções genitais na microbiota vaginal de gestantes	25
2.4	Mecanismos fisiológicos, patológicos e imunológicos do aborto espontâneo associado a infecções genitais	26
2.5	Alterações moleculares e bioquímicas das principais moléculas antioxidantes e oxidantes no aborto espontâneo associado a infecções genitais	29
3	JUSTIFICATIVA	34
4	OBJETIVOS	35
4.1.1	Objetivo Geral	35
4.1.2	Objetivos específicos	35
5	MATERIAL E MÉTODOS	36
5.1	COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	36
5.2	AVALIAÇÃO DO STATUS REDOX E PERFIL INFLAMATÓRIO	37
5.2.1	Preparo do Homogenato	37
5.2.2	Determinação da Concentração de Proteínas Totais	38
5.2.3.	Níveis de Nitrito	38
5.2.4	Peroxidação Lipídica	38
5.2.5	Proteínas carboniladas	39
5.2.6	Atividade da Enzima Catalase (CAT)	39

5.2.7 Atividade da Enzima Glutationa Peroxidase (GPx)	40
5.2.8 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)	40
6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
7 RESULTADOS	44
7.1 Estresse oxidativo e capacidade antioxidante enzimática	44
7.2 Estresse oxidativo e capacidade antioxidante enzimática associado a infecção por <i>U. parvum</i>	45
7.3 Expressão gênica de Nrf2, CAT, Cu/ Zn SOD, Mn SOD e GPx por PCR em tempo real (PCR Real-time)	48
7.3.1 Expressão gênica: Razão de CuZn SOD/ CAT, Mn SOD/CAT, CuZn SOD/GPx e Mn SOD/GPx	49
7.4 Dosagem de nitrito	51
8 DISCUSSÃO	53
9 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	60
ANEXO I- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	72
ANEXO II- Questionário	74
SUPLEMENTAR 1- Razão da expressão gênica de CuZn SOD/GPx (grupo aborto); Mn SOD/CAT (grupo aborto); CuZn SOD/CAT (grupo controle); Mn SOD/CAT (grupo controle) em condições distintas de infecção.	76

1 INTRODUÇÃO

Aborto é a expulsão de um embrião/ feto antes do final do seu desenvolvimento e viabilidade para vida extrauterina (QUENBY et al., 2021), também definido como a interrupção da gestação antes da 22ª semana gestacional, ou o feto pesando menos de 500g (DIMITRIADIS et al., 2020). A expulsão embrionária inviável pode ocorrer de maneira natural ou induzida, respectivamente, por complicações gestacionais ou fatores externos (LI et al., 2021; CARLSSON; BREDING; LASSON., 2018). Mundialmente, encontram-se números alarmantes de abortos, podendo chegar até 50 milhões de casos por ano (RIBEIRO, ALBURQUERQUE; SOUZA., 2017).

A etiologia do aborto envolve características socioeconômicas, idade, história obstétrica, hábitos de vida, condições anatômicas, genéticas, imunológicas e infecciosas (LA et al., 2021). O aborto séptico é desencadeado pela ascendência das infecções genitais provenientes de contaminação por vírus, bactérias e protozoários para a unidade feto-placentária (GIAKOUMELOU et al., 2016). A infecção causa uma resposta inflamatória e imunológica crônica (OLIVEIRA et al., 2020), derivando em liberação excessiva de citocinas, como TNF- α , IL-6, IL-8 que resultam em apoptose trofoblástica, impedindo a formação da placenta e o desenvolvimento efetivo do embrião (GUERRERO et al., 2020).

A prevalência de aborto séptico pode variar de 5% a 20% em países em desenvolvimento (ESCHENBACH, 2015). As infecções do trato genital associado ao aborto espontâneo têm uma taxa de 15% nos abortos precoces e 66% nos abortos tardios (GIAKOUMELOU et al., 2016). Patógenos bacterianos e virais que incluem *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Ureaplasma parvum*, foram associados a ruptura prematura de membranas, parto prematuro, baixo peso ao nascer e aborto espontâneo (VALELLY et al., 2018).

Processos inflamatórios, associados ou não a infecções, desencadeiam cascatas de respostas imunológicas, além de contribuir com o aumento do ânion superóxido, modificando o equilíbrio dinâmico oxidativo das gestantes (HUSSAIN et al., 2022; ZEJNULLAHU; ZEJNULLAHU; KOSUMI, 2021). O estresse oxidativo durante o processo gestacional apresenta duas principais funções que envolvem a manutenção do equilíbrio redox e a participação dos processos reprodutivos femininos (SILVA et al., 2020). O processo inflamatório proveniente da infecção eleva a tensão do oxigênio molecular e produção das espécies reativas de oxigênio, aumentando a demanda da atividade das enzimas antioxidantes (HUSSAIN et al., 2022). Neste contexto, as enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutatona peroxidase

(GPX) estão presentes em ovários, trompas, epitélio do endométrio e embriões. Fatores pró-inflamatórios descompensam os sistemas de defesa do organismo (enzimático e não enzimático), causando a peroxidação lipídica e oxidação proteica, consideradas consequências do desequilíbrio do estresse oxidativo e da sua relação com processos patológicos (ZEJNULLAHU; ZEJNULLAHU; KOSUMI 2021). Além disso, produtos da peroxidação lipídica estiveram aumentados em mulheres com desfechos gestacionais adversos (TARAVATI; TOHIDI, 2018; HUSSAIN et al., 2021).

Diante deste cenário, a proposta deste estudo é avaliar marcadores de estresse oxidativo no contexto do aborto espontâneo associado a infecções por microrganismos de importância ginecológica, visando contribuir com a saúde preventiva e curativa de gestante que experienciaram abortos espontâneos, reduzir a quantidade de óbitos fetais e complicações maternas, bem como favorecer a redução de gastos envolvidos nas complicações gravídicas ocasionadas pelo aborto.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aborto espontâneo

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) aborto é definido como a interrupção da gestação antes da 20^a ou 22^a semana gestacional ou um feto pesando menos de 500g (FRANÇA et al, 2005). Por conseguinte, o abortamento é o processo que se refere a expulsão de um embrião/feto antes do final do seu desenvolvimento e viabilidade para vida extrauterina (RIBEIRO; SPINK, 2011). De acordo estudo baseado em estimativas da OMS, aproximadamente 55 milhões de abortos ocorreram entre 2010 e 2014 no mundo (CARDOSO et al., 2020). Sendo, assim, um problema de saúde pública que afeta principalmente países em desenvolvimento, pela magnitude, persistência e alta prevalência, como uma das principais causas de mortalidade materna (SOUZA, JUNIOR, 2020). No Brasil, a Pesquisa Nacional de Abortos (PNA) demonstrou que 4,7 milhões de mulheres sofreram ao menos um aborto por ano (DINIZ; MEDEIROS; MADEIRO, 2017).

Aborto pode ser de origem espontânea ou induzida (BENUTE et al., 2009) de forma habitual ou recorrente (ROSA et al., 2020). O abortamento induzido, também nomeado como provocado é geralmente desencadeado por fatores como: feto anencéfalo, gravidez indesejada por falta do uso de medidas anticonceptivas ou por violência sexual (RIBEIRO; SPINK, 2011). A indução da expulsão do feto ocorre por meios farmacológicos, inserção de corpo estranho, iatrogênicos ou cirúrgicos (DOMINGUES et al., 2020) e, quando realizado de forma insegura, constitui um problema de saúde pública (BORSARI et al., 2012).

Abortamento espontâneo (AE), por sua vez, também conhecido como natural ou perda prematura da gravidez, ocorre devido a complicações gestacionais ou problemas no desenvolvimento fetal. Pode ocorrer no 1º trimestre da gestação, sendo este precoce (BRAZ et al., 2020) ou de maneira tardia, ocorrendo durante o 2º trimestre gestacional (BORGES., 2013). A recorrência pode acontecer quando se tem três ou mais abortos sucessivos espontâneos (DE ARAUJO et al., 2021) e a habitualidade se dá por um único episódio de perda fetal (GONÇALVES et al., 2019).

Dentre os fatores predisponentes ao AE encontra-se causas genéticas (anormalidades cromossômicas) (BABA et al., 2011); anatômicas (incompetência istmo cervical, miomas, etc) (DIEJOMAOH et al., 2015); endócrinas (síndrome de ovários policísticos, diabetes mellitus, etc) (TUERLICKX., Patrícia, 2005); imunológicas (síndrome antifosfolípídeo) (DIEJOMAOH et al., 2015); e infecciosas (BRAZ et al., 2020). As infecções maternas na grande maioria são

desencadeadas por infecções genitais provocadas por microrganismos como *Chlamydia trachomatis* (CT), *Mycoplasma hominis* (MH), *Listeria monocytogenes* (LM), Citomegalovirus (CVM), *Ureaplasma urealyticum* (UU) etc (BARINI et al., 2000; BARBOSA; RIBEIRO e LIMA, 2019; SANTOS et al., 2018).

2.1.1 Aborto espontâneo associado às infecções genitais

Infecções genitais surgem pela contaminação viral e/ou bacteriana que comprometem o ecossistema vaginal (PEDER et al., 2018), progredindo para uma infecção do trato reprodutivo, causando em gestantes consequências materno-fetais, como o AE (ZENG et al., 2022). O processo infeccioso genital que acomete o epitélio estratificado da vulva e vagina, são consideradas vulvovaginites e vaginoses (PEREIRA, 2022), e podem evoluir para a cérvix, região internamente inferiorizada do colo do útero denominando assim a cervicite (TABLA; GUTIÉRREZ, 2019).

Cervicites são infecções, geralmente causadas por patógenos sexualmente transmissíveis (TABLA; GUTIÉRREZ, 2019). Sendo mais comum a infecção por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*. Cerca de 70 a 80% dos casos de cervicites não apresentam sintomas (MIRANDA et al., 2021). Os casos assintomáticos dificultam o diagnóstico precoce, o que sugere risco aumentado para uma infecção persistente, por conseguinte, elevando complicações à saúde reprodutiva (HORNUNG et al., 2015).

Vulvovaginites e vaginoses, por sua parte, são bastante comuns em mulheres de idade reprodutiva, acometendo o epitélio estratificado da vulva e vagina. Em um estudo realizado na Turquia, alguns dados demonstraram que de 348 mulheres em idade reprodutiva com queixa de corrimento vaginal, 46,3% cursaram com vaginose bacteriana (EROGLU; ASGIN, 2022). A presença da VB durante a gestação é um fator preocupante devido as suas consequências como o trabalho de parto prematuro e aborto espontâneo tardio (ISIK et al., 2016).

Aborto séptico oriundo das infecções genitais, dispõe de diferentes mecanismos, dependendo do patógeno oportunista para comprometer a interface materno-fetal (GIAKOUMELOU et al., 2016). O desequilíbrio da microbiota vaginal é o ponto inicial para uma posterior ascendência de infecção (OLIVEIRA; CARNEIRO, 2020). Patógenos cruzam a barreira placentária e invadem o endométrio, com suas possíveis complicações: infecção endometrial crônica, amnionite, contrações uterinas, trabalho de parto prematuro, insuficiência placentária e morte fetal (NIGRO et al., 2011).

2.2 Microrganismos mais prevalentes nas infecções genitais de gestantes

2.2.1 Vírus

2.2.1.1 Citomegalovírus

Citomegalovírus humano (CMV) é um vírus pertencente à família *Herpesviridae*, possuindo genoma constituído de DNA (AURITI et al., 2021). Em gestantes possui capacidade de latência, ou seja, após uma infecção primária, esse vírus permanece no organismo podendo ser reativado (JUNQUEIRA; SANCHO; SANTOS, 2008). A contaminação pode ocorrer por via sexual, exposição doméstica ou ocupacional, principalmente contato com urina ou saliva de crianças jovens, e por transfusão e/ou transplante de órgãos (CASTILLO; TEJADA; GARCIA, 2019).

CMV é prevalente principalmente em países em desenvolvimento, atingindo 42,3 a 68,3% das grávidas (GAO et al., 2018). Infecção por CMV em gestantes ocorre principalmente no 1º trimestre, sendo em maior parte casos assintomáticos (AURITI et al., 2021). O vírus pode acometer a unidade materno-fetal por via transplacentária ou por rota ascendente, atingindo as células trofoblásticas, desequilibrando-as antes mesmo de atingir o feto (YAMAMOTO-TABATA et al., 2004). Complicações materno-fetais estão envolvidas nesse tipo de infecção (WALDORF; MCADAMS, 2013), envolvendo a má-formação fetal, parto prematuro e o AE (AURITI et al., 2021).

2.2.1.2 *Herpes simplex*

Herpes simplex tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) é um vírus de DNA, assim como o CMV, também pertence à família *Herpesviridae* (AURITI et al., 2021). Trata-se de uma infecção sexualmente transmissível, com inúmeros casos assintomáticos (GAO et al., 2018). Autores demonstraram uma prevalência de 20 a 30% de gestantes infectadas pelos HSV (ARABSALMANI et al., 2017). Grávidas infectadas com HSV, sendo principalmente a infecção pelo HSV-2 apresentaram risco aumentado para parto prematuro, baixo peso ao nascer e AE (SHI et al., 2018).

O processo infeccioso desencadeado pelo vírus ascende para cavidade útero-placentária, atingindo o trofoblasto. A disfunção placentária resulta em complicações gestacionais (HEYDARIFARD et al., 2022). Outros achados identificaram a presença de HSV em placentas de mulheres que evoluíram com aborto (GIAKOUMELOU et al., 2016). As alterações imunológicas

provenientes da infecção por HSV em mulheres grávidas, sugerem um risco aumentado para desfechos adversos na gestação (FARSIMADAN; MOTAMEDIFAR, 2021).

2.2.2 BACTÉRIAS

2.2.2.1 *Mollicutes*

Micoplasmas são bactérias que apresentam mais de 200 espécies dentro da classe *Mollicutes* (WAITES; KATZ; SCHENLONKA, 2005), envolvendo cinco ordens, seis famílias e dez gêneros identificados em humanos, animais, plantas e artrópodes. A família Mycoplasmataceae dispõe de gêneros como o *Mycoplasma* e *Ureaplasma*, que estão relacionados a implicações no trato urogenital de humanos (RUFO et al., 2021; WAITES; KATZ; SCHENLONKA, 2005). Algumas espécies têm patogenicidade comprovada como: *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. urealyticum* e *U. parvum* (PERETZ et al., 2020).

As características dos micoplasmas envolvem: ausência de parede celular rígida, membrana constituída de proteínas e colesterol que ao formarem pequenas colônias se comparam com o formato do “ovo frito” (LARSEN; HWANG., 2010), além de possuírem genomas pequenos, devido as dimensões de tamanho (0,2 µm), conseqüentemente cursam com um metabolismo reduzido (PERETZ et al., 2020; RUFO et al., 2021). São particularmente redondos ou elípticos, podendo também formarem microfilamentos (TAYLOR-ROBINSON; LAMONT, 2011).

Essas bactérias estão presentes na orofaringe, na mucosa urogenital e sistema reprodutivo (PERETZ et al., 2020). Estão, assim, relacionadas as infecções sexualmente transmissíveis sendo, na grande maioria, assintomáticas (JULIANA et al., 2021). Além disso, estão dentre os patógenos causadores das uretrites não-gonocócicas, cervicites (MIRANDA et al., 2020) e doença inflamatória pélvica (MAIA et al., 2021). Estudo recente demonstrou que as infecções por *U. urealyticum*, *U. parvum*, *M. hominis* e *M. genitalium*, ao coexistirem com a VB, contribuem com as complicações gestacionais: parto prematuro, ruptura prematura de membrana e aborto espontâneo (JONDUO et al., 2022).

2.2.2.1.1 *Mycoplasma*

Mycoplasma hominis (MH) é uma espécie pertencente ao gênero *Mycoplasma*, da ordem Mycoplasmatales, e possuem formato cocóide de pequeno tamanho (0,5µm), (AHMED et al.,

2021) sendo considerada uma bactéria autorreplicante, com um genoma muito pequeno (LARSEN; HWANG., 2010). É um habitante comum na microbiota vaginal de mulheres em idade reprodutiva (JONDUO et al., 2022), de grávidas e não grávidas (FARHADIFAR et al., 2016).

As infecções por MH já foram associadas a uma variedade de condições, incluindo a prática sexual desprotegida, sistema imunológico do hospedeiro e etnia afro-americana (WAITES; KATZ; SCHENLONKA, 2005) e VB (JONDUO et al., 2022). A patogenicidade dessa bactéria se revela durante a associação com a VB, respectivamente, diminuindo os *Lactobacillus spp.*, originando uma disbiose vaginal (JONDUO et al., 2022), ou seja, promovendo desequilíbrio da microbiota vaginal e cervical, contribuindo para mais infecções (JIAO et al., 2022).

A disbiose vaginal em gestantes tem relação direta com risco aumentado para AE (JIAO et al., 2022). O maior desafio da infecção promovida por MH é a ocorrência de casos assintomáticos que podem acometer de 21% a 53% das gestantes. (WAITES; KATZ; SCHENLONKA, 2005; PENDÁS et al., 2019). Todavia, os processos infecciosos nesses casos vão progredindo, aumentando a inflamação (TAYLOR-ROBINSON; LAMONT, 2011) que, por sua vez, contribui com a lise de fosfolipídios, indução de prostaglandinas, liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-6 e IL-8 (ISIK et al., 2016). Essas alterações inflamatórias atingem a unidade materno-fetal, desencadeando complicações gravídicas, como o próprio aborto espontâneo (GIAKOUMELOU et al., 2016; MEGLI; COYNE, 2022).

Mycoplasma genitalium (MG), assim como MH, é uma bactéria da família Mycoplasmataceae (RUFO et al., 2021), considerada fastidiosa, com replicação independente (GNNANADURAI; FIFER, 2020). Parasitário no trato urogenital, pode causar de uretrite não-gonocócica em homens a cervicite mucopurulenta em mulheres (YUEYUE et al., 2022). Contudo, a ausência de sintomas é muito comum durante a infecção, acometendo cerca de 80% das mulheres infectadas (RAMAZANZADEH et al., 2016).

Cervicites causadas pelo MG podem comprometer gestantes, ocasionando resultados adversos (FRENZER et al., 2022) como: amnionite, parto prematuro (NYE et al., 2020) e aborto espontâneo (SCOULLAR et al., 2021). Infecções vaginais e cervicais tendem a progredir para a unidade materno-fetal (JIAO et al., 2022). MG tem um potencial de motilidade, invasão celular e deslizamento durante sua patogênese (GNNANADURAI; FIFER, 2020). Sua capacidade deslizante está relacionada com o processo de adesão, contribuindo assim com a colonização e disseminação da infecção (YUEYUE et al., 2022).

MG se adere com facilidade as células epiteliais do lúmen vaginal, ectocérvice e endocérvice (DEHON; MCGOWIN, 2017). Após a sua aderência nas células epiteliais do hospedeiro, ocorre a indução do processo inflamatório no trato urogenital (GNNANADURAI;

FIFER, 2020). Dispondo de diversos mecanismos patogênicos, que envolvem a ativação pró-inflamatória, incluindo secreção de interleucinas, quimiocinas e atração leucocitária para o local (YUEYUE et al., 2022). As células inflamatórias podem invadir o colo uterino, membranas e líquido amniótico, induzindo contrações uterinas e resultando em adversidades para o processo gestacional (LARSEN; HWANG, 2010).

2.2.2.1.2 *Ureaplasma spp.*

A classe *Mollicutes*, dispõe de seis famílias e 14 gêneros. A família *Mycoplasmataceae* engloba o gênero *Ureaplasma spp.*, possuindo espécies como *Ureaplasma urealyticum* (UU) e *Ureaplasma parvum* (UP) (SPRONG et al., 2020), que colonizam o trato urogenital feminino e masculino (MATASARIU et al., 2022). Promovem infecções no colo uterino e vagina com altas prevalências que podem variar de 40 a 80% (PERETZ et al., 2020), tendo uma associação relevante com corioamnionite, parto prematuro e aborto espontâneo (GALLINI et al., 2022).

Ureaplasma urealyticum é uma espécie muito comum no trato geniturinário (AYDIM et al., 2010), presente também no líquido amniótico e placenta (PERETZ et al., 2020). É considerado um patógeno de alta virulência (LARSEN; HWANG, 2010), que pode ingressar do canal vaginal para o cervical, atingindo a unidade materno-fetal, desencadeando respostas inflamatórias, estimulando a ruptura prematura de membranas e AE (SPRONG et al., 2020).

Ureaplasma parvum, por sua vez, possui um genoma menor e uma frequência maior na mucosa vaginal de mulheres, quando comparado a UU (SWEENEY et al., 2017). O processo infeccioso causado por UP compromete a barreira epitelial cervical, induzindo a inflamação, aumentando, assim, os níveis de citocinas pró-inflamatórias como IL-8 e IL-6 (TANTENGCO et al., 2021). Estudo recente reportou a prevalência de 66% de UP no tecido placentário de mulheres que evoluíram com aborto espontâneo (OLIVEIRA et al., 2020).

Diversos mecanismos são descritos demonstrando a virulência das espécies do gênero *Ureaplasma* no hospedeiro (WAITES; KATZ; SCHENLONKA, 2005). Os fatores que auxiliam no processo de adesão e persistência dessa infecção, englobam: o antígeno de bandas múltiplas que promove a indução da produção de citocinas via receptores toll-like 1 (LARSEN; HWANG, 2010), fosfolipases A e C que atuam na degradação dos fosfolipídios das células hospedeiras, IgA protease presente em UU que atua na clivagem da IgA e o gene da urease que, após ser metabolizado origina a amônia, atuante na alteração do pH no líquido amniótico (SWEENEY et al., 2017).

2.2.2.2 *Chlamydia trachomatis*

Chlamydia trachomatis (CT) é um bacilo Gram-negativo intracelular obrigatório com tropismo pelas células epiteliais da conjuntiva, uretra, endocervice e tuba uterina (MEŠTROVIĆ; LJUBIN-STERNAK, 2018). Há pelo menos 17 sorotipos diferentes descritos, sendo os sorotipos D e K responsáveis pelas infecções geniturinárias (GARCIA, Aparecida, 1994). Considerado o agente etiológico mais comum das infecções bacterianas sexualmente transmissíveis, principalmente em mulheres de idade reprodutiva (AHMADI et al., 2016), constatou-se um aumento de 90% nos últimos 15 anos nos Estados Unidos (CHEN et al., 2021).

Essa bactéria afeta inicialmente o colo do útero e uretra, desencadeando leucorréia e disúria e, na grande maioria das infecções, ocorre de maneira assintomática (TANG et al., 2020). Seu potencial infeccioso tem a capacidade de destruir ações do sistema imune inato e adaptativo do hospedeiro, e por autofagia atinge a unidade materno-fetal, estabelecendo uma infecção crônica (WITKIN et al., 2017). A cronicidade do processo infeccioso ocasiona a doença inflamatória pélvica, gravidez ectópica, aborto e parto prematuro (GIAKOUMELOU et al., 2016).

Em gestantes, a infecção por CT é marcada pela invasão do patógeno no espaço coriodesidual ativando respostas inflamatórias e imunológicas que resultam em corioamnionite (TANG et al., 2020). Córion e âmnion infectados estimulam a liberação de proteases, ocasionando assim a ruptura prematura de membranas, contrações uterinas, parto prematuro ou aborto espontâneo (AHMADI et al., 2016).

2.2.2.3 *Neisseria gonorrhoeae*

Neisseria gonorrhoeae (NG) pertence ao gênero *Neisseria*, é um diplococo Gram-negativo intracelular (QUILLIN; SEIFERT, 2018). Este agente apresenta tropismo pelo epitélio colunar e transicional do trato geniturinário, além de ser capaz de infectar faringe, conjuntiva e articulações (MŁYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2020). É o agente etiológico das uretrites gonocócicas, apresentando uma incidência estimada pela OMS de 86,9 milhões de casos no ano de 2016. A infecção gonocócica em mulheres geralmente causa corrimento vaginal, entretanto esse sintoma não permite uma abordagem sindrômica, sendo o diagnóstico microbiológico o mais utilizado (UNEMO et al., 2021).

A resistência antimicrobiana da NG dificulta o tratamento, aumentando o número de casos e a persistência infecciosa (MŁYNARCZYK-BONIKOWSKA et al., 2020), sendo muito comum

a ausência de sintomas em mulheres infectadas (QUILLIN; SEIFERT, 2018). A cronicidade do processo infeccioso por NG tem relação com o aborto espontâneo (JONDUO et al., 2022).

O processo infeccioso promovido por NG no hospedeiro se inicia por meio da aderência às células epiteliais, seguida pela replicação e possível formação de biofilme. Na fase inicial, NG libera lipooligossacarídeo (LOS) que ativam as vias dos receptores toll-likes (MAVROGIORGOS et al., 2014). A sinalização dessa via contribui com a liberação de citocinas e quimioquinas pró-inflamatórias, que recrutam leucócitos e neutrófilos para o local da infecção (QUILLIN; SEIFERT, 2018). A evasão da resposta imune inata leva à produção de IFN, o qual inibe a ativação dos fagócitos mediada pelo IFN- γ . Além disso, contribui para a produção de IL-1 α . No contexto da evasão da imunidade adaptativa por *Neisseria gonorrhoeae*, observa-se a indução de TGF- β , IL-6 e IL-10. Tanto o TGF- β quanto o IL-6 estão associados à indução de células T-helper 17, as quais liberam metaloproteinases de matriz e espécies reativas de oxigênio (DARVILLE, 2021).

2.2.2.4 *Gardnerella vaginalis*

Gardnerella vaginalis (GV) é uma bactéria anaeróbica facultativa, espécie do gênero *Gardnerella*, presente na família Bifidobacteriaceae (JESUS et al., 2021). Possui uma parede celular fina, com alta adesão em células epiteliais (SILVA, Cláudia, 2021; FREITAS et al., 2020). Normalmente encontrada na microbiota vaginal, e em casos de desequilíbrio polimicrobiano está relacionada com a VB (AMARAL, Angela, 2012; GIAKOUMELOU et al., 2016). A característica marcante dessa infecção é o forte odor de “peixe podre” na região genital, isso devido as alterações do pH (maior do que 4,5), com a produção de ácido acético e aminas aromáticas oriundas do processo infeccioso do microrganismo em questão (SILVA, Cláudia, 2021; FREITAS et al., 2020; MORRILL; GILBERT; LEWIS, 2020; BONNETON et al., 2021).

Essa bactéria é muito comum em mulheres de idade reprodutiva (AMARAL, Angela, 2012). Nos casos de VB, a presença da *Gardnerella vaginalis* atingiu uma prevalência de 35% das infecções (RESENDE et al., 2019). Tendo relação com resultados adversos da gravidez, incluindo o aborto espontâneo (WONG et al., 2018; MORRILL; GILBERT; LEWIS, 2020). Em torno de 40% dos casos de mulheres que evoluíram com aborto apresentaram positividade para VB (ISIK et al., 2016). Dentro da etiopatogenia do aborto relacionado a vaginose bacteriana, notou-se a produção de enzimas líticas que causam a lise de fosfolipídios das membranas fetais, e a formação do ácido araquidônico induzindo as prostaglandinas a contraírem a musculatura uterina e diminuir a resistência cervical (ISIK et al., 2016). As prostaglandinas também levam à liberação

citocinas inflamatórias que agem degradando o tecido conjuntivo, aumentando as chances de aborto (BONNETON et al., 2021).

Patógenos como *Gardnerella vaginalis*, *U. urealitycum* e *M. hominis* estiveram associados a VB, após diminuírem e substituírem a presença de *Lactobacillus spp* na microbiota vaginal (GREWAL; MACINTYRE; BENNETT, 2021; GIAKOUMELOU et al., 2016; CHEN et al., 2021). A presença da *Gardnerella vaginalis* no epitélio vaginal inicia a formação do biofilme capaz de degradar as camadas protetivas do epitélio, alterando a concentração de muco no local e favorecendo a adesão de outras bactérias (CHACRA; FENOLLAR; DIOP, 2022).

2.3 O papel das infecções genitais na microbiota vaginal de gestantes

Conteúdo vaginal fisiológico consiste no complexo de interação entre microbiota vaginal, metabolismo desta microbiota, resposta imune do hospedeiro, nível de potencial hidrogeniônico (pH) e fatores hormonais (estrogênio) (BONFANTI; GONÇALVES, 2010; KUMAR et al., 2021). Ecossistema vaginal também possui relação direta com fatores externos (excesso de umidade, calor, condições higiênicas etc) e internos (menstruação, menopausa, gestação, puerpério etc) (CHEE; CHEW; THAN, 2020). Outro fator predisponente às alterações fisiológicas vaginais são as infecções genitais (OLIVEIRA et al., 2020).

A microbiota vaginal é colonizada pela presença de aeróbios Gram-positivos (*Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus epidermidis*) e Gram-negativos (*Escherichia coli*) (OLIVEIRA et al., 2020). Anaeróbios facultativos (*Gardnerella vaginalis*) e anaeróbios estritos (UU e MH) são capazes de promover uma infecção urogenital e agravar uma gestação (CHEE; CHEW; THAN, 2020). *U. parvum* apresentou relação com o aborto espontâneo, mediante a infecção instalada, ocorreu a produção de prostaglandinas estimulando a liberação de metaloproteinases dos neutrófilos, conseqüentemente levando a degradação das membranas corioamnióticas (OLIVEIRA et al., 2021; ISIK et al., 2016).

Mulheres em idade reprodutiva apresentam grande quantidade de *Lactobacillus spp.*, que podem transitar de um estado de comunidade (EC) para outra durante uma gestação (CHACRA; FENOLLAR; DIOP, 2022). *Lactobacillus spp.* englobam quatro tipos predominantes no meio vaginal (*L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. jensenii*) que dizem respeito a esse EC (GREWAL; MACINTYRE; BENNETT, 2021). A funcionalidade dessas espécies é utilizar produtos da degradação do glicogênio para produzir ácido lático, peróxido de hidrogênio e proteínas

antimicrobianas, mantendo o meio com o pH ácido, impedindo o crescimento de outras bactérias (OLIVEIRA et al., 2021; KALIA; SINGH; KAUR, 2020)

Efeitos bacteriostáticos e bactericidas fornecido pelos *Lactobacillus spp.*, principalmente *Lactobacillus crispatus*, promovem benefícios ao microambiente vaginal de gestantes (OLIVER et al., 2020). *Lactobacillus spp.* na gestação previnem contra a ascendência de infecções genitais para a cavidade útero-placentária (GREWAL; MACINTYRE; BENNETT, 2021). Mas, a presença de *Lactobacillus iners* na microbiota é um pouco controverso, o que justifica a transição do EC, por demonstrar uma disbiose, ou seja, um desequilíbrio, no qual muitas vezes está relacionado com a VB, uma infecção comum em gestantes associada ao risco aumentado de aborto espontâneo (KALIA; SINGH; KAUR, 2020; AZEVÊDO et al, 2021).

2.4 Mecanismos fisiológicos, patológicos e imunológicos do aborto espontâneo associado a infecções genitais

Processo gestacional fisiologicamente evolui por algumas etapas: fecundação, segmentação e clivagens, são fases que antecedem o aglomerado de células- blastócito (MOREIRA, 2014). O início da gestação é marcado principalmente pela implantação do embrião na parede uterina, ou seja, blastócito em contato com o endométrio (ZHAI et al., 2022). Blastocélio, blastômeros e botão embrionário são constituintes do blastócito (ROSSANT; THAN, 2022). A chegada na cavidade uterina acarreta um aumento de fluido local, divisão dos blastômeros em trofoblasto e embrioblasto e surgimento dos anexos embrionários (MOREIRA,2014).

O processo trofoblástico envolve células periféricas (trofoblásticas) auxiliando na formação da placenta e células centrais (embrioblásticas) contribuindo com a origem do embrião (BENZECRY; OLIVEIRA, 2001). O surgimento da placenta ocorre mediante a invasão e diferenciação do trofoblasto em citotrofoblasto e sincitiotrofoblasto, este respectivamente penetra no endométrio e envolve o embrião, que está em processo de formação dependendo das interações celulares maternas (MOREIRA, 2014; KNÖFLER et al., 2019). Essas células trofoblásticas também atuam na função de proteger a mãe e o feto contra agentes infecciosos e tóxicos, garantindo assim a implantação adequada (BENZECRY; OLIVEIRA; LEMGRUBER, 2001; ROSSANT; THAN, 2022).

A gestação expressa condições anti-inflamatórias e pró-inflamatórias durante todo o seu progresso. Dependendo do seu estágio, a atividade inflamatória é reduzida alterando o perfil de resposta das células TH1 para as TH2 (BENZECRY; OLIVEIRA; LEMGRUBER, 2001). As

células TH1 tem ação inflamatória e induzem a necrose placentária. Mas, a partir do momento que muda-se o perfil para TH2, essas atuam promovendo a proliferação e diferenciação de células trofoblásticas e a placentação, sendo também essencial para essa dicotomia TH1:TH2 (WATANABE et al., 2014; FIUZA, MORAIS, 2017).

O sistema imune da gestante desenvolve uma tolerância imunológica que permite a evolução e progressão fetal, isso ocorre por meio das células trofoblásticas que reconhecem o blastócito com a decídua materna (WANG et al., 2021). O trofoblasto participa do recrutamento de células imunológicas, produção de citocinas (CXCL12, CXCL8) e quimiocinas (CCL2) e defesa contra infecções, com o alistamento de monócitos, neutrófilos, células T reguladoras (TREG), e células natural killer (NK) (HUSSAIN et al. 2022; MOR; CÁRDENAS, 2010; TRUE et al., 2022).

As células NK possuem ações no remodelamento vascular decidual e função placentária, produzem IL-15 e TGF- β , estas estão também envolvidas na produção de outras citocinas como IL-6 e IL-8, na variação de células CD4+ e na expressão de moléculas de adesão. (WATANABE et al., 2014; GUERRERO et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2021). As células TREG encontram-se aumentadas produzindo IL-10 e agindo na manutenção gestacional, sendo atraídas para o trofoblasto pela gonadotropina coriônica (WANG et al., 2021).

Respostas imunológicas promovidas pela gestação atuam na defesa contra invasão patogênica e lesão tecidual causada por bactérias, vírus etc (GIAKOUMELOU et al., 2016). Os receptores tipo toll (TLRs) são expressos pela placenta e estão presentes nos macrófagos e linfócitos (HUSSAIN et al., 2022). A expressão de TLR 3, TLR 7, TLR 8 e TLR 9 são encontradas em casos de infecções virais, possuindo ações antimicrobianas (MOR; CÁRDENAS, 2010). Contudo, alguns patógenos são capazes de modular a tolerância imunológica da gestante, escapando das células de defesa (WATANABE et al., 2014). A infecção placentária pode elevar os níveis de citocinas inflamatórias como TNF- α , INF- γ , IL-12 e a IL-6, resultando em danos gestacionais (MOR; CÁRDENAS, 2010; HUSSAIN et al., 2022). Por exemplo, estudo recente demonstrou que *Ureaplasma parvum* causou aumento dos níveis citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e ativação da via apoptótica extrínseca causando aborto espontâneo (OLIVEIRA et al., 2021).

Aborto espontâneo ocasionado pelo processo infeccioso genital decorre da invasão patogênica por via ascendente, descendente e/ou pela via hematogênica (PERETZ et al., 2020). A via mais comum ocorre pela ascendência da infecção do colo do útero atingindo o líquido amniótico e o feto, estimulando respostas imunológicas (GIAKOUMELOU et al., 2016; BAYRAKTAR et al., 2010). Infecções maternas que se propagam até o espaço coriodecidual podem evoluir para sepse, induzindo sintomas como hipotermia, hemorragia genital e cólicas

uterinas, bem como consequências envolvendo choque séptico, distúrbio hemorrágico, corioamnionite e AE (SWEENEY et al., 2017; KIKHNEY et al., 2017).

Uma infecção ativa que ascende para a unidade materno-fetal compromete a implantação e placentação (GIAKOUMELOU et al., 2016). O processo infeccioso desperta a infiltração de células mononucleares como macrófagos e linfócitos T, estimula a produção de prostaglandinas, além do influxo difuso de neutrófilos (KIKHNEY et al., 2017). A expressão de TLR 5 e TLR 6 também são encontradas em aborto séptico (SWEENEY et al., 2017). Os TLR's ativam a via de NF- κ B e leva à produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α (OLIVEIRA et al., 2021). O aumento das interleucinas e prostaglandinas, juntamente com a infiltração neutrofílica enfraquecem a membrana, promovendo rompimento prematuro e posterior AE (CAO et al. 2018).

Microrganismos associados a VB desencadeiam cascatas de alterações imunológicas que comprometem a microbiota vaginal e afetam o processo gestacional (ISIK et al., 2016). VB esteve relacionada a indução da produção de enzimas líticas (fosfolipases e proteases), formação de ácido araquidônico, estímulo de IL-6, IL-8, lise de fosfolipídios e síntese de PG's (Figura 1); fatores estes que durante a gestação contribuem com a redução da resistência cervical, aumentando o risco de AE (GIAKOUMELOU et al., 2016).

Mycoplasma e *Ureaplasma spp.* ao infectarem âmbitos genitais tem demonstrado uma associação com parto prematuro (LARSEN; HWANG, 2010), ruptura de membrana (MATASARIU et al., 2022) e aborto espontâneo (PERETZ et al., 2020). *Mycoplasma* apresentou aumento da resposta inflamatória, trombogênese e apoptose celular, por elevar TNF- α e ativar a síntese de óxido nítrico sintase, danificando as células endoteliais com risco de isquemia ao embrião, além de induzir PG's. (CAO et al., 2018).

Estudos recentes demonstraram associação da infecção por UP ao AE (TANTENGCO et al., 2022). UP apresentou uma regulação negativa de genes relacionados a resposta imune de mulheres que evoluíram com AE, elevação da IL-6, IL-10, alteração na relação TH1:TH2 e infiltração de neutrófilos (OLIVEIRA et al., 2021). Fatores pró-inflamatórios têm contribuído com aumento do ânion superóxido (Figura 1), modificando o equilíbrio dinâmico oxidativo das gestantes (HUSSAIN et al., 2022; ZEJNULLAHU; ZEJNULLAHU; KOSUMI, 2021). O processo inflamatório proveniente da infecção eleva a tensão do oxigênio molecular e produção das espécies reativas de oxigênio, aumentando a demanda da atividade das enzimas antioxidantes (HUSSAIN et al., 2022). Infecções virais modulam a ativação da via Nrf2, prejudicando a ativação das enzimas antioxidantes (ALMEIDA, 2020). Mas, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação das infecções bacterianas e sua relação com o estresse oxidativo, no contexto do aborto espontâneo (Figura 1).

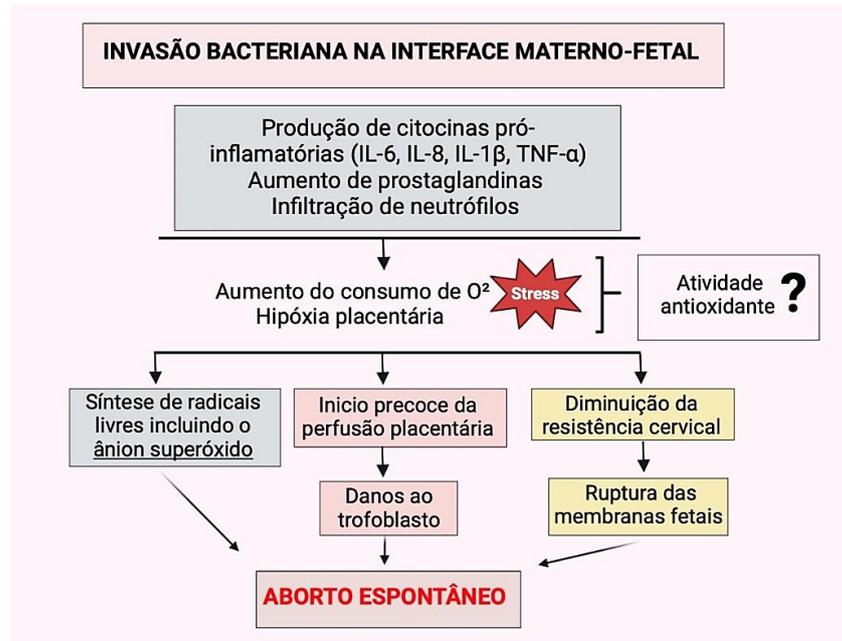


Figura 1- Invasão bacteriana na interface materno-fetal.

(Fonte: própria, Biohender).

2.5 Alterações moleculares e bioquímicas das principais moléculas antioxidantes e oxidantes no aborto espontâneo associado a infecções genitais

Equilíbrio dinâmico oxidante envolve espécies reativas de oxigênio (ROS) e sistemas de defesa antioxidante (SIES, Helmut, 2015). Em níveis fisiológicos, compete a estes a modulação e proliferação do ciclo celular, ativação da angiogênese e fagocitose (ZEJNULLAHU; ZEJNULLAHU; KOSUMI, 2021). Alterações nas ROS ou no sistema de defesa antioxidante comprometem a homeostase oxidativa, resultando em processos patológicos como doença cardiovascular, diabetes, envelhecimento, complicações na gravidez, como o próprio aborto espontâneo (HUSSAIN et al., 2022).

Estresse oxidativo (EO) decorre pelo desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou eliminação prejudicada desses (BARBOSA et al., 2010). Durante os períodos da gestação o EO é necessário para a evolução da formação fetal, envolvendo a diferenciação das células trofoblásticas, circulação materno-fetal com suporte de nutrientes e oxigênio, e sistema imunológico (HUSSAIN et al., 2022). Quando esse processo é submetido a uma alta tensão de oxigênio, os resultados gerados são prejudiciais, comprometendo a placentação, causando, assim, danos celulares e moleculares (HE et al., 2017).

Efeitos prejudiciais como os danos moleculares provenientes da alta tensão de oxigênio e geração das ROS resultam em alterações na expressão gênica, instabilidade genômica, diminuição

da proliferação celular, danos ao DNA do embrião e morte celular (SCHROOTS et al., 2018). A proliferação de leucócitos e a função imune deprimida são consequências das quantidades insuficientes de ROS (HE et al., 2017).

No primeiro trimestre de gestação os antioxidantes são escassos no sincitiotrofoblasto, resultando em vulnerabilidade ao dano oxidativo, adaptando-se apenas em baixas quantidades de ROS (SCHROOTS et al., 2018; ALJASER et al., 2021). A expressão da atividade antioxidante aumenta conforme a progressão da idade gestacional (MIYAGAMI et al., 2013). Entretanto, processos inflamatórios durante a gravidez, especialmente no primeiro trimestre, aumentam a tensão de oxigênio molecular (O_2), resultando em excesso de ROS e defesa insuficiente (HUSSAIN et al., 2022; MYATT; CUI, 2004).

Espécies reativas de oxigênio são produtos finais da respiração celular aeróbica, produzidos através do vazamento de elétrons das cadeias de transporte na mitocôndria e retículo endoplasmático para o O_2 (ALJASER et al., 2021), que envolvem radicais tóxicos (ânion superóxido, radical hidroxila, radical hidroperóxido, óxido nítrico etc) e espécies não radicais (peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso etc) que podem induzir danos celulares (BARBOSA et al., 2010; MYATT; CUI, 2004). A placenta produz diversas ROS, incluindo óxido nítrico, monóxido de carbono e peroxinitrito, que tem efeitos como a proliferação, diferenciação trofoblástica e reatividade vascular (POSTON; RAIJMAKERS, 2004; HUSSAIN et al., 2022).

Cadeia de transporte de elétrons corresponde à cinco complexos proteicos, localizados na membrana interna mitocondrial que estão associados ao processo de fosforilação oxidativa (HE et al., 2017). Complexo I sendo representado pelo NADH (Dinucleótido de nicotinamida e adenina) e ubiquinona oxidoreductase, complexo II pelo succinato desidrogenase, flavina adenina dinucleótido (FAD para $FADH_2$), complexo III pelo citocromo bc1, complexo IV por citocromo c oxidase e complexo V pela ATP sintase (BARBOSA et al., 2010). O complexo I e III são os que mais produzem ROS, respectivamente, contribui com o transporte de elétrons na matriz e o III além de transportar pela matriz, também transporta no citoplasma, ambos formando o radical superóxido (HE et al., 2017) (Figura 2).

O ânion superóxido (O_2^-) é a ROS mais importante, não é difusível através das membranas celulares, necessitando da redução por cobre/zinco superóxido dismutase (Cu/Zn-SOD) ou manganês superóxido dismutase (Mn-SOD) chegando no produto final do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GHNEIM et al., 2016). H_2O_2 não é considerado um radical tóxico, porém ao interagir com a reação de Fenton (Fe^{3+} reduzido Fe^{2+}) pode formar a radical hidroxila ($OH\bullet$), portanto a glutatona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT) dismutam o H_2O_2 resultando em O_2 e água (H_2O)

(HUSSAIN et al., 2022). Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, GPx e CAT são enzimas antioxidantes que atuam em conjunto na defesa oxidativa (AL-SHEIKH et al., 2019) (Figura 2).

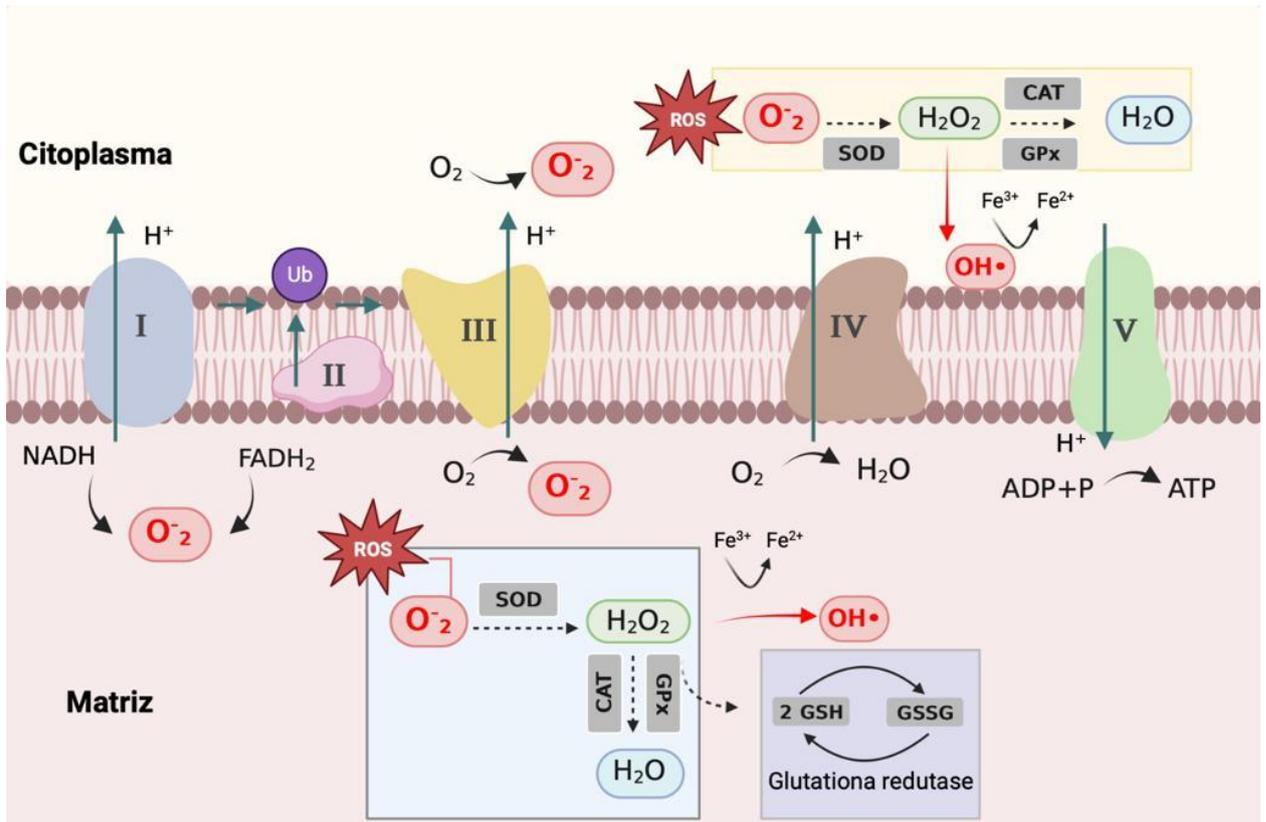


Figura 2- Cadeia de transporte de elétrons. Cadeia de transporte de elétrons na produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) e participação das enzimas antioxidantes. Complexos proteicos (I, II, III, IV e V) da cadeia de transporte de elétrons (CTE) da mitocôndria na produção das ROS e participação das enzimas antioxidantes na dismutação das ROS. Os complexos I e II criam eletronegatividade através da oxidação do Dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH) e flavina adenina dinucleótido (FADH), estimulando os complexos I, III e IV a liberarem prótons, criando um gradiente eletroquímico. O complexo V é responsável pela formação de adenosina trifosfato (ATP). Os elétrons também podem reagir com os complexos dando origem ao radical superóxido (O_2^-) na matriz mitocondrial e no citoplasma, como no caso do complexo III. O O_2^- sofre ação das enzimas antioxidantes. A dismutação do O_2^- em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ocorre através da superóxido dismutase (SOD). Em seguida, o H_2O_2 é dismutado pela catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx) chegando ao produto final da água (H_2O) e oxigênio (O_2). A GPx atua também por meio da glutatona reduzida (GSH) formando H_2O e glutatona oxidada (GSSG). A glutatona redutase (GR) transforma GSSG, por meio de NADPH, em GSH, permitindo a atuação da GPx. Caso o H_2O_2 sofra interação com a reação de Fenton (Fe^{3+} e Fe^{2+}), origina a radical hidroxila ($OH\cdot$), um radical extremamente tóxico as células. (Fonte: própria, Biohender).

O sistema de defesa antioxidante reage para limitar os níveis intracelulares das ROS e controlar a ocorrência de danos decorrentes (GHNEIM; ALSHEBLY, 2016). Atuam através dos sistemas de prevenção, sistemas varredores e sistemas de reparo, sendo de maneira exógena (não enzimático), onde ocorre por meio da vitamina A, E e C, polifenóis etc (BARBOSA et al., 2010).

O sistema endógeno (enzimático) corresponde à primeira linha de defesa incluindo a Cu/Zn SOD, Mn SOD, a CAT e a GPX, que juntas com os cofatores essenciais (manganês, cobre, zinco, selênio) exercem a função de controlar efeitos oxidantes causados pelas ROS (AL-SHEIKH et al., 2019). Estudos demonstraram uma redução na expressão de antioxidantes (CAT, SOD e GPx) em mulheres com aborto (ZEJNULLAHU; ZEJNULLAHU; KOSUMI 2021; GHNEIM et al, 2016).

A SOD é considerada a primeira linha de defesa antioxidante endógena, atuando na redução do O_2^- em H_2O_2 . Em humanos, a SOD é classificada em: (i) citosólica tendo como cofator Cu e Zn para estabilização molecular (Cu/Zn- SOD); (ii) mitocondrial possuindo o Mn em sua composição (Mn-SOD); (iii) e a SOD extracelular (BARBOSA et al., 2010). CAT atua na dismutação do O_2^- em H_2O_2 , sendo essencial na tolerância ao EO por não correr risco de saturação pelo H_2O_2 , neutralizando essa espécie não radical em ação conjunta com a GPx (HE et al., 2017).

GPx é tida como a principal enzima de proteção celular, quando submetida a baixas concentrações de H_2O_2 (HE et al., 2017). Atuando também na catalisação de hidroperóxidos através da glutathiona reduzida (GSH) formando H_2O e glutathiona oxidada (GSSG). Neste contexto, a reciclagem da GSH a partir da GSSG um processo realizado pela glutathiona redutase (GR), considerada de muita relevância, por atuar na prevenção da peroxidação lipídica (BARBOSA et al., 2010) (Figura 2).

O acometimento da homeostase macromolecular pela peroxidação lipídica, alterações proteicas e oxidação do DNA, são consequências do desequilíbrio do EO e da sua relação com processos patológicos (ZEJNULLAHU; ZEJNULLAHU; KOSUMI, 2021). Portanto, biomarcadores oxidativos são necessários para medir o estresse (BARBOSA et al, 2010). Dentre estes estão: o H_2O_2 , substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), malondialdeído (MDA), teor de carbônila proteica, 8-hidroxiguanosina etc (AL-SHEIKH et al., 2019). Estudos relataram elevados níveis de MDA (HUSSAIN et al., 2022) e H_2O_2 no tecido placentário de mulheres que tiveram perda gestacional (ZEJNULLAHU; ZEJNULLAHU; KOSUMI 2021). Produtos da peroxidação lipídica estiveram aumentados em mulheres com desfechos gestacionais adversos (TARAVATI; TOHIDI, 2018; HUSSAIN et al., 2021). Outra fonte de superóxido considerada a principal nas primeiras semanas de gestação é a nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase (NADPH/NOX). Foi relatado níveis elevados de NADPH oxidase na placenta quando exposta a situação de baixa tensão de oxigênio (HERNANDEZ et al., 2019).

O fator nuclear eritróide 2 (Nrf2) é considerado um dos principais reguladores do elemento da resposta antioxidante (ARE) devido a sua alta sensibilidade ao EO (SIES, Helmund, 2015). Nrf2 é expresso por diversos órgãos, incluindo a vasculatura. Está ligado a proteína 1 associada a ECH do tipo Kelch (Keap1), sendo compactado a leucina. O Keap 1 funciona como sensor de estresse

oxidativo (EGBUJOR et al., 2022). Geralmente encontrado no citosol em concentrações baixas, e devido ao EO, o Nrf2 se desloca para o núcleo promovendo a transcrição de diversos genes antioxidantes (HARRIS; HASSEN, 2012).

As respostas geradas pelo Nrf2 envolvem ações anti-inflamatórias, antiapoptóticas e efeitos antitumorais, essas respostas surgem a partir da interação do Nrf2 com as ROS, que visam proteger os tecidos celulares (CHEN et al., 2015; SIES, 2015). Estudos demonstraram a ação do Nrf2 no desenvolvimento embrionário promovendo proteção contra o EO, mantendo um equilíbrio redox, permitindo assim a morfogênese normal do embrião (HARRIS; HASSEN, 2012). Por conseguinte, o fator Nrf2 atua na gestação fornecendo proteção durante o desenvolvimento fetal, contra fatores oxidativos estressantes, mas ainda tem respostas incompletas (EGBUJOR et al., 2022).

A inflamação possui relação com a ativação do Nrf2 (SAHA et al., 2020), estudiosos relataram a infecção viral atuando na ativação do fator de transcrição Nrf2 (ALMEIDA, 2020), mas, sobre as possíveis interferências das infecções bacterianas ainda não foram totalmente compreendidas. Cofatores das enzimas antioxidantes (KESHAVARZ et al., 2017) e alterações hormonais (PEREIRA, 1996) também apresentaram relação com a atividade antioxidante. Como a gestação é um processo que demanda atividade anti-inflamatória e pró-inflamatória (ZEJNULLAHU; ZEJNULLAHU; KOSUMI, 2021), respostas imunológicas e estresse oxidativo (HUSSAIN et al., 2021) durante os períodos de formação fetal, é interessante entender quais as circunstâncias que desequilibram a homeostase gestacional, comprometendo o estado oxidativo por meio de uma infecção genital bacteriana como possível causa de aborto espontâneo.

3 JUSTIFICATIVA

O aborto espontâneo possui diversas causas, e as infecções genitais têm sido um dos fatores associados a esse desfecho da gestação (BRAZ et al., 2020; GIAKOUMELOU et al., 2016; OLIVEIRA; CARNEIRO, 2020)., infecções essas que podem ser causadas por vírus, bactérias e parasitas (PEDER et al. 2018). O processo infeccioso genital que persiste na microbiota vaginal, ascende para cavidade útero-placentária, com respostas inflamatórias e imunológicas exacerbadas, desequilibrando a homeostase gestacional e o status redox (HUSSAIN et al., 2022; OLIVEIRA et al., 2021). A prevalência de 4,7 milhões de mulheres que sofreram ao menos um aborto por ano é uma preocupação pública (DINIZ; MEDEIROS; MADEIRO, 2017).

Um estudo anterior que envolveu a investigação de causas do aborto espontâneo provocado por infecções genitais, identificou a prevalência de 66,3% de *Ureaplasma parvum* no tecido placentário de mulheres que evoluíram com aborto espontâneo (OLIVEIRA et al., 2020), em um estudo seguinte identificou que a infecção por *Ureaplasma parvum* altera o estado imune tolerogênico de mulheres que evoluíram com aborto espontâneo (OLIVEIRA et al., 2021). Incentivando o desenvolvimento da pesquisa em questão, que tem como principal objetivo: Avaliar marcadores de estresse oxidativo no contexto do aborto espontâneo associado a infecção por *Ureaplasma parvum*.

4 OBJETIVOS

4.1.1 Objetivo Geral

Avaliar marcadores de estresse oxidativo no contexto do aborto espontâneo associado a infecção por *Ureaplasma parvum*.

4.1.2 Objetivos específicos

- Quantificar o grau de peroxidação lipídica (TBARS) e proteína carbonilada no tecido placentário de mulheres que apresentaram ou não aborto espontâneo;
- Avaliar a atividade de enzimas antioxidantes (CAT, SOD e GPx) no tecido placentário de mulheres que apresentaram ou não aborto espontâneo;
- Investigar a razão de SOD/CAT e SOD/GPx no tecido placentário de mulheres que apresentaram ou não aborto espontâneo;
- Verificar se a participação de *U. parvum* contribui com o desbalanço do estado oxidativo;
- Traçar o perfil do nível de expressão de genes antioxidantes (CAT, Cu/Zn SOD, Mn SOD, GPx, Nrf2) no tecido placentário de mulheres que apresentaram ou não aborto espontâneo;
- Avaliar a razão da expressão gênica de CuZn SOD/CAT, Mn SOD/CAT, CuZnSOD/GPx e Mn SOD/GPx no tecido placentário de mulheres que apresentaram ou não aborto espontâneo;
- Avaliar os níveis de nitrito em amostras de tecido placentário de mulheres que apresentaram ou não aborto espontâneo.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo é delimitado como corte transversal. Para as análises experimentais foram utilizadas amostras biológicas (tecido placentário) que foram obtidas no estudo prévio citado (OLIVEIRA et al., 2020). Participaram do estudo 89 mulheres que sofreram aborto espontâneo (grupo aborto) e 20 mulheres que tiveram parto a termo (grupo controle). A coleta das amostras ocorreu entre julho de 2017 e agosto de 2018, no Hospital Esau Matos no município de Vitória da Conquista. Considerada uma unidade de saúde referência no atendimento materno-infantil da região sudoeste do estado da Bahia.

As participantes incluídas no estudo foram selecionadas seguindo critérios como: mulheres que foram hospitalizadas devido motivo de aborto espontâneo (Grupo aborto) e mulheres que evoluíram para o parto a termo (Grupo controle). Tendo como critérios de inclusão para o grupo 1: idade superior a 18 anos e inferior a 40 anos, gestação superior a 10 semanas, ser sexualmente ativa, e não ter usado antibiótico a pelo menos duas semanas antes do aborto. Como critério de inclusão para o grupo 2: idade entre 18 e 40 anos, parto entre 37 e 41 semanas e que não usaram antibiótico a pelo menos duas semanas antes do parto. Os critérios de exclusão adotados foram: mulheres que não se encaixaram no perfil estabelecido para os dois grupos e apresentaram imunodeficiência confirmada, doenças crônicas (diabetes, hipertensão e desordens endócrinas), abortos recorrentes devido a anormalidades anatômicas e abortos induzidos pela paciente.

Por se tratar de um estudo de extensão, o projeto principal foi submetido e aprovado ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos e todas as análises e estudos foram realizadas devido essa aprovação já concebida pelo CAE nº 56639916.8.0000.5556. As participantes do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (ANEXO I).

5.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

A coleta de dados foi dividida em dois períodos, sendo o primeiro a coleta de informações e dados clínicos dos prontuários das pacientes atendidas/hospitalizadas por aborto e parto a termo, nos casos dos abortos foi necessário a confirmação por exame de imagem (ultrassom) considerando os critérios de inclusão. O segundo período ocorreu por meio da entrevista, onde foi aplicado um questionário, a fim de identificar o perfil epidemiológico das mulheres envolvidas no estudo, com questões relacionadas ao perfil sociodemográfico, hábitos de vida, antecedentes

patológicos, características menstruais, histórico sexual e obstétrico, características da gestação atual e sintomas apresentados nos últimos meses (ANEXO II).

Amostras do tecido placentário foram coletadas em duplicata. Nas mulheres que apresentaram aborto, após a preparação para curetagem o obstetra do atendimento realizou a coleta do tecido por espécuro. Nas mulheres que tiveram parto a termo (grupo controle) as amostras foram obtidas após a expulsão natural, utilizando álcool 70% para enxugar toda a parte fetal. Posteriormente, as membranas amnióticas foram rompidas com lâminas de bisturis estéreis e um fragmento interno foi coletado para evitar a contaminação do canal vaginal.

Para transportar as amostras coletadas ao laboratório de Microbiologia e Imunologia do Instituto Multidisciplinar em Saúde, da Universidade Federal da Bahia/ Campus Anísio Teixeira, elas foram armazenadas em 5 mL de PBS (AHMADI et al, 2016) e refrigeradas a (4°C) em caixa térmica. Ao chegarem ao laboratório o volume de 5 mL foi aliqotado em microtubos (eppendorfs), com 1 ml em cada. Para o presente estudo foram utilizados fragmentos da placenta, sendo o primeiro fragmento armazenado a -20°C para extração de DNA, segundo fragmento armazenado em -80°C para extração de RNA e conversão de cDNA para análise da expressão de genes associados ao estresse oxidativo, e o terceiro fragmento armazenado em -80°C para preparo de homogenato e avaliação do status redox.

5.2 AVALIAÇÃO DO STATUS REDOX E PERFIL INFLAMATÓRIO

5.2.1 Preparo do Homogenato

Os tecidos placentários foram recortados em pequenos pedaços (~0,05 g), alocados em microtubos em meio PBS, sendo submetidos ao homogeneizador mecânico - DREMEL, model 300, 33000/min, 125W (Dremel, México, M.X., EUA). Em seguida, foram centrifugados a 10.000 rpm por 10 min, após a centrifugação o sobrenadante foi realocado em um novo microtubo e inserido meio PBS para atingir o volume final de 1,5 ml. Após esses processos, ocorreu o armazenamento dos homogenatos das amostras em -80°C para posteriores ensaios de avaliação do status redox.

5.2.2 Determinação da Concentração de Proteínas Totais

As concentrações de proteínas nos homogenatos dos tecidos placentários utilizados para os ensaios de peroxidação lipídica e atividade enzimática foram determinadas em espectrofotômetro (SP 2000 UV, BELR Photonics, Brasil) utilizando o reagente de Bradford (Sigma-Aldrich, EUA) e a soro-albumina bovina foi utilizada como padrão da curva. Sendo assim, foram adicionados na placa de 96 poços 15 μ L de cada amostra, 60 μ L de tampão TrisHCl e 250 μ L de Bradford. Em seguida as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 45 min e mensuradas em espectrofotômetro na absorbância de 550 nm.

5.2.3. Níveis de Nitrito

A dosagem de nitrito, um produto do óxido nítrico, foi baseada na reação de Griess. Em placas de 96 poços foi adicionado 50 μ L do homogenato do tecido placentário, 50 μ L da sulfanilamida (sulfanilamida 1% dissolvida em 10 ml do ácido fosfórico 5%), após a pipetagem a solução foi incubada por 10 min/25°C. Em seguida, foi adicionado 50 μ L de naitiletilenodiamina (diluído 0,010g de Naftil em água miliQ) e incubado por 10 min/25°C. A leitura foi determinada em 560 nm.

5.2.4 Peroxidação Lipídica

A peroxidação lipídica foi avaliada por meio da mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no homogenato dos tecidos placentários, utilizando o método descrito por Draper e colaboradores (1993) com adaptações. Resumidamente, 100 μ L do homogenato foram misturados a 100 μ L de ácido tricloroacético 10%, e 800 μ L de ácido tiobarbitúrico (diluído em 20ml de ácido acético 20%, pH 3,5). A mistura reacional foi homogeneizada em vórtex, e incubada por uma hora em água fervente (banho maria). Em seguida, os tubos foram transferidos para um banho de gelo a fim de interromper a reação. Após 10 minutos, as amostras foram centrifugadas a 1600 rpm por 10 min a 4°C (Z 36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha), e o sobrenadante foi lido em espectrofotômetro (SP 2000 UV, BELR Photonics, Brasil) no comprimento de onda de 535 nm. Os níveis de TBARS foram calculados com base na curva feita com o padrão de malondialdeído (Cayman Chemical, EUA). A concentração de TBARS (μ M) no tecido placentário foi normalizada pela concentração de proteínas (mg/mL) e expressa em μ M/mg/mL de proteína.

5.2.5 Proteínas carboniladas

O nível de proteínas carboniladas nos homogenatos do tecido placentário foi estimada pelo método descrito por Soglia et al. (2016) adaptado de Levine et al. (1990). Os tecidos placentários foram homogeneizados em solução gelada de KCl 0,15M (100mg/mL) e centrifugado (Z 36 HK, Hermle-Labortechnik, Alemanha) a 1.600xg por 10 min a 4 °C para coleta do sobrenadante. Em seguida, 100 µL do sobrenadante foi misturado a 1 mL de TCA 10% e centrifugado a 5000xg por 5 min. O sobrenadante foi descartado, e 400 uL de SDS a 5% foram adicionados ao pellet. A solução foi incubada em temperatura de fervura durante 10 min. As amostras foram então tratadas com DNPH 0,3% em HCl 3M, ou apenas com HCl 3M para o branco da reação específico para cada amostra. Após 30 min de incubação, 400 uL de TCA 40% foram adicionados para precipitação das proteínas, e as amostras foram centrifugadas a 5000xg por 5 min. Após a remoção do sobrenadante, o pellet foi lavado três vezes com 1 mL de etanol:acetado de etila (1:1), e cada lavagem foi seguida da centrifugação a 10.000xg por 5 min para isolamento e descarte do sobrenadante. Após a última lavagem, o pellet foi dissolvido em 1,5mL de hidrocloreto de guanidina 6 M em NaH₂PO₄ 20 mM, pH 6,5. Após incubação overnight a 4°C, a absorbância das amostras foi lida nos comprimentos de onda de 280 nm e 370 nm em espectrofotômetro (SP 2000 UV, BEL® Photonics, Brasil) para quantificação da concentração de proteínas e carbonilação, respectivamente. A concentração de proteínas carboniladas foi calculada pela fórmula descrita a seguir, e os resultados foram expressos como nmol/mg de proteína.

$$\text{Carbonilação} = \frac{|370| - |370| (\text{branco})}{22.000 \times [|280| - (|370| - |370| (\text{branco})) \times 0,43] \times 10^6} \times 10^6$$

5.2.6 Atividade da Enzima Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi mensurada a partir da taxa de decaimento de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na absorbância de 240 nm (AEBI, 1984). Em síntese, inicialmente ocorreu a diluição do H₂O₂ (6 ml de H₂O₂ para 4 ml de água), em seguida ocorreu o preparo do Mix reacional (25 ml de tampão TrisHCL, pH: 7,4 adicionado em 40 µL de H₂O₂ à 30%). Para leitura em espectrofotômetro, foi adicionado em cubeta de Quartzo 1800 µL de Mix reacional + 160 µL de tampão TrisHCL + 40 µL do homogenato da amostra) e as absorbâncias foram imediatamente determinadas a cada 10 segundos, durante um minuto a 240 nm (SP 2000 UV, BELR Photonics, Brasil). O tampão fosfato foi utilizado como branco para zerar o aparelho. A atividade da CAT foi determinada pela diminuição da absorbância em 240 nm causada pelo desaparecimento do H₂O₂.

5.2.7 Atividade da Enzima Glutathiona Peroxidase (GPx)

A medida da atividade da enzima GPx foi realizada de acordo método proposto por Paglia e Valentine (1967), com adaptações. O método se baseia na oxidação da glutathiona reduzida (GSH), catalisada pela GPx, acoplada a reciclagem da glutathiona oxidada (GSSG) através da reação catalisada pela enzima glutathiona redutase (GR) que utiliza o NADPH como cofator. O decréscimo na absorbância medida a 340 nm durante a oxidação do NADPH é indicativo da atividade da GPx. Foram pipetados em cubeta de Quartzo 400 μL do mix reacional (0,25 mM NADPH, 2,1 mM de GSH, 0,5 U/mL de GR e 1 mM de azida sódica) + 300 μL de tampão TrisHCl + 250 μL de homogenato diluído em tampão de ensaio (1:10) + 50 μL de H_2O_2 0,2mM, utilizado como substrato da reação. A azida sódica foi adicionada ao meio para inibir a catalase que também utiliza o peróxido de hidrogênio como substrato. A decomposição do NADPH foi monitorada em espectrofotômetro (SP 2000 UV, BELR Photonics, Brasil) a 340 nm. Foram realizadas leituras consecutivas a cada 15 segundos durante 6 minutos.

5.2.8 Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A técnica para medir a atividade da enzima SOD, baseia-se na sua capacidade de inibir a auto-oxidação do pirogalol, de acordo com Marklund e Marklund (1974). Portanto, quanto maior a concentração de SOD na amostra, menor é a auto-oxidação do pirogalol. A reação ocorreu em uma placa de 96 poços, sendo pipetado na placa 99 μL de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0) + 30 μL de amostra, 6 μL de MTT (1,25mM) e 15 μL de pirogalol (100 μM). Para o branco foi pipetado 144 μL de tampão fosfato (50 mM) e 6 μL de MTT (1,25 mM) e para o padrão 129 μL de tampão fosfato (pH 7, 50 Mm) + 6 μL de MTT – (1,25 mM) e 15 μL de pirogalol (100 μM). Em seguida, a placa foi incubada por 5 minutos em estufa a 37°C. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 550 nm. Os resultados foram expressos em U /mg de proteína, onde uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima necessária para inibir 50% da redução do MTT.

5.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DE NRF2, CAT, GPx, SOD Cu/Zn E SOD Mn, POR PCR EM TEMPO REAL (PCR Real- time)

5.3.1 Extração de RNA

A extração de RNA das amostras do tecido placentário iniciou a partir de 1ml da amostra. Em microtubos, estes volumes foram centrifugados a 10.000 rpm por 5 min a 4°C, e retirado o sobrenadante. As suspensões das amostras foram incubadas com 800 µL de Trizol por 5 min a temperatura ambiente, e adicionado 160 µL de clorofórmio, passando por agitação com as mãos por 15 seg. Em seguida, foram incubados novamente durante 3 min em temperatura ambiente e, logo após, foram centrifugadas a 14.000 rpm por 15 seg a 4°C. Após a centrifugação, ~600 µL do sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, onde foi adicionado 250 µL de etanol (96%) e, em seguida, foram homogeneizados em vórtex por 15 seg. Após essa etapa, foram incubados por 5 min, transferidos para coluna ~600 µL e submetidos a centrifugação a 14.000 rpm por 1 min. As demais etapas seguiram o protocolo do kit Cellco Biotec Vírus RNA+DNA preparation kit (Cellco, São Carlos, S.P., Brasil).

5.3.2 Quantificação do RNA

As amostras de RNA extraído foram submetidas a quantificação em NanoDrop. Em seguida foram armazenadas em -80°C para conversão em cDNA.

5.3.3 Conversão em cDNA

Os cDNA das amostras do tecido placentário foram obtidos de acordo o protocolo cDNA Synthesis Kit with RNase Inhibitor (Cellco, São Carlos, S.P., Brasil).

5.3.4 PCR em tempo real

Após a síntese do cDNA, o mesmo ficou armazenado em -20°C. As expressões gênicas dos marcadores no tecido placentário foram quantificadas pela PCR quantitativa em tempo real (PCR Real-time). A PCR real-time é uma técnica utilizada para detectar os produtos da PCR a cada ciclo da reação, que se utiliza de uma molécula quelante fluorescente, o SYBR GREEN, altamente específica ao DNA. A análise da expressão gênica através dessa técnica é baseada nos valores de

limiar de detecção (*cycle threshold* - Ct), que representa o número mínimo de ciclos necessário para registrar o primeiro sinal de fluorescência emitido superior a fluorescência basal, o que ocorre durante a fase exponencial da amplificação. Para a reação, foi utilizado um protocolo padrão, mantendo as concentrações usuais de reagente num volume final de 25µl: 2,0µl de cDNA e 23µl de uma solução mix composta por 121,8µl de RNase free water, 18,7µl do primer forward, 18,75µl do primer reverse (diluição dos primers forward e reverse para obter a solução de estoque de cada primer, para isso foi realizado o cálculo: valor de nmoles x 1000 / 100) (Invitrogen, Brasil) e por 187,5µL de SYBRR GREEN Master Mix (Applied Biosystems, Warrington WA, UK). O gene que foi utilizado como controle interno foi o Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) sendo uma referência comumente utilizada para ensaios de quantificação (ADEOLA, FOWOTADE., 2018). Na Tabela 1 apresenta-se os genes e as sequências utilizadas na quantificação.

Tabela 1 – Primers e sequências usadas nas análises de expressão gênica das enzimas: CAT, GPx, Cu/Zn SOD, Mn SOD e Nrf2.

PRIMERS	ENZIMAS	SEQUÊNCIA	REFERÊNCIAS
NRF2Fwd	Nrf2	CAGCGACGGAAAGAGTATGA	XIONG et al., 2015.
NRF2Rev	Nrf2	TGGGCAACCTGGGAGTAG	
CatalaseFwd	CAT	AGAGGAAACGTCTGTGTGAGAACA	ALVES, 2009.
CatalaseRev	CAT	TGACCGCTTTCTTCTGGATGA	
GluPeroxF	GPx	TGTGCCCTACGCAGGTAC	
GluPeroxR	GPx	AGCTGGGCCCTTGAGACAG	
SODCu/ZnF	Cu/ZnSOD	TGGTGGTCCATGAAAAAGCA	
SODCu/ZnR	Cu/ZnSOD	CCAGCGTTTCCTGTCTTTGTACT	
SODMnF	MnSOD	GGCCTGATTATCTAAAAGCTATTTGG	
SODMnR	MnSOD	CGATCGTGGTTTACTTTTTGCA	

Fonte: (XIONG et al., 2015; ALVES, 2009).

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

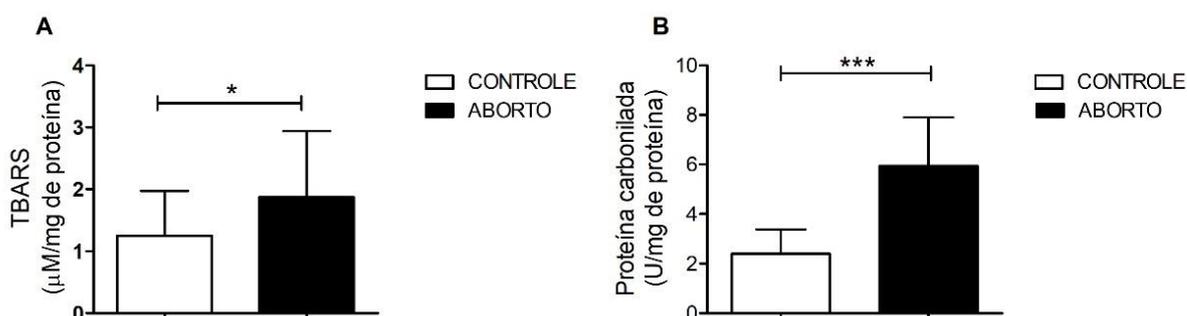
As variáveis de interesse deste estudo foram submetidas ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. As comparações entre os grupos caso e controle foram pelo teste de comparações teste t Student, sendo os resultados expressados como média \pm desvio padrão da média. Na expressão gênica as comparações foram realizadas pelo teste de comparações teste t Student, quando paramétrico, utilizado o teste não pareado, e quando não-paramétrico utilizado o teste Mann Whitney. Para os grupos controle absoluto (parto a termo sem infecção), controle infectado (parto a termo com infecção por *U. parvum*), aborto sem infecção e aborto infectado com *U. parvum* as análises foram feitas através do teste ANOVA Two-Way adotando delineamento fatorial (2x2), seguido de comparações pelo pós-teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de $p < 0,05$.

7 RESULTADOS

7.1 Estresse oxidativo e capacidade antioxidante enzimática

Na análise da peroxidação lipídica e carbonilação proteica o grupo aborto, quando comparado ao grupo controle, apresentou níveis elevados do TBARS (Figura 3A) e proteínas carboniladas (Figura 3B).

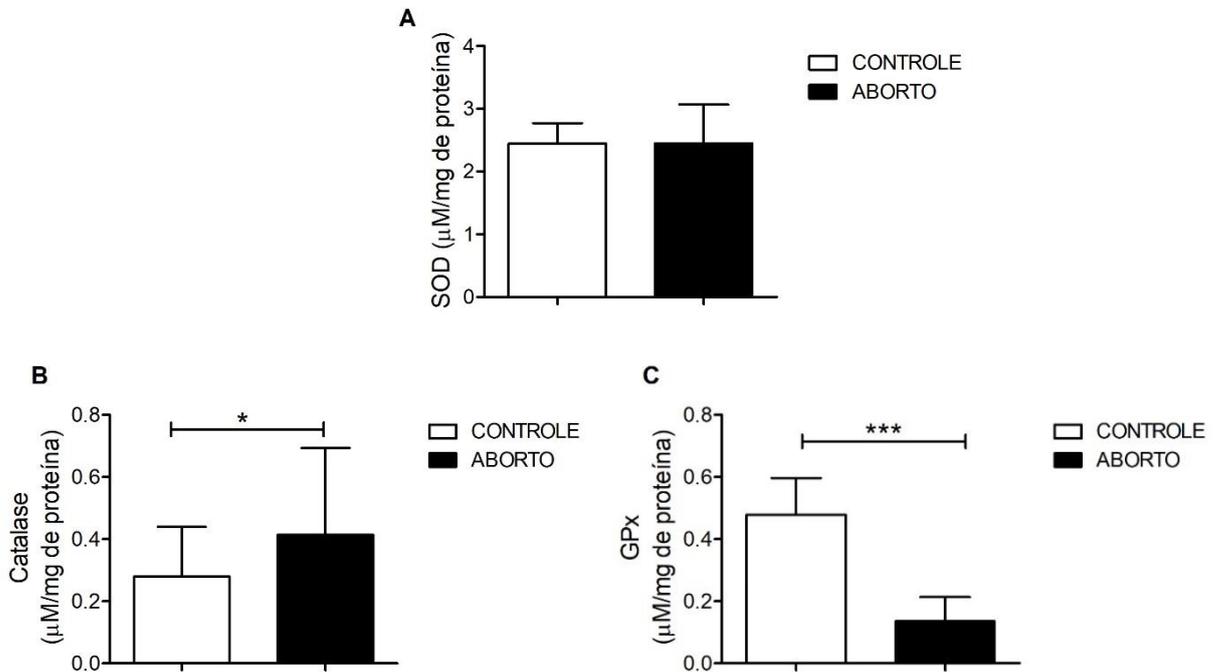
Figura 3- Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS (A) e proteínas carboniladas (B) no tecido placentário de mulheres que evoluíram com aborto espontâneo (caso) e mulheres que tiveram parto a termo (controle).



Legenda: (A) TBARS; (B) Proteína carbonilada, na concentração (U/mg de proteína e µM/mg de proteína). As análises foram feitas através do teste de comparações teste t de Student. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão da média. * Diferença entre grupos controle vs aborto $P < .01$. *** Diferença entre grupos controle vs aborto $P < 0.0001$.

Nos dados analisados das enzimas antioxidantes, o aborto não causou alteração na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) (Figura 4A). Por outro lado, o aborto contribuiu com o aumento da enzima catalase (CAT) (Figura 4B) e a redução da enzima glutathiona peroxidase (GPx) (Figura 4C), em comparação com o grupo controle.

Figura 4- Concentrações das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutatona peroxidase no tecido placentário de mulheres que evoluíram com aborto espontâneo e mulheres que tiveram parto a termo.



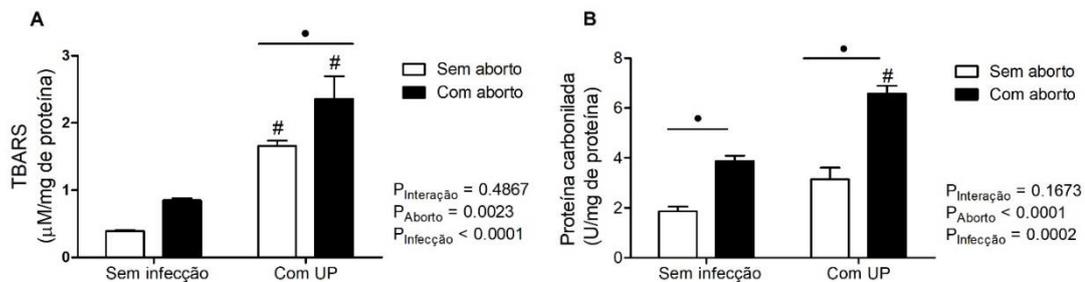
Legenda: Atividade das enzimas antioxidantes (A) superóxido dismutase (SOD); (B) catalase e (C) glutatona peroxidase (GPx), na concentração ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína). As análises foram feitas pelo teste t de Student. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. (A) não apresentou diferença estatística entre os grupos controle vs aborto. (B) * Diferença entre grupos controle vs aborto $P < .01$. (C) *** Diferença entre grupos controle vs aborto $P < 0.0001$.

7.2 Estresse oxidativo e capacidade antioxidante enzimática associado a infecção por *U. parvum*

Portanto, trabalhamos com os grupos: parto a termo sem infecção (controle absoluto); parto a termo com infecção por *U. parvum* (controle infectado); aborto sem infecção e aborto com infecção por *U. parvum*. Os dados da peroxidação lipídica (Figura 5A e 5B), sugerem que na análise do TBARS (Figura 5A): (i) houve um aumento do TBARS no aborto infectado por *U. parvum*, quando comparado ao controle infectado por *U. parvum*; (ii) já entre o controle e aborto sem infecção, os níveis de TBARS não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$); (iii) no aborto infectado por *U. parvum* ocorreu aumento quando comparado ao aborto sem infecção; (iiii) no controle infectado por *U. parvum* ocorreu aumento, quando comparado ao controle sem infecção; Analisando os níveis de proteína carbonilada (Figura 5B) identificamos que: (i) a carbonilação proteica esteve elevada no aborto infectado quando comparado ao controle com infecção; (ii) no aborto sem infecção ocorreu aumento quando comparado ao controle sem

infecção; (iii) ocorreu elevação no aborto infectado quando comparado ao aborto sem infecção; (iv) já controle infectado e controle sem infecção não encontramos diferença estatisticamente significativa.

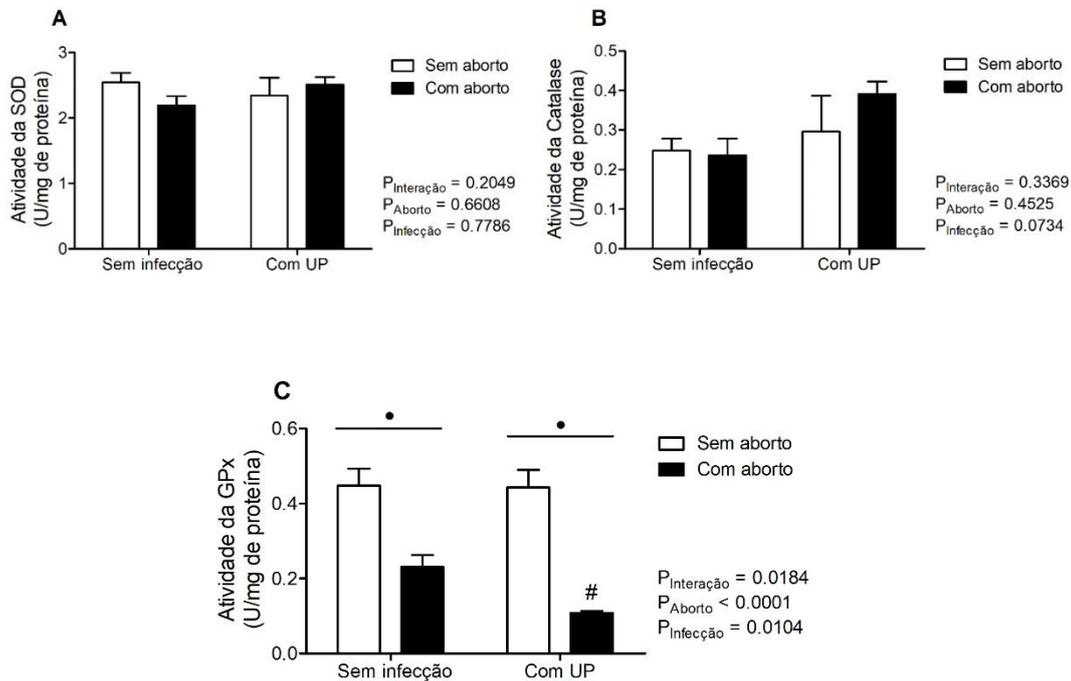
Figura 5 - Concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS (A) e proteínas carboniladas (B) no tecido placentário de mulheres que tiveram parto a termo sem infecção (controle absoluto), parto a termo e infecção por *U. parvum* (controle infectado), aborto com infecção por *U. parvum* e aborto sem infecção.



Legenda: (A) TBARS na concentração ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína); (B) Proteína carbonilada, na concentração (U/mg de proteína). As análises foram feitas através do teste ANOVA Two-Way, seguido de comparações pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. # Diferença entre grupos em mesma condição de aborto. • Diferença entre grupos em mesma condição de infecção.

Na análise da atividade das enzimas antioxidantes, ao comparar os mesmos grupos definidos, observamos que: (i) não houve diferença entre os 4 grupos comparados entre si na atividade da SOD e Catalase (Figuras 6A e 6B) ($p > 0,05$); (ii) que houve redução na atividade da GPx no grupo aborto sem infecção quando comparado ao grupo controle sem infecção por *U. parvum* (Figura 6C); (iii) que também ocorreu redução no grupo aborto com infecção quando comparado ao grupo controle com infecção por *U. parvum*; e (iv) no grupo aborto sem infecção quando comparado ao aborto infectado, houve redução no aborto infectado por *U. parvum*; (iv) e no grupo controle sem infecção quando comparado ao controle infectado, não houve diferença estatística.

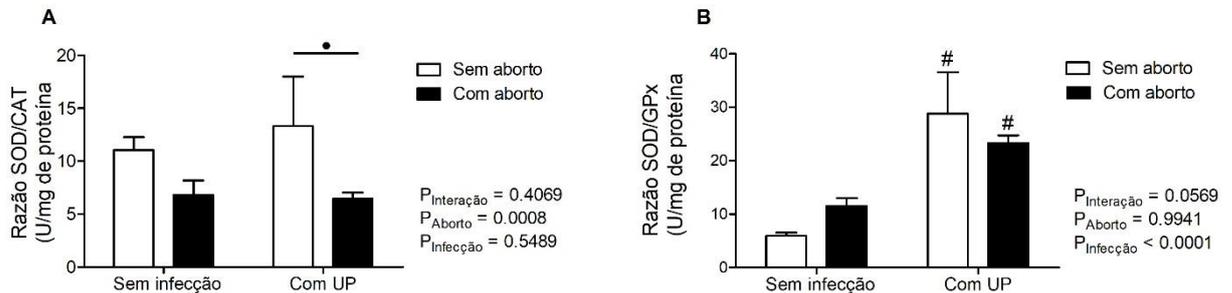
Figura 6- Concentração das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase no tecido placentário de mulheres que tiveram parto a termo sem infecção (controle absoluto), parto a termo e infecção por *U. parvum* (controle infectado), aborto com infecção por *U. parvum* e aborto sem infecção.



Legenda: Atividade das enzimas antioxidantes (A) SOD; (B) catalase e (C) GPx, na concentração (U/mg de proteína). UP – *Ureaplasma parvum*. As análises foram feitas através do teste ANOVA Two-Way, seguido de comparações pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. # Diferença entre grupos em mesma condição de aborto. • Diferença entre grupos em mesma condição de infecção.

Analisando os dados dos mesmos grupos definidos, da razão das enzimas SOD/CAT (Figura 7A) identificamos que: (i) houve uma redução da razão SOD/CAT no grupo aborto infectado com *U. parvum* quando comparado ao grupo controle infectado por *U. parvum*. Na razão SOD/GPx (Figura 7B): (i) ocorreu aumento no grupo aborto infectado com *U. parvum* quando comparado ao aborto sem infecção; (ii) o grupo controle infectado com *U. parvum* também apresentou elevação da razão supracitada quando comparado ao controle não infectado. Não encontramos diferenças estatísticas entre os demais grupos comparados nas razões SOD/CAT e SOD/GPx ($p > 0,05$).

Figura 7- Razão das enzimas SOD/CAT e SOD/GPx no tecido placentário de mulheres que tiveram parto a termo sem infecção (controle absoluto), parto a termo e infecção por *U. parvum* (controle infectado), aborto com infecção por *U. parvum* e aborto sem infecção.

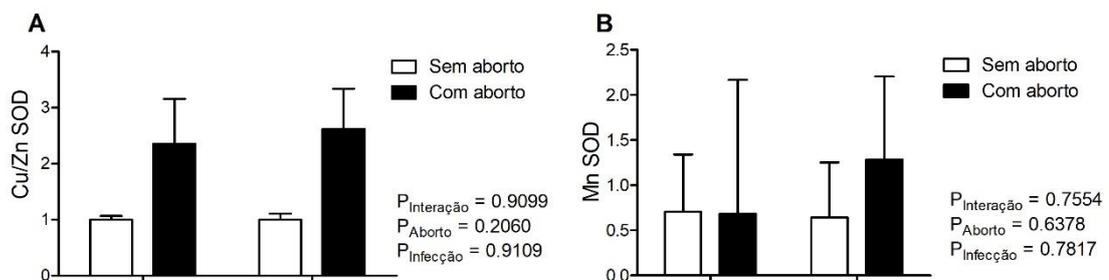


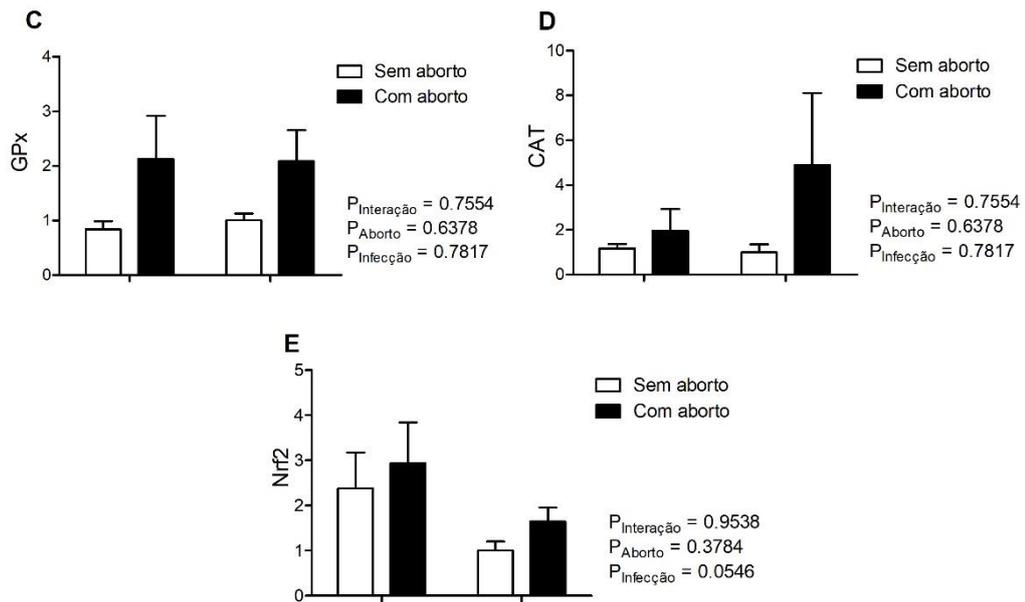
Legenda: Razão das enzimas (A) SOD/CATe (B) SOD/GPx, concentração (U/mg de proteína). UP – *Ureaplasma parvum*. As análises foram feitas através do teste ANOVA Two-Way, seguido de comparações pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. # Diferença entre grupos em mesma condição de aborto. • Diferença entre grupos em mesma condição de infecção.

7.3 Expressão gênica de Nrf2, CAT, Cu/ Zn SOD, Mn SOD e GPx por PCR em tempo real (PCR Real-time)

Na análise do perfil de expressão gênica das enzimas Cu/Zn SOD (Figura 8A), Mn SOD (Figura 8B), CAT (Figura 8C), GPx (Figura 8D) e Nrf2 (Figura 8E), não houve diferença estatística quando comparado os mesmos grupos definidos ($p > 0,05$).

Figura 8- Expressão gênica de Cu/Zn SOD, Mn SOD, GPx, CAT e Nrf2 no tecido placentário de mulheres que tiveram parto a termo sem infecção (controle absoluto), parto a termo e infecção por *U. parvum* (controle infectado), aborto com infecção por *U. parvum* e aborto sem infecção.



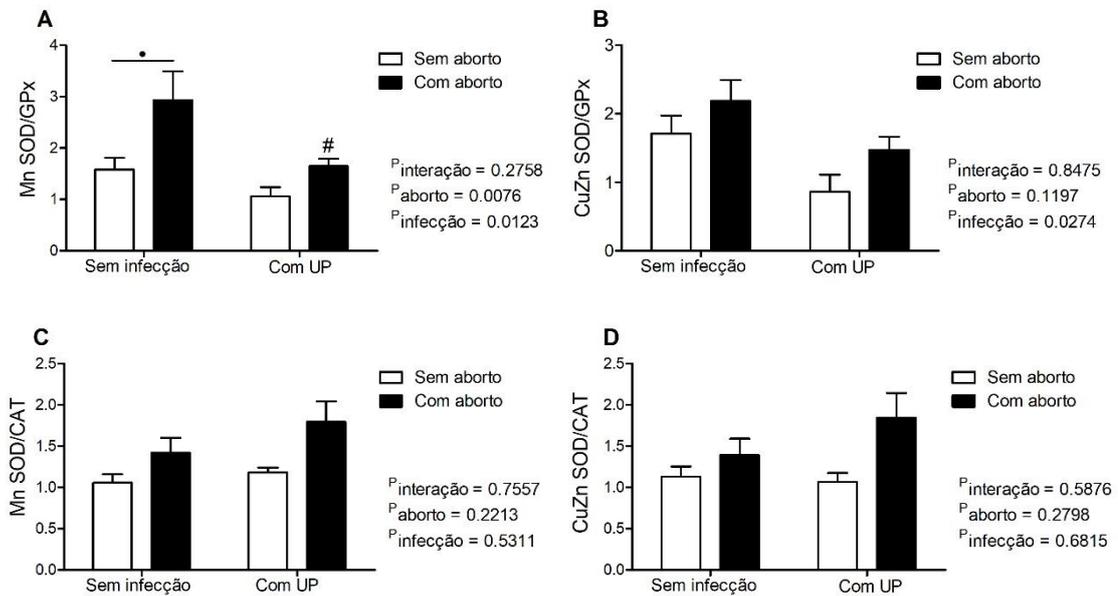


Legenda: Expressão gênica de Cu/Zn SOD, Mn SOD, GPx, CAT e Nrf2 concentração (U/mg de proteína). UP – *Ureaplasma parvum*. As análises foram feitas através do teste ANOVA Two-Way, seguido de comparações pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. # Diferença entre grupos em mesma condição de aborto. • Diferença entre grupos em mesma condição de infecção.

7.3.1 Expressão gênica: Razão de CuZn SOD/ CAT, Mn SOD/CAT, CuZn SOD/GPx e Mn SOD/GPx

Na análise das razões das enzimas por meio da expressão gênica identificamos que: (i) houve um aumento da razão da expressão gênica de Mn SOD/GPx no grupo aborto sem infecção quando comparado ao grupo controle sem infecção (Figura 9A); (ii) nas demais razões CuZn SOD/GPx (Figura 9B), Mn SOD/CAT (Figura 9C) e CuZn SOD/CAT (Figura 9D) não ocorreu diferenças estatísticas entre os grupos comparados ($p > 0,05$).

Figura 9- Razão das enzimas Mn SOD/GPx; CuZn SOD/GPx, Mn SOD/CAT e CuZn SOD/CAT, por meio da expressão gênica, no tecido placentário de mulheres que tiveram parto a termo sem infecção (controle absoluto), parto a termo e infecção por *U. parvum* (controle infectado), aborto com infecção por *U. parvum* e aborto sem infecção.

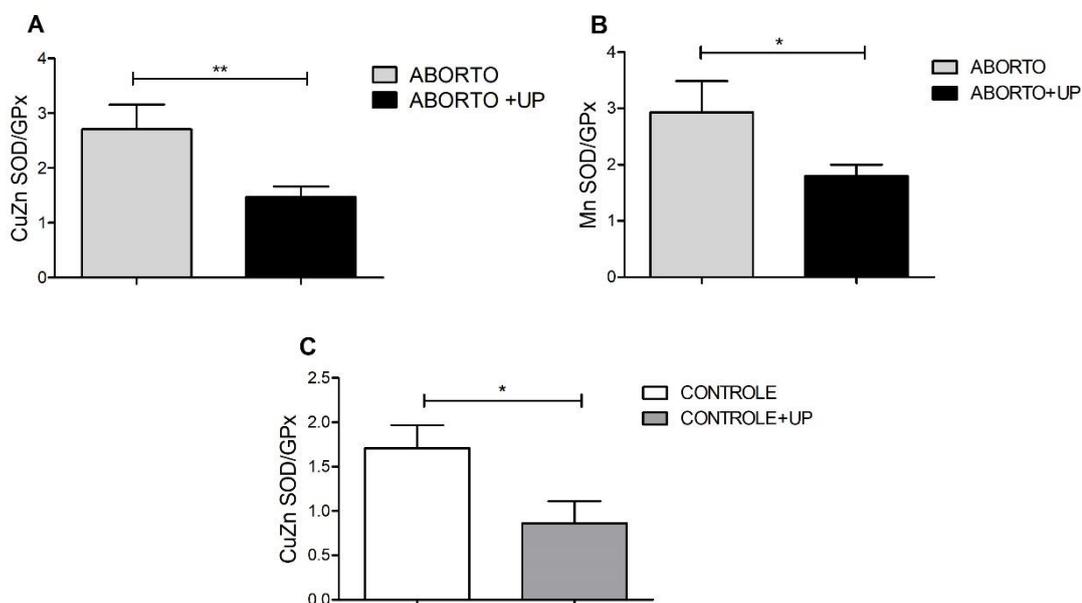


Legenda: Razão das enzimas Mn SOD/GPx; CuZn SOD/GPx, Mn SOD/CAT e CuZn SOD/CAT na concentração (U/mg de proteína). UP – *Ureaplasma parvum*. As análises foram feitas através do teste ANOVA Two-Way, seguido de comparações pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

Diferença entre grupos em mesma condição de aborto. • Diferença entre grupos em mesma condição de infecção.

Na análise de dois grupos, na razão da expressão gênica observamos que: (i) houve redução na expressão gênica de CuZn SOD/GPx (Figura 10A) e Mn SOD/GPx (Figura 10B) no grupo aborto infectado com *U. parvum* quando comparado ao aborto sem infecção; (ii) ocorreu redução de CuZn SOD/GPx (Figura 10C) no grupo controle infectado com *U. parvum* quando comparado ao controle sem infecção; (iii) na análise de dois a dois dos demais grupos não encontramos diferença estatística ($p > 0,05$) (Suplementar 1).

Figura 10- Razão das enzimas CuZn SOD/GPx e Mn SOD/GPx, por meio da expressão gênica no tecido placentário de mulheres que tiveram aborto com infecção por *U. parvum* e aborto sem infecção.

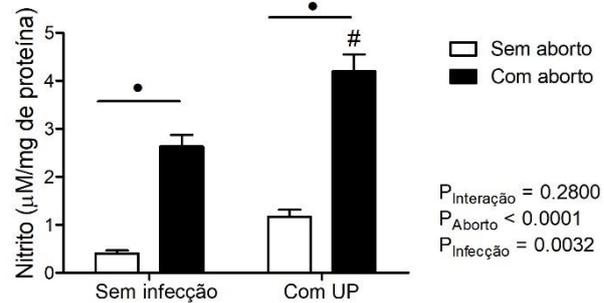


Legenda: Razão das enzimas CuZn SOD/GPx e Mn SOD/GPx na concentração (U/mg de proteína). UP – *Ureaplasma parvum*. As análises foram feitas através do teste ANOVA, seguida pelo teste t de Student. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. (A) * $P < 0,05$. (B) ** $P < 0,01$.

7.4 Dosagem de nitrito

Na análise da dosagem do nitrito ao comparar os mesmos grupos definidos, observamos que: (i) houve aumento do nitrito no grupo aborto infectado com *U. parvum* quando comparado ao grupo aborto não infectado; (ii) não ocorreu diferença estatística entre o grupo controle infectado por *U. parvum* e controle não infectado; (iii) nitrito esteve elevado no grupo aborto infectado com *U. parvum* quando comparado ao grupo controle infectado com *U. parvum*; (iv) o aumento de nitrito ocorreu no grupo aborto sem infecção quando comparado ao controle sem infecção (Figura 11).

Figura 11- Dosagem de nitrito no tecido placentário de mulheres que tiveram parto a termo sem infecção (controle absoluto), parto a termo e infecção por *U. parvum* (controle infectado), aborto com infecção por *U. parvum* e aborto sem infecção.



Legenda: Dosagem de nitrito na concentração de ($\mu\text{M}/\text{mg}$ de proteína). UP – *Ureaplasma parvum*. As análises foram feitas através do teste ANOVA Two-Way, seguido de comparações pelo pós-teste de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. # Diferença entre grupos em mesma condição de aborto. • Diferença entre grupos em mesma condição de infecção. O dado foi considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

8 DISCUSSÃO

O presente estudo buscou em mulheres que sofreram aborto espontâneo em um município do Estado da Bahia, em um hospital referência na saúde materno-infantil, respostas associadas as alterações sofridas na gestação que resultam no aborto. Este estudo atingiu resultados inéditos envolvendo o entendimento das alterações do status redox de mulheres infectadas com *U. parvum* que evoluíram com aborto espontâneo. A escassez de dados associados ao tema em questão, revelavam apenas que o aborto possuía relação com o estresse oxidativo, sem mencionar o impacto negativo e as alterações do grau de peroxidação lipídica, carbonilação proteica e atividade antioxidante proveniente de uma infecção genital bacteriana, como possível causa do aborto espontâneo (AL-SHEIKH et al., 2019; GHNEIM; ALSHEBLY, 2016; HUSSAIN et al., 2021).

Assim, no presente estudo buscou-se identificar por meio da comparação entre os grupos aborto e grupo controle (mulheres que tiveram parto a termo), o entendimento das alterações do equilíbrio redox. Na avaliação do estresse oxidativo celular, inicialmente foram analisados o grau de peroxidação lipídica por meio do marcador TBARS e a oxidação proteica através da proteína carbonilada. A peroxidação lipídica induz a ruptura na bicamada lipídica da membrana, elevando a permeabilidade tecidual (AL-SHEIKH et al., 2019). A elevação do TBARS nos tecidos refere-se à geração de radicais livres (DAS et al., 2012). O presente estudo encontrou o aumento nos níveis de TBARS e proteína carbonilada no grupo aborto quando comparado ao controle. Esses dados estão de acordo com outros achados (LUCCA et al., 2019; ZEJNULLAHU; ZEJNULLAHU; KOSUMI, 2021) que observaram níveis elevados do TBARS em grávidas que tiveram complicações gestacionais quando comparadas a gestações saudáveis. Das et al (2012) mostraram que grávidas com desfechos adversos na gestação apresentaram aumento nos níveis de TBARS, indicando elevação das ROS. Mulheres que evoluíram com pré-eclâmpsia cursaram com elevação da proteína carbonilada, que foram oriundas da oxidação direta das proteínas por ROS ou por conta da elevação dos níveis de TBARS, que por meio da oxidação lipídica oxida as proteínas (TARAVATI; TOHIDI, 2018; AGARWAL et al., 2012). No tecido placentário de mulheres que sofreram aborto espontâneo, por causa idiopática, foi identificado o aumento de marcadores de peroxidação lipídica quando comparado as mulheres que tiveram parto a termo (GHNEIM; ALSHEBLY, 2016). Assim, nossos achados e a literatura reforçam por meio destas evidências que o aumento da peroxidação lipídica placentária é um fator desencadeante do dano celular oxidativo que contribui com o aborto espontâneo (AL-SHEIKH et al., 2019).

Por meio dos resultados obtidos no presente estudo, foi possível observar que ocorreu peroxidação lipídica nas mulheres que evoluíram com aborto, e diante deste cenário observamos que o dano oxidativo encarrega respostas antioxidantes (ZEJNULLAHU; ZEJNULLAHU; KOSUMI, 2021). Com isso, o estudo em questão demonstrou que a atividade da SOD não causou diferença significativa entre o grupo aborto e controle. Esses dados divergem dos achados por Ghneim et al (2016) que assim como o nosso trabalho, verificou a atividade da SOD em amostras de placenta de mulheres que tiveram gestação saudável e mulheres que evoluíram com aborto, identificando uma redução na atividade da SOD. Diferentemente desses achados, um estudo realizado com placenta de mulheres que evoluíram com pré-eclâmpsia e mulheres com gestação saudável, identificou aumento na SOD nas mulheres com pré-eclâmpsia (DAS et al., 2012). Em contrapartida, a SOD não apresentou diferença significativa em éguas que cursavam no final da gestação (SOUZA, 2017). Com isso, outros autores sugerem que CAT e GPx acabam sendo responsáveis pela redução do ânion superóxido (JOO et al., 2021). É válido ressaltar que a presença de cofatores como zinco, cobre e manganês estão associados a atividade da superóxido dismutase (RAY et al., 2022). Esses resultados sugerem que a atividade da SOD não foi alterada pelo aborto, permitindo supor que cofatores podem estar relacionados aos achados, e a resposta antioxidante pode estar ocorrendo por meio das demais enzimas do sistema de defesa.

Após a identificação da resposta antioxidante da SOD em mulheres com aborto espontâneo, verificamos a atividade da CAT, enzima antioxidante responsável pela dismutação do H_2O_2 . A partir dos resultados obtidos no presente estudo foi possível observar que o aborto elevou os níveis da CAT. Al-Sheikh et al (2019) identificaram redução na atividade da CAT no tecido placentário de mulheres que evoluíram com aborto recorrente quando comparado com mulheres que tiveram gestação saudável. Dados que estão de acordo com os achados de outros estudos (GNHEIM; ALSHEBLY, 2016; ZEJNULLAHU; ZEJNULLAHU; KOSUMI, 2021) que demonstraram diminuição da CAT, SOD e GPx em mulheres que evoluíram com aborto na gestação. Mulheres grávidas infectadas com SARS-CoV-2 apresentaram aumento nos níveis da CAT (ROLFO et al., 2022). Por outro lado, Schimitt et al (2022) não encontraram diferença significativa na CAT em gestantes com e sem infecção por SARS-CoV-2. Esses dados abrem lacunas de que as infecções bacterianas ou virais podem comprometer a atividade das enzimas antioxidantes, porém existe escassez na literatura ao esclarecer essa relação. Assim, hipotetizamos que a elevação da CAT tenha uma relação com a SOD, que não teve sua atividade alterada neste estudo. Outra hipótese sugerida é levantada através dos resultados da CAT em gestantes com infecções virais, que conforme supracitado apresentaram respostas alteradas da CAT, sugerindo que processos infecciosos podem alterar o comportamento da atividade de enzimas antioxidantes.

No presente estudo o aborto reduziu a atividade da GPx quando comparada ao controle. Da mesma maneira, estudos anteriores que identificaram a atividade de antioxidantes incluindo a GPx em mulheres com aborto, gestantes saudáveis e mulheres não grávidas, observaram níveis reduzidos da glutathione peroxidase no grupo aborto quando comparado aos demais (AL-SHEIKH et al., 2019; GNHEIM; ALSHEBLY, 2016). Em mulheres que evoluíram com pré-eclâmpsia a atividade da GPx esteve reduzida (JOO et al., 2021). Do mesmo modo, nos casos de sepse a GPx apresentou redução dos níveis da sua atividade (SULZABACHER; LUDWING; HECK, 2020). Os níveis das concentrações das enzimas antioxidantes e a elevação do grau de peroxidação lipídica são determinantes para a lesão oxidativa (GNHEIM; ALSHEBLY, 2016; HUSSAIN et al., 2021). Por conseguinte, o dano oxidativo e atividade antioxidante alterada, sugerem a hipótese de estresse oxidativo como fator contribuinte ao aborto espontâneo (DI FABRIZIO et al., 2022; JOO et al., 2021; DAS et al., 2012; ZEJNULLAHU; ZEJNULLAHU; KOSUMI, 2021; HUSSAIN et al., 2021; AGARWAL et al., 2012). Identificando que o aborto foi sugestivo das alterações do estado oxidativo, buscamos entender o perfil inflamatório neste contexto gestacional.

Dados anteriormente publicados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que o aborto elevou as interleucinas: IL-6, IL-12p70, IL-5, IFN- γ e TNF- α . Em contrapartida, a IL-4 esteve reduzida no grupo aborto (OLIVEIRA et al., 2021). Outro fator a ser considerado, e descrito em estudo prévio, é a infecção por *Ureaplasma parvum* em grávidas que elevaram o perfil pró-inflamatório, sugerindo uma possível relação como causa do AE (OLIVEIRA et al., 2021). A inflamação oriunda do processo infeccioso é capaz de alterar o estado oxidativo por meio do aumento da tensão de oxigênio (ZEJNULLAHU; ZEJNULLAHU; KOSUMI, 2021). Por conseguinte, a prevalência de 66,3% de *U. parvum* nas mulheres com aborto espontâneo foi encontrado por meio da PCR em tempo real, em um estudo anterior desenvolvido por nosso grupo de pesquisa (OLIVEIRA et al., 2020). Neste contexto, infecções bacterianas desencadeiam respostas inflamatórias que arremetem o tecido placentário, corioâmnio, decídua e células trofoblásticas (WALDORF; MCADAMS, 2013). *Ureaplasma spp.* apresenta ainda associação com resultados adversos da gravidez (KOKKAYIL; DHAWAN, 2015), incluindo o aborto espontâneo (MATASARIU et al., 2022; GALLINI et al., 2022; VALLELY et al., 2018). Com base nesses achados, é plausível considerarmos que a prevalência de UP nas gestantes, pode ter sido um fator causal do AE.

O presente estudo identificou que a infecção por *U. parvum* elevou os níveis de TBARS independentemente da condição aborto. Ademais, o presente estudo identificou níveis mais elevados da carbonilação das proteínas no grupo aborto infectado por UP, quando comparado

ao aborto não infectado e ao controle com e sem infecção por UP. Vale ressaltar que os dados na literatura que avaliaram a peroxidação lipídica e carbonilação proteica no contexto do aborto espontâneo associado a infecções bacterianas são escassos. Sendo o presente estudo, o único dado que relata o EO no tecido placentário de mulheres que evoluíram com AE associado a infecção por *U. parvum*. A infecção por *Chlamydia trachomatis* causou aumento dos marcadores de peroxidação lipídica em amostras de urina de mulheres com perda recorrente da gestação (RAY et al., 2022). Outros achados por Azenador e Mahony (2000) identificaram que a infecção por *C. trachomatis* durante sua replicação aumenta as ROS e contribui com altas taxas de peroxidação lipídica. Esses dados estão de acordo com Nagarajappa et al (2019) que identificaram o aumento das proteínas carboniladas em grávidas com complicações. Apesar dessas evidências, pouco se sabe sobre as infecções bacterianas no contexto supracitado. Rolfo et al (2022) identificaram aumento nos níveis de TBARS em placentas infectadas com SARS-CoV-2, constatando o perfil citotóxico dessa infecção viral. Do mesmo modo, Almeida (2020) identificou que a carbonilação proteica esteve aumentada em células Vero infectadas por ZIKV. Estes relatos pontuam como microrganismos podem contribuir para aumentar o estresse oxidativo. A elevação do EO afeta os processos reprodutivos (AL-GUBORY; FOWLER; GARREL, 2010) sendo considerado um fator contribuinte para o aborto espontâneo (BALAJEWICZ-NOWAK; KAZIMIERZ; MALGORZATA, 2011).

A infecção por UP no presente estudo não causou diferença significativa nos antioxidantes CAT e SOD nos grupos aborto e controle. Em contrapartida, a infecção por *U. parvum* reduziu a atividade da GPx no grupo aborto quando comparado ao controle. Nesse sentido, outros achados por Schimitt et al (2022) em grávidas com e sem infecção viral não relataram diferenças significativas nos níveis de CAT, SOD e GPx. Em contrapartida, estudos reportaram que as enzimas antioxidantes estiveram reduzidas em mulheres com aborto de causa idiopática (AL-SHEIKH et al., 2019; GHNEIM et al., 2016; RAY et al., 2022; GHNEIM; ALSHEBLY, 2016). Em seguida, observamos no presente estudo, uma redução na razão SOD/CAT no grupo aborto infectado com *U. parvum* quando comparado ao controle infectado. Em contrapartida, identificamos que tanto o aborto infectado como o controle infectado aumentaram a razão SOD/GPx quando comparado aos grupos aborto e controle sem infecção. Harisa (2013) relatou que o aumento das razões SOD/CAT e SOD/GPx indicam estresse oxidativo. Sánchez-Rodríguez (2010) descreve que a relação SOD/GPx é indicativo de EO. Assim, hipotetizamos que a infecção por *U. parvum* em mulheres com aborto espontâneo pode reduzir o mecanismo de defesa enzimática do sistema glutaciona, sem alterar as respostas de CAT e SOD, bem como reduzir a razão SOD/CAT. Do mesmo modo, a diminuição da GPx, bem como a elevação da razão

SOD/GPx sugere uma defesa insuficiente ao dano oxidativo causado. Contudo, vale a pena ressaltar que a literatura é escassa em estudos que relacionam infecções bacterianas, incluindo infecção por *U. parvum* no contexto do aborto espontâneo e as possíveis alterações do estado oxidativo. Logo, os nossos estudos sugerem fortes evidências de que UP pode estar provocando alteração no estado oxidativo, sugerindo uma possível relação como causa de aborto espontâneo.

O presente estudo identificou por meio da expressão gênica que o aborto e a infecção por UP não alteraram significativamente a expressão dos genes Nrf2, CAT, Cu/Zn SOD, Mn SOD e GPx, pois não apresentaram diferenças estatísticas consideráveis. Entretanto, identificamos que ocorreu redução na razão da expressão gênica de Mn SOD/GPx no aborto sem infecção quando comparado ao controle sem infecção. Em contrapartida, a infecção reduziu a razão da expressão de CuZn SOD/GPx e Mn SOD/GPx no aborto infectado quando comparado ao aborto sem infecção e ocorreu redução da razão da expressão gênica de CuZn SOD/GPx no controle infectado quando comparado ao controle sem infecção. Outros achados, por Gnheim et al (2016) encontraram níveis reduzidos na expressão gênica da SOD no grupo aborto recorrente idiopático. Com isso, é plausível afirmar que a infecção por *U. parvum* reduz a atividade antioxidante enzimática no aborto espontâneo. Contudo, vale a pena destacar que a atividade das enzimas antioxidantes tem relação com seus cofatores e substratos (PEREIRA, 1996), selênio, manganês, cobre e zinco são cofatores da SOD (KESHAVARZ et al., 2017). Ademais, outros achados sugeriram que as concentrações elevadas de cobre e zinco inativaram enzimas antioxidantes como a SOD (BAKACAK et al., 2015) que quando associado ao aumento da peroxidação lipídica esteve relacionado com a pré-eclâmpsia (NEGI et al., 2012). Além de cofatores, alterações hormonais e perfis inflamatórios modificam as atividades enzimáticas (PEREIRA, 1996).

Além disto, o presente estudo identificou que o aborto aumentou os níveis de nitrito, e a elevação foi ainda maior quando associado ao quadro infeccioso por UP. Nitrito é considerado produto final do óxido nítrico (NO) (AGARWAL et al., 2005). NO possui papel na imunidade inata, geração de espécies reativas de nitrogênio, que são compostos tanto para microrganismos quanto para células hospedeiras (DANTAS et al., 2020). Essas espécies reativas interagem com lipídios e proteínas, moldadas na morte celular pela peroxidação lipídica e carbonilação proteica. Nossos resultados diferem dos achados em outros estudos, onde relataram que o aumento da geração de radicais livres, pode reduzir a biodisponibilidade do NO (CARLSTROM, MONTENEGRO, 2018). Mas, o desafio da infecção suplantou as ROS aumentando o NO. Além disso, a hipótese resultante deste estudo se baseia na infecção por UP, designando alterações oxidativas no contexto do aborto espontâneo. Em condições de EO, NO reage com o ânion superóxido formando o peroxinitrito. Em níveis baixos, o peroxinitrito modula várias vias de

sinalização intracelular. Contudo, em concentrações elevadas exercem efeitos citotóxicos, uma vez que é uma molécula altamente reativa e instável que pode se decompor em outras espécies reativas, como o dióxido de nitrogênio ($\bullet\text{NO}_2$) e o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$). Juntas, essas espécies levam a um estresse nitroxidativo, prejudicando as macromoléculas celulares, pois são capazes de oxidar lipídios, tióis e DNA (Szabo, 2007).

9 CONCLUSÕES

- O aborto espontâneo elevou os níveis de TBARS e proteína carbonilada, considerados marcadores da peroxidação lipídica e oxidação proteica, indicando EO no grupo aborto;
- Nas mulheres com aborto espontâneo a SOD não apresentou diferença estatística significativa, em contrapartida a CAT apresentou níveis elevados e a GPx cursou com redução da sua atividade;
- A infecção por *U. parvum* elevou ainda mais os níveis de TBARS e proteína carbonilada nas mulheres que sofreram aborto espontâneo;
- A infecção por *U. parvum* não alterou estatisticamente os níveis das enzimas antioxidantes SOD e CAT, por outro lado, a infecção reduziu ainda mais os níveis da GPx no grupo aborto;
- Ocorreu redução da razão SOD/CAT e aumento da razão SOD/GPx nos grupos infectados por *U. parvum*;
- A expressão gênica de Mn SOD esteve reduzida no aborto com infecção. E houve redução da expressão de CuZn SOD/GPx e Mn SOD/GPx nos grupos infectados por *U. parvum* quando comparados aos grupos sem infecção;
- Ocorreu elevação dos níveis de nitrito no grupo aborto infectado com *U. parvum*.

Portanto, observamos que o ocorreu estresse oxidativo nas mulheres que evoluíram com aborto espontâneo e que a infecção pode contribuir para acentuar este processo. Ademais, vislumbramos a ideia de que o perfil pró-inflamatório oriundo do processo infeccioso bacteriano, compromete a atividade antioxidante, indicando que a infecção por *U. parvum* tenha causado uma desordem no estado oxidativo. Por conseguinte, entende-se que a gestação é um período de alta demanda energética e com participação importante da resposta imune, que quando em desequilíbrio, contribuem sumariamente para os resultados gestacionais adversos. Contudo, os esforços são múltiplos na busca pelo entendimento dos mecanismos envolvidos na etiopatogenia e fisiopatologia do aborto espontâneo associado a infecção genital, em especial, pelo patógeno *U. parvum*. Entretanto, nossos achados sugerem um futuro promissor por meio de mais investigações nas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e seus papéis no aborto espontâneo quando associado a infecção bacteriana.

REFERÊNCIAS

- AEBI, Hugo. [13] Catalase in vitro. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1984. p. 121-126.
- AGARWAL, Ashok et al. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 10, p. 1-31, 2012.
- AHMADI, Amjad et al. The relationship between Chlamydia trachomatis genital infection and spontaneous abortion. **Journal of reproduction & infertility**, v. 17, n. 2, p. 110, 2016.
- AHMED, Jaweed et al. Mycoplasma hominis: An under recognized pathogen. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 88-97, 2021.
- AL-GUBORY, Kaïs H.; FOWLER, Paul A.; GARREL, Catherine. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 42, n. 10, p. 1634-1650, 2010.
- ALJASER, Feda S. et al. Glutathione and oxidized nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) redox status in plasma and placental tissue of Saudi patients with intrauterine growth restriction. **Saudi Medical Journal**, v. 42, n. 5, p. 491, 2021.
- ALMEIDA, Letícia Trindade. Avaliação do estresse oxidativo e defesas antioxidantes na infecção pelo Zika virus (Flaviviridae). 2020.
- AL-SHEIKH, Yazeed A. et al. Molecular and biochemical investigations of key antioxidant/oxidant molecules in Saudi patients with recurrent miscarriage. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 18, n. 6, p. 4450-4460, 2019.
- AMARAL, Angela Domingos. Incidência de gardnerella vaginalis nas amostras de secreção vaginal em mulheres atendidas pelo laboratório municipal de Fraiburgo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, 2012.
- ARABSALMANI, Masoumeh et al. Is herpes simplex virus (HSV) a sign of encephalitis in Iranian newborns? Prevalence of HSV infection in pregnant women in Iran: a systematic review and meta-analysis. **Iranian journal of child neurology**, v. 11, n. 2, p. 1, 2017.
- AURITI, Cinzia et al. Pregnancy and viral infections: Mechanisms of fetal damage, diagnosis and prevention of neonatal adverse outcomes from cytomegalovirus to SARS-CoV-2 and Zika virus. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1867, n. 10, p. 166198, 2021.
- AYDIN, Y. et al. Association of cervical infection of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma urealyticum and Mycoplasma hominis with peritoneum colonisation in pregnancy. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 30, n. 8, p. 809-812, 2010.
- AZENABOR, Anthony A.; MAHONY, James B. Generation of reactive oxygen species and formation of membrane lipid peroxides in cells infected with Chlamydia trachomatis. **International journal of infectious diseases**, v. 4, n. 1, p. 46-50, 2000.

AZEVÊDO, Sâmya Pires Batista et al. UMA REVISÃO DA LITERATURA ACERCA DAS ALTERAÇÕES DA MICROBIOTA VAGINAL NO PERÍODO GESTACIONAL E PARTO. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 2, n. 2, p. 24-24, 2021.

BABA, Sachiko et al. Risk factors of early spontaneous abortions among Japanese: a matched case–control study. **Human reproduction**, v. 26, n. 2, p. 466-472, 2011.

BAKACAK, Murat et al. Changes in copper, zinc, and malondialdehyde levels and superoxide dismutase activities in pre-eclamptic pregnancies. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 21, p. 2414, 2015.

BAŁAJEWICZ-NOWAK, Marta; PITYŃSKI, Kazimierz; MIGDAŁ, Małgorzata. Antioxidative system in pregnant women infected by Chlamydia trachomatis, Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum. **Ginekologia Polska**, v. 82, n. 10, 2011.

BARBOSA, Jessye; DA SILVA RIBEIRO, Thecia Larissa; DE LIMA, Liene Ribeiro. PREVALÊNCIA DE INFECÇÕES GENITAIS EM GESTANTES NORDESTINAS EM VULNERABILIDADE SOCIAL NO SERTÃO CENTRAL CEARENSE. **Encontro de Extensão, Docência e Iniciação Científica (EEDIC)**, v. 5, n. 1, 2019.

BARBOSA, Kiriaque Barra Ferreira et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de nutrição**, v. 23, p. 629-643, 2010.

BARINI, Ricardo et al. Fatores associados ao aborto espontâneo recorrente. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 22, p. 217-223, 2000.

BAYRAKTAR, Mehmet Refik et al. Prevalence and antibiotic susceptibility of Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum in pregnant women. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. e90-e95, 2010.

BENUTE, Gláucia Rosana Guerra et al. Abortamento espontâneo e provocado: ansiedade, depressão e culpa. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 55, p. 322-327, 2009.

BENZECRY, Roberto; OLIVEIRA, Hildoberto Carneiro de; LEMGRUBER, Ivan. Tratado de obstetrícia Febrasgo. In: **Tratado de obstetrícia Febrasgo**. p. xxii, 2001.

BONFANTI, Gabriela; GONÇALVES, Thissiane. Prevalência de Gardnerella vaginalis, Candida spp. e Trichomonas vaginalis em exames citopatológicos de gestantes atendidas no Hospital Universitário de Santa Maria-RS. **Saúde (Santa Maria)**, p. 37-46, 2010.

BONNETON, Marion et al. Bacterial vaginosis and other infections in pregnant women in Senegal. **BMC Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2021.

BORGES, Amandina Pinto Gonçalves. Abortamento espontâneo—um estudo epidemiológico. Tese de Doutorado. Instituto Politecnico de Braganca (Portugal). 2013.

BRAZ, Roberta Fernandes et al. Aborto espontâneo: uma análise em relação à prevalência no norte de Minas Gerais. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 12, n. 12, p. e5416-e5416, 2020.
CAO, CJ et al. Relação entre infecção por micoplasma e aborto espontâneo recorrente. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, v. 22, n. 8, pág. 2207-11, 2018.

C. SZABO S, H. ISCHIROPOULOS, R. RADJ. Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics, *Nat. Rev. Drug Disco.* v. 6, P. 662-680, 2007.

CARDOSO, Bruno Baptista; VIEIRA, Fernanda Morena dos Santos Barbeiro; SARACENI, Valéria. Aborto no Brasil: o que dizem os dados oficiais? **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, 2020.

CARLSTROM, M.; MONTENEGRO, M. F. Therapeutic value of stimulating the nitrate-nitrite-nitric oxide pathway to attenuate oxidative stress and restore nitric oxide bioavailability in cardiorenal disease. **Journal of internal medicine**, v. 285, n. 1, p. 2-18, 2019.

MONZÓN CASTILLO, Eli Pedro; TEJADA MARTÍNEZ, Gabriel; OLIVA GARCÍA, Ana Belen. Cytomegalovirus infection in pregnancy. Case report in twin pregnancy. 2019.

CERUTTI, Peter et al. The role of the cellular antioxidant defense in oxidant carcinogenesis. **Environmental health perspectives**, v. 102, n. suppl 10, p. 123-129, 1994.

CHACRA, Linda; FENOLLAR, Florence; DIOP, Khoudia. Bacterial vaginosis: what do we currently know?. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 1393, 2022.

CHEE, Wallace Jeng Yang; CHEW, Shu Yih; THAN, Leslie Thian Lung. Vaginal microbiota and the potential of Lactobacillus derivatives in maintaining vaginal health. **Microbial cell factories**, v. 19, n. 1, p. 203, 2020.

CHEN, Bo et al. "The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries" **The Journal of endocrinology**. vol. 225,3, p. 83-88, 2015.

CHEN, Xiaodi et al. The female vaginal microbiome in health and bacterial vaginosis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 631972, 2021.

DANTAS, Kassyo Lenno Sousa et al. Contribution of the oxidative and nitrosative stresses to the development of placental malaria and the consequences for the fetus. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v. 12, n. 9, p. e3784-e3784, 2020.

DAS, Brahmarsi et al. Assessment of placental oxidative stress in pre-eclampsia. **The Journal of Obstetrics and Gynecology of India**, v. 62, p. 39-42, 2012.

DE ARAÚJO, Daniel Alencar et al. Etiologia genética do aborto recorrente. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 6, p. 25673-25677, 2021.

DEHON, Patricia M.; MCGOWIN, Chris L. The immunopathogenesis of Mycoplasma genitalium infections in women: a narrative review. **Sexually transmitted diseases**, v. 44, n. 7, p. 428, 2017.

DI FABRIZIO, Carolina et al. Antioxidants in Pregnancy: Do We Really Need More Trials?. **Antioxidants**, v. 11, n. 5, p. 812, 2022..

DIEJOMAOH, Michael F. et al. Gravidezes bem-sucedidas consecutivas após terapia com imunoglobulina intravenosa em uma paciente com aborto espontâneo recorrente. **Jornal Internacional de Relatórios de Casos Médicos**, p. 337-344, 2015.

DINIZ, Debora; MEDEIROS, Marcelo; MADEIRO, Alberto. Pesquisa nacional de aborto 2016. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 653-660, 2017.

DOMINGUES, Rosa Maria Soares Madeira et al. Prevalência e fatores associados ao aborto induzido no ingresso em uma coorte de mulheres vivendo com HIV/aids, Rio de Janeiro, Brasil, 1996-2016. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, 2020.

EGBUJOR, Melford Chuka et al. "An Overview of NRF2-Activating Compounds Bearing $\alpha\beta$ -Unsaturated Moiety and Their Antioxidant Effects." **International journal of molecular sciences**. vol. 23,15 8466, 2022.

EROGLU, Semra; ASGIN, Nergis. Bacterial vaginosis and Mycoplasma infections in reproductive-age women: Clarifying the association with risk factors. **Clínica e Investigación en Ginecología y Obstetricia**, v. 49, n. 4, p. 100769, 2022.

FARSIMADAN M, MOTAMEDIFAR M. The effects of human immunodeficiency virus, human papillomavirus, herpes simplex virus-1 and -2, human herpesvirus-6 and -8, cytomegalovirus, and hepatitis B and C virus on female fertility and pregnancy. *Br J Biomed Sci*. v.78, p.1-11, 2021.

FARHADIFAR, Fariba et al. Survey on association between Mycoplasma hominis endocervical infection and spontaneous abortion using Polymerase Chain Reaction. **International Journal of Reproductive BioMedicine**, v. 14, n. 3, p. 181, 2016.

FIUZA, Carla; MORAIS, Paloma Benigno. Aspectos imunológicos essenciais na gestação regular. **J Applied Pharm Sci**, v. 4, n. 3, p. 42-51, 2017.

FRANÇA, Adson et al. Atenção humanizada ao abortamento. Norma técnica. 2005.

FREITAS, Letícia Fernanda Q. et al. Prevalência de microrganismos em fortalecer vaginal de gestantes de alto risco de uma maternidade em Caruaru, Pernambuco. Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 56, 2020.

FRENZER, Carole et al. Adverse pregnancy and perinatal outcomes associated with Mycoplasma genitalium: systematic review and meta-analysis. **Sexually transmitted infections**, v. 98, n. 3, p. 222-227, 2022.

GALLINI, Francesca et al. Maternal Ureaplasma/Mycoplasma colonization during pregnancy and neurodevelopmental outcomes for preterm infants. **Frontiers in Pediatrics**, v. 10, p. 893812, 2022.

GAO, Ya-Ling et al. Infection status of human parvovirus B19, cytomegalovirus and herpes simplex Virus-1/2 in women with first-trimester spontaneous abortions in Chongqing, China. **Virology journal**, v. 15, p. 1-8, 2018.

GARCIA, Aparecida Gomes Pinto et al. Infecção materna por Chlamydia trachomatis associada a aborto fetal. 1994.

- GHNEIM HK, ALSHEBLYI MM. Biochemical Markers of Oxidative Stress in Saudi Women with Recurrent Miscarriage. *J Korean Med Sci*. v. 31, n. 1, pág. 98-105, 2016.
- GHNEIM, Hazem K. et al. Superoxide dismutase activity and gene expression levels in Saudi women with recurrent miscarriage. *Molecular medicine reports*. v. 13, n. 3, pág. 2606-2612, 2016.
- GIAKOUMELOU, Sevi et al. The role of infection in miscarriage. **Human reproduction update**, v. 22, n. 1, p. 116-133, 2016.
- GNANADURAI, Roshina; FIFER, Helen. Mycoplasma genitalium: a review. **Microbiology**, v. 166, n. 1, p. 21-29, 2020.
- GONÇALVES, Bárbara Rocha et al. O IMPACTO DO USO DE PROGESTERONA EM AMEAÇA DE ABORTO—UMA REVISÃO SISTEMÁTICA. **REVISTA SAÚDE MULTIDISCIPLINAR**, v. 5, n. 1, 2019.
- GREWAL, Karen; MACINTYRE, David A.; BENNETT, Phillip R. The reproductive tract microbiota in pregnancy. **Bioscience Reports**, v. 41, n. 9, p. BSR20203908, 2021.
- GUERRERO, Beatriz et al. Natural killer cells in recurrent miscarriage: An overview. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 142, p. 103209, 2020.
- HARISA GI. Benfotiamine enhances antioxidant defenses and protects against cisplatin-induced DNA damage in nephrotoxic rats. *J Biochem Mol Toxicol*. v.27, p. 398-405, 2013.
- HARRIS, Craig; HANSEN, Jason M. Nr2-Mediated Resistance to Oxidant-Induced Redox Disruption in Embryos. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 95, n. 3, p. 213-218, 2012.
- HE, Long et al. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 532-553, 2017..
- HERNANDEZ, Isabelle et al. NADPH oxidase is the major source of placental superoxide in early pregnancy: Association with MAPK pathway activation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 13962, 2019.
- HEYDARIFARD, Zahra et al. Potential role of viral infections in miscarriage and insights into the underlying molecular mechanisms. **Congenital Anomalies**, v. 62, n. 2, p. 54-67, 2022.
- HORNUNG, S. et al. Role of Chlamydia trachomatis and emerging Chlamydia-related bacteria in ectopic pregnancy in Vietnam. **Epidemiology & Infection**, v. 143, n. 12, p. 2635-2638, 2015.
- Hussain, Tarique et al. “Understanding the Immune System in Fetal Protection and Maternal Infections during Pregnancy.” *Journal of immunology research* vol. 2022. 2022
- HUSSAIN, Tarique et al. The role of oxidative stress and antioxidant balance in pregnancy. **Mediators of Inflammation**, v. 2021, p. 1-11, 2021.

IŞIK, Gözde et al. Bacterial vaginosis in association with spontaneous abortion and recurrent pregnancy losses. **Journal of Cytology/Indian Academy of Cytologists**, v. 33, n. 3, p. 135, 2016.

JESUS, Joana Darck Pessoa et al. Infecção por Gardnerella vaginalis: Principais faixas etárias e controle de resposta inflamatória Infecção por Gardnerella vaginalis: Principais faixas etárias e mecanismos de resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, v. 4, n. 5, pág. 23162-23175, 2021.

JIAO, Xuejuan et al. Alteration of vaginal microbiota in patients with recurrent miscarriage. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 42, n. 2, p. 248-255, 2022.

JONDUO, Marinho Emely et al. Adverse pregnancy and birth outcomes associated with Mycoplasma hominis, Ureaplasma urealyticum and Ureaplasma parvum: a systematic review and meta-analysis. **BMJ open**, v. 12, n. 8, p. e062990, 2022.

JOO, Eun Hui et al. Effect of endogenic and exogenic oxidative stress triggers on adverse pregnancy outcomes: preeclampsia, fetal growth restriction, gestational diabetes mellitus and preterm birth. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 18, p. 10122, 2021.

JULIANA, Naomi CA et al. The natural course of chlamydia trachomatis, neisseria gonorrhoeae, trichomonas vaginalis, and mycoplasma genitalium in pregnant and post-delivery women in pemba island, Tanzania. **Microorganisms**, v. 9, n. 6, p. 1180, 2021.

JUNQUEIRA, Jader Joel Machado; SANCHO, Talita Marçal; SANTOS, Vera Aparecida dos. Citomegalovírus: revisão dos aspectos epidemiológicos, clínicos, diagnósticos e de tratamento. **NewsLab**, v. 86, p. 88-104, 2008.

KALIA, Namarta; SINGH, Jatinder; KAUR, Manpreet. Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: a critical review. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 19, n. 1, p. 1-19, 2020.

KESHAVARZ, Pardis et al. Alterations in lipid profile, zinc and copper levels and superoxide dismutase activities in normal pregnancy and preeclampsia. **The American journal of the medical sciences**, v. 353, n. 6, p. 552-558, 2017.

KIKHNEY, J. et al. Is Ureaplasma spp. the leading causative agent of acute chorioamnionitis in women with preterm birth?. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 2, p. 119. e1-119. e7, 2017.

KNÖFLER, Martin et al. Human placenta and trophoblast development: key molecular mechanisms and model systems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, p. 3479-3496, 2019.

KOKKAYIL, P.; DHAWAN, B. Ureaplasma: current perspectives. **Indian journal of medical microbiology**, v. 33, n. 2, p. 205-214, 2015.

KUMAR, Manoj et al. Vaginal microbiota and cytokine levels predict preterm delivery in Asian women. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 639665, 2021.

- LARSEN, Bryan; HWANG, Joseph. Mycoplasma, Ureaplasma, and adverse pregnancy outcomes: a fresh look. **Infectious diseases in obstetrics and gynecology**, v. 2010, 2010.
- LIAO, Su-Lan; RAUNG, Shue-Ling; CHEN, Chun-Jung. Japanese encephalitis virus stimulates superoxide dismutase activity in rat glial cultures. **Neuroscience letters**, v. 324, n. 2, p. 133-136, 2002.
- LUCCA, Leidiane de et al. **Estudo longitudinal do perfil oxidativo em gestantes saudáveis e com complicações gestacionais**. 2019. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Maria.
- MAIA, Jesiane Rocha et al. Fatores que determinam o desenvolvimento da doença inflamatória pélvica. **DêCiência em Foco**, v. 5, n. 1, p. 77-89, 2021.
- MATASARIU, Daniela Roxana et al. Genital infection with Ureaplasma urealyticum and its effect on pregnancy. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 23, n. 1, p. 1-7, 2022.
- MAVROGIORGOS, Nikolaos et al. Activation of NOD receptors by Neisseria gonorrhoeae modulates the innate immune response. **Innate immunity**, v. 20, n. 4, p. 377-389, 2014.
- MEGLI, Christina J.; COYNE, Carolyn B. Infections at the maternal–fetal interface: an overview of pathogenesis and defence. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 67-82, 2022.
- MEŠTROVIĆ, Tomislav; LJUBIN-STERNAK, Sunčanica. Molecular mechanisms of Chlamydia trachomatis resistance to antimicrobial drugs. **Frontiers in bioscience**, v. 23, p. 656-670, 2018.
- MIRANDA, Angélica Espinosa et al. Protocolo Brasileiro de Infecções Sexualmente Transmissíveis, 2020: infecções que causam cervicite. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, 2020.
- MIYAGAMI, Satoshi et al. Physiological changes in the pattern of placental gene expression early in the first trimester. **Reproductive Sciences**, v. 20, n. 6, p. 710-714, 2013.
- MŁYNARCZYK-BONIKOWSKA, Beata et al. Multiresistant Neisseria gonorrhoeae: a new threat in second decade of the XXI century. **Medical microbiology and immunology**, v. 209, p. 95-108, 2020.
- MOR, Gil; CARDENAS, Ingrid. The immune system in pregnancy: a unique complexity. **American journal of reproductive immunology**, v. 63, n. 6, p. 425-433, 2010.
- MOREIRA, Catarina. Desenvolvimento embrionário humano. **Revista de Ciência Elementar**, v. 2, n. 4, 2014.
- MORENO-FLORES, Antonio et al. Corioamnionitis por Ureaplasma parvum: a propósito de un caso. **Advances in Laboratory Medicine/Avances en Medicina de Laboratorio**, v. 4, n. 1, p. 130-132, 2023.

MORRILL, Sydney; GILBERT, Nicole M.; LEWIS, Amanda L. Gardnerella vaginalis as a cause of bacterial vaginosis: appraisal of the evidence from in vivo models. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 168, 2020.

MYATT, Leslie; CUI, Xiaolan. Oxidative stress in the placenta. **Histochemistry and cell biology**, v. 122, p. 369-382, 2004.

NAGARAJAPPA, Chandrakala et al. Urinary protein carbonyl levels and its correlation with protein misfolding in preeclampsia. **Hypertension in pregnancy**, v. 38, n. 2, p. 124-128, 2019.

NEGI, Reena e cols. Oligoelementos e enzimas antioxidantes associados ao estresse oxidativo em mães pré-eclâmpticas/eclâmpticas durante a circulação fetal. **Nutrição clínica**, v. 31, n. 6, pág. 946-950, 2012.

NIGRO, Giovanni et al. Role of the infections in recurrent spontaneous abortion. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 24, n. 8, p. 983-989, 2011.

NYE, Melinda B. et al. Prevalence of Mycoplasma genitalium infection in women with bacterial vaginosis. **BMC Women's Health**, v. 20, n. 1, p. 1-5, 2020.

OLIVEIRA, Caline Novais Teixeira et al. Ureaplasma parvum alters the immune tolerogenic state in placental tissue and could cause miscarriage. **Fertil Steril**. v.116, n. 4, pág. 1030-1039, 2021.

OLIVEIRA, C. N. T. et al. Association of spontaneous abortion and Ureaplasma parvum detected in placental tissue. **Epidemiology & Infection**, v. 148, 2020.

PEDER, Leyde Daiiane et al. Infecções genitais e fatores de risco em gestantes atendidas em um serviço de saúde pública. **Espaço para Saúde**, v. 19, n. 1, p. 82-90, 2018.

PENDÁS, Bertha Victoria et al. Micoplasma hominis y Ureaplasma spp en mujeres que consultan por infertilidad. **Revista Cubana de Endocrinología**, v. 30, n. 3, 2019.

PEREIRA, Benedito. Radicais livres de oxigênio e sua importância para a funcionalidade imunológica. **Motriz. Journal of Physical Education. UNESP**, p. 71-79, 1996.

PEREIRA, Flávia Leandra de Oliveira. **Prevalência de Vulvovaginites em mulheres grávidas: Protocolo Revisão de Escopo**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2022.

PERETZ, Avi et al. Carga de Mycoplasma e Ureaplasma em mulheres grávidas: a prevalência da transmissão da mãe para o recém-nascido. **BMC Gravidez e Parto**, v. 20, n. 1, pág. 1-7, 2020.

POSTON, L.; RAIJMAKERS, M. T. M. Trophoblast oxidative stress, antioxidants and pregnancy outcome—a review. **Placenta**, v. 25, p. S72-S78, 2004.

QUILLIN, Sarah Jane; SEIFERT, H. Steven. Neisseria gonorrhoeae host adaptation and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 226-240, 2018.

RAMAZANZADEH, Rashid et al. A Case–control study on the relationship between Mycoplasma genitalium infection in women with normal pregnancy and spontaneous abortion using polymerase chain reaction. **Osong public health and research perspectives**, v. 7, n. 5, p. 334-338, 2016.

RAY, Ankita et al. Aberrant gene expression of superoxide dismutases in Chlamydia trachomatis-infected recurrent spontaneous aborters. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 14688, 2022.

RESENDE, Angelina Freire et al. Prevalência de vaginose bacterianas em pacientes que realizaram bacterioscopia de secreção vaginal. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 18, n. 2, p. 190-193, 2019.

RIBEIRO, Flávia Regina Guedes; SPINK, Mary Jane Paris. Interpretative repertoires in the controversy on the legalization of abortion of anencephalic fetuses. **Psicologia & Sociedade**, v. 23, p. 63-71, 2011.

ROLFO, Alessandro et al. Increased placental anti-oxidant response in asymptomatic and symptomatic COVID-19 third-trimester pregnancies. **Biomedicines**, v. 10, n. 3, p. 634, 2022.

ROSA, Sirlene Célia Pereira et al. Aumento de interferon gama no aborto recorrente: uma revisão sistemática. 2020.

ROSSANT, Janet; TAM, Patrick PL. Early human embryonic development: blastocyst formation to gastrulation. **Developmental cell**, v. 57, n. 2, p. 152-165, 2022.

RUFO, Gómez et al. Clinical implications of the genus Mycoplasma. **Revista Espanola de Quimioterapia: Publicacion Oficial de la Sociedad Espanola de Quimioterapia**, v. 34, n. 3, p. 169-184, 2021.

SANCHEZ-RODRIGUEZ MA, MARTINEZ-CRUZ M, COOREAMUNOZ E, MENDOZA VM. Relationship between ~ metabolic syndrome components and oxidative stress in elderly community-dwelling Mexicans. *Ann Nutr Metab*.v.4,p. 302-307, 2010.

SAHA, Sarmistha et al. An overview of Nrf2 signaling pathway and its role in inflammation. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5474, 2020.

SANTOS, Carla Cristian et al. Prevalência de infecções urinárias e do trato genital em gestantes atendidas em Unidades Básicas de Saúde. **Revista de Ciências Médicas**, v. 27, n. 3, p. 101-113, 2018.

SCHMITT, Guillaume et al. Oxidative stress status and vitamin D levels of asymptomatic to mild symptomatic COVID-19 infections during the third trimester of pregnancy: A retrospective study in Metz, France. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 5, p. 2167-2173, 2022.

SCHOOTS, Mirthe H. et al. Oxidative stress in placental pathology. **Placenta**, v. 69, p. 153-161, 2018.

SCOULLAR, Michelle JL et al. Mycoplasma genitalium and other reproductive tract infections in pregnant women, Papua New Guinea, 2015–2017. **Emerging infectious diseases**, v. 27, n. 3, p. 894, 2021.

SHI, Ting-li et al. The risk of herpes simplex virus and human cytomegalovirus infection during pregnancy upon adverse pregnancy outcomes: A meta-analysis. **Journal of Clinical Virology**, v. 104, p. 48-55, 2018.

SIES, Helmut. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox biology**, v. 4, p. 180-183, 2015.

SILVA, Cláudia Rebouças da. Incidência de infecções por Gardnerella vaginalis em mulheres sexualmente ativas: Um levantamento de laudos citológicos. 2021.

SOGLIA, Francesca; PETRACCI, Massimiliano; ERTBJERG, Per. Novel DNPH-based method for determination of protein carbonylation in muscle and meat. **Food chemistry**, v. 197, p. 670-675, 2016.

SOUZA JÚNIOR, Edison Vitório de et al. Internações e custos hospitalares por aborto espontâneo na Bahia, Brasil. *Rev. Pesqui(Univ. Fed. Estado Rio J., Online)*, p. 767-773, 2020.

SOUZA, Danilo França de. **Avaliação do equilíbrio oxidativo na gestação e perinatologia equina**. 2017. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SPRONG, Kaitlin Elizabeth et al. Ureaplasma species and preterm birth: current perspectives. **Critical reviews in microbiology**, v. 46, n. 2, p. 169-181, 2020.

SULZBACHER, Maicon Machado; LUDWIG, Mirna Stela; HECK, Thiago Gomes. Estresse oxidativo e diminuição de HSP70 tecidual envolvidos na gênese da sepse: HSP70 como alvo terapêutico. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 32, p. 585-591, 2020.

SWEENEY, Emma L. et al. The human Ureaplasma species as causative agents of chorioamnionitis. **Clinical microbiology reviews**, v. 30, n. 1, p. 349-379, 2017.

TABLA, Victoria; GUTIÉRREZ, Félix. Cervicitis: etiología, diagnóstico y tratamiento. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 37, n. 10, p. 661-667, 2019.

TANG, Weiming et al. Pregnancy and fertility-related adverse outcomes associated with Chlamydia trachomatis infection: a global systematic review and meta-analysis. **Sexually transmitted infections**, v. 96, n. 5, p. 322-329, 2020.

TANTENGCO, Ourlad Alzeus G. et al. Inflammatory response elicited by Ureaplasma parvum colonization in human cervical epithelial, stromal, and immune cells. **Reproduction**, v. 163, n. 1, p. 1-10, 2022.

TARAVATI, Ali; TOHIDI, Fatemeh. Comprehensive analysis of oxidative stress markers and antioxidants status in preeclampsia. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 57, n. 6, p. 779-790, 2018.

TAYLOR-ROBINSON, D.; LAMONT, R. F. Mycoplasmas in pregnancy. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 118, n. 2, p. 164-174, 2011.

TRUE, Heather et al. Monocytes and macrophages in pregnancy: The good, the bad, and the ugly. **Immunological Reviews**, v. 308, n. 1, p. 77-92, 2022.

TUERLINCKX, Patrícia da Silva. **Aborto espontâneo em mulheres residentes nas proximidades do parque industrial do município do Rio Grande/RS**. Dissertação de Mestrado. 2005.

UNEMO, Magnus et al. WHO global antimicrobial resistance surveillance for *Neisseria gonorrhoeae* 2017–18: a retrospective observational study. **The Lancet Microbe**, v. 2, n. 11, p. e627-e636, 2021.

VANNUCCHI, Helio et al. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 31, n. 1, p. 31-44, 1998.

WAITES, Ken B.; KATZ, Brenda; SCHELONKA, Robert L. Mycoplasmas and ureaplasmas as neonatal pathogens. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 4, p. 757-789, 2005.

WALDORF, Kristina M. Adams; MCADAMS, Ryan M. Influence of infection during pregnancy on fetal development. **Reproduction**, v. 146, n. 5, p. R151-R162, 2013.

WANG, Fuyan et al. Biology and pathology of the uterine microenvironment and its natural killer cells. **Cellular & molecular immunology**, v. 18, n. 9, p. 2101-2113, 2021.

WATANABE, Maria Angelica Ehara et al. Gestação: um desafio imunológico. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 35, n. 2, p. 147-162, 2014.

WITKIN, Steven S. et al. Chlamydia trachomatis: the persistent pathogen. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 24, n. 10, p. e00203-17, 2017.

WONG, Yin Ping et al. Gardnerella vaginalis in perinatology: An overview of the clinicopathological correlation. **The Malaysian journal of pathology**, v. 40, n. 3, p. 267-286, 2018.

YAMAMOTO-TABATA, Takako et al. Human cytomegalovirus interleukin-10 downregulates metalloproteinase activity and impairs endothelial cell migration and placental cytotrophoblast invasiveness in vitro. **Journal of virology**, v. 78, n. 6, p. 2831-2840, 2004.

YU, Miao et al. Nuclear factor p65 interacts with Keap1 to repress the Nrf2-ARE pathway. **Cellular signalling**, v. 23, n. 5, p. 883-892, 2011.

YUEYUE, Wu et al. Pathogenicity and virulence of Mycoplasma genitalium: Unraveling Ariadne's Thread. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 1161-1183, 2022.

ZEJNULLAHU, Vjosa A.; ZEJNULLAHU, Valon A.; KOSUMI, Ernad. The role of oxidative stress in patients with recurrent pregnancy loss: a review. **Reproductive Health**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2021.

ZENG, Mengyao et al. Preconception reproductive tract infections status and adverse pregnancy outcomes: a population-based retrospective cohort study. **BMC Pregnancy and Childbirth**, v. 22, n. 1, p. 501, 2022.

ZHAI, Jinglei et al. Human embryonic development: from peri-implantation to gastrulation. **Trends in cell biology**, v. 32, n. 1, p. 18-29, 2022.

ANEXO I- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade Federal da Bahia

Instituto Multidisciplinar em Saúde

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

ESTUDO: Avaliação da Participação de *Mollicutes* e outros microrganismos de interesse genital na etiopatogênese de abortos espontâneos.

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.

Estou ciente que:

- I) O projeto “**Avaliação da Participação de *Mollicutes* e outros microrganismos de interesse genital na etiopatogênese de abortos espontâneos**” é importante para que se possam descobrir as possíveis causas do aborto espontâneo;
- II) O objetivo deste trabalho é detectar bactérias genitais e em placenta de mulheres que apresentaram aborto espontâneo para a investigação de possível participação destas bactérias na causa do aborto espontâneo.
- III) Serei questionado (a) sobre idade, renda, escolaridade, história de minha menstruação e gestações (caso tenha tido anteriormente), história sexual e presença de algum sintoma ginecológico.
- IV) Não participarão do estudo mulheres com idade inferior a 18 anos e superior a 40 anos, gestação inferior a 10 semanas, ter usado antibióticos há duas semanas atrás, ter diabetes, hipertensão e alterações hormonais, aborto recorrente com diagnóstico médico de anormalidade registrado em prontuário e aborto provocado pela própria gestante. A enfermeira Caline Novais Teixeira Oliveira estará presente durante todo o momento de aplicação do questionário para o esclarecimento de eventuais dúvidas;
- V) Serão feitas coletas de amostra da vagina e da placenta e pela enfermeira Caline Novais Teixeira Oliveira.
- VI) Para a coleta da placenta será aguardado a eliminação normal da placenta pela gestante e posteriormente será retirado uma parte com bisturi estéril deste tecido. Esta coleta será realizada pela enfermeira Caline Novais Teixeira Oliveira.
- VII) Para coleta de amostra da vagina será utilizado *swab* (espécie de cotonete de tamanho maior) estéril individual que será retirado do seu envoltório apenas no momento da coleta do material. Esta coleta acontecerá após a eliminação da placenta, onde passará de forma suave na vagina em movimento circular sem nenhum risco de lesão e será realizada pela enfermeira Caline Novais Teixeira Oliveira;
- VIII) Caso no momento da entrevista sinta cansaço ou fadiga informarei para a pesquisadora a necessidade de parar e retomar em um outro momento que eu desejar, sendo que esta entrevista poderá ser realizada antes ou depois da coleta da placenta e caso eu queria participar do serviço de psicologia do hospital avisarei a pesquisadora para ela avise ao serviço da minha necessidade;
- IX) A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me trará qualquer despesa financeira com relação aos procedimentos efetuados no estudo;
- X) Tenho a liberdade de desistir ou de parar a minha colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- XI) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico;
- XII) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo em todas as fases do estudo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- XIII) 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.
- XIV) Poderei falar com a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – IMS/UFBA -, no telefone (77) 3429-2720 (e-mail: cepims@ufba.br) ou (77) 3429-2719/ lucasm@ufba.br) ou (77) 99160-8347 / calinenovais@yahoo.com.br) para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo;
- XV) Deverei assinar todas as folhas deste Termo – TCLE - na última página;
- XVI) O pesquisador responsável deverá da mesma forma, assinar todas as folhas do Termo na última página;
- XVII) Resolução CNS 466/12 - Estou recebendo uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

DECLARAÇÃO

Eu, _____,
profissão _____, residente e domiciliado na

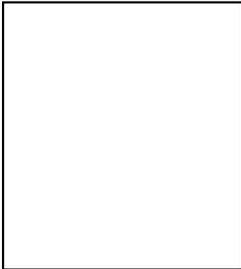
_____, nascido(a) em ____ / ____ / _____,

abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo “**Avaliação da Participação de *Mollicutes* e outros microorganismos de interesse genital na etiopatogênese de abortos espontâneos.**”. Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Vitória da Conquista, BA.....de.....de 20.....

() Paciente / () Responsável

Impressão Datiloscópica:



Responsável pelo

Projeto:

PROF. DR. LUCAS MIRANDA MARQUES

ANEXO II- Questionário

PARTE 1 – PERFIL SOCIODEMOGRÁFICO

1 NÚMERO:
2 NOME:
3 IDADE (anos completos):
4 SITUAÇÃO CONJUGAL: a () COM COMPANHEIRO b () SEM COMPANHEIRO
5 PROCEDÊNCIA: a () ZONA RURAL b () ZONA URBANA
6 COR: a () BRANCA b () PARDA c () PRETA d () AMARELA e () INDÍGENA
7 RELIGIÃO: a () EVANGÉLICA b () CATÓLICA c () ESPÍRITA d () NENHUMA e () OUTRA
8 ESCOLARIDADE: a () NENHUMA b () DE 1 a 3 ANOS c () DE 4 a 7 ANOS d () DE 8 a 11 ANOS e () DE 12 A MAIS ANOS f () IGNORADO
9 RENDA: () < 1 SALÁRIO () 1 SALÁRIO () 1 A 2 SALÁRIOS () 2 A 3 SALÁRIOS () 3 A 4 SALÁRIOS () > 4 SALÁRIOS

PARTE 2 – HÁBITOS DE VIDA

10 QUANTOS DIAS DA SEMANA A SENHORA COSTUMA COMER OS SEGUINTE ALIMENTOS: a () CARNE b () FRUTA c () LEGUMES d () VERDURAS e () LEITE E DERIVADOS
11 DURANTE A GESTAÇÃO A SENHORA MUDOU O CONSUMOS DOS ALIMENTOS (HÁBITOS ALIMENTARES)? a () SIM b () NÃO SE SUA RESPOSTA FOI SIM SEGUE RESPONDENDO SE SUA RESPOSTA FOR NÃO PULE PARA A QUESTÃO 13
12 DURANTE A GESTAÇÃO QUANTOS DIAS DA SEMANA A SENHORA COSTUMA COMER OS SEGUINTE ALIMENTOS: a () CARNE b () FRUTA c () LEGUMES d () VERDURAS e () LEITE E DERIVADOS
13 A SENHORA PRÁTICA ATIVIDADE FÍSICA? a () SIM b () NÃO SE SUA RESPOSTA FOI SIM SEGUE RESPONDENDO SE SUA RESPOSTA FOR NÃO PULE PARA A QUESTÃO 16
14 QUANTOS DIAS NA SEMANA A SENHORA REALIZA ATIVIDADE FÍSICA? a () 1 a 2 DIAS b () 3 a 5 DIAS c () TODOS OS DIAS
15 QUAL TIPO DE ATIVIDADE FÍSICA A SENHORA PRÁTICA? a () CAMINHADA b () CORRIDA c () MUSCULAÇÃO d () NATAÇÃO e () PILATES f () ATIVIDADES EM GRUPO (futebol, basquete, vôlei)
16 A SENHORA INGERE BEBIDA ALCÓOLICA? a () SIM b () NÃO SE SUA RESPOSTA FOI SIM SEGUE RESPONDENDO SE SUA RESPOSTA FOR NÃO PULE PARA A QUESTÃO 20
17 COM QUAL FREQUÊNCIA A SENHORA COSTUMA INGERIR BEBIDA ALCÓOLICA? a () TODOS OS DIAS b () 1 VEZ POR SEMANA c () 2 VEZES OU MAIS POR SEMANA d () MENOS DE UMA VEZ POR MÊS e () UMA VEZ OU MAIS POR MÊS
18 QUANDO A SENHORA INGERE BEBIDA ALCÓOLICA, QUANTAS DOSES COSTUMA CONSUMIR? _____ DOSES OBS: (1 DOSE DE BEBIDA ALCÓOLICA EQUIVALE A 1 LATA DE CERVEJA, 1 TAÇA DE VINHO OU 1 DOSE DE CACHAÇA, WHISKY OU QUALQUER OUTRA BEBIDA ALCÓOLICA DESTILADA)
19 NOS ÚLTIMOS 30 DIAS A SENHORA CHEGOU A CONSUMIR 4 OU MAIS DOSES DE BEBIDA ALCÓOLICA EM UMA ÚNICA OCASIÃO? a () SIM b () NÃO
20 A SENHORA FUMA? a () SIM b () NÃO SE SUA RESPOSTA FOI SIM SEGUE RESPONDENDO SE SUA RESPOSTA FOR NÃO PULE PARA A QUESTÃO 23
21 QUANTOS CIGARROS A SENHORA COSTUMA USAR POR DIA? _____ CIGARROS
22 QUAL TIPO DE CIGARRO A SENHORA COSTUMA USAR? a () PALHA (FUMO) b () CACHIMBO c () BRANCO

PARTE 3 – ANTECEDENTES PATOLÓGICOS

23 A SENHORA APRESENTA AS SEGUINTE ALTERAÇÕES? a () MIOMAS UTERINOS b () SÍNDROME DOS OVÁRIOS POLICÍSTICOS c () OUTRA ALTERAÇÃO GINECOLÓGICA (especificar) d () NÃO APRESENTA ALTERAÇÕES
24 A SENHORA TEM OU TEVE DOENÇA SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEL? a () SIM b () NÃO SE SUA RESPOSTA FOI SIM SEGUE RESPONDENDO SE SUA RESPOSTA FOR NÃO PULE PARA A QUESTÃO 26
25 A SENHORA REALIZOU OU REALIZA O TRATAMENTO DA DOENÇA SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEL? a () SIM b () NÃO

PARTE 4 – CARACTERÍSTICAS MENSTRUAIS

26 QUAL A IDADE DA SUA PRIMEIRA MENSTRUÇÃO? _____

27 QUAL A DATA DA SUA ÚLTIMA MENSTRUACÃO? _____

28 SUA MENSTRUACÃO É REGULAR?

a () SIM b () NÃO

29 SUA MENSTRUACÃO DURA EM MÉDIA QUANTOS DIAS? _____

30 QUAL O VOLUME DO SEU FLUXO MESTRUAL?

a () POUCO b () MODERADO c () FORTE/INTENSO

PARTE 5 – HISTÓRICO SEXUAL

31 QUAL A IDADE DA SUA PRIMEIRA RELAÇÃO SEXUAL? _____

32 TEVE MAIS DE UM PARCEIRO SEXUAL DURANTE A VIDA? () SIM () NÃO

33 QUANTIDADE DE PARCEIRO SEXUAL NOS ÚLTIMOS 3 MESES? _____

34 A SENHORA SENTE DOR AO TER RELAÇÃO SEXUAL?

() SIM () NÃO

35 A SENHORA TEM SANGRAMENTO DURANTE A RELAÇÃO SEXUAL?

() SIM () NÃO

36 A SENHORA USA PRESERVATIVO DURANTE A RELAÇÃO SEXUAL?

a () SIM b () NÃO c () ÀS VEZES d () USOU MENOS DA METADE DAS VEZES
e () USOU MAIS DA METADE DAS VEZES

37 QUAL FOI O ANO DO SEU ÚLTIMO EXAME GINECOLÓGICO? _____

PARTE 6 – HISTÓRICO OBSTÉTRICO

38 NÚMERO DE GESTAÇÕES _____

39 NÚMERO DE ABORTOS ESPONTANEOS _____

40 NÚMERO DE ABORTOS PROVOCADOS _____

41 NÚMERO DE PARTOS PREMATUROS _____

42 NÚMERO DE PARTOS A TERMO NATURAIS _____

43 NÚMERO DE PARTOS A TERMO ARTIFICIAIS (CESARIANA) _____

44 QUANTIDADE DE BEBÊS NASCIDOS VIVOS? _____

45 QUANTIDADE DE NASCIDO MORTOS? _____

46 ANO DO ÚLTIMO PARTO _____

PARTE 7 – HISTÓRICO DE GESTAÇÃO ATUAL

47 REALIZOU PRÉ NATAL?

a () SIM b () NÃO

SE SUA RESPOSTA FOI SIM SEGUE RESPONDENDO

SE SUA RESPOSTA FOR NÃO PULE PARA A QUESTÃO 49

48 QUANTAS CONSULTAS DE PRÉ NATAL REALIZOU? _____

49 A SUA GRAVIDEZ ATUAL FOI PLANEJADA?

a () SIM b () NÃO

PARTE 8 – SINTOMAS APRESENTADOS NOS ÚLTIMOS 3 MESES

50 A SENHORA APRESENTA OU APRESENTOU NOS ÚLTIMOS 3 MESES CORRIMENTO VAGINAL?

a () SIM b () NÃO

SE SUA RESPOSTA FOI SIM SEGUE RESPONDENDO

SE SUA RESPOSTA FOR NÃO PULE PARA A QUESTÃO 53

51 QUAL A CARACTERÍSTICA DO SEU CORRIMENTO?

a () AMARELADO b () BRANCO c () AMARELO ESVERDEADO d () OUTROS(especificar)

52 QUAL O CHEIRO/ODOR DO SEU CORRIMENTO?

a () SEM CHEIRO b () FRACO c () FÉTIDO d () PEIXE PODRE

53 A SENHORA APRESENTA OU APRESENTOU NOS ÚLTIMOS 3 MESES COÇEIRA (PRURIDO)

a () SIM b () NÃO

54 A SENHORA APRESENTA OU APRESENTOU NOS ÚLTIMOS 3 MESES VERMELHIDÃO VAGINAL?

a () SIM b () NÃO

55 A SENHORA APRESENTA OU APRESENTOU NOS ÚLTIMOS 3 MESES DOR PELVICA (EM BAIXO VENTRE OU NO " PÉ DA BARRIGA")

a () SIM b () NÃO

56 A SENHORA APRESENTA OU APRESENTOU NOS ÚLTIMOS 3 MESES VERRUGAS GENITAIS?

a () SIM b () NÃO

57 A SENHORA APRESENTA OU APRESENTOU NOS ÚLTIMOS 3 MESES BOLHAS/ VESÍCULAS?

a () SIM b () NÃO

58 A SENHORA APRESENTA OU APRESENTOU NOS ÚLTIMOS 3 MESES FERIDAS/ULCERAS?

a () SIM b () NÃO

59 A SENHORA APRESENTA OU APRESENTOU NOS ÚLTIMOS 3 MESES DOR AO URINAR?

a () SIM b () NÃO

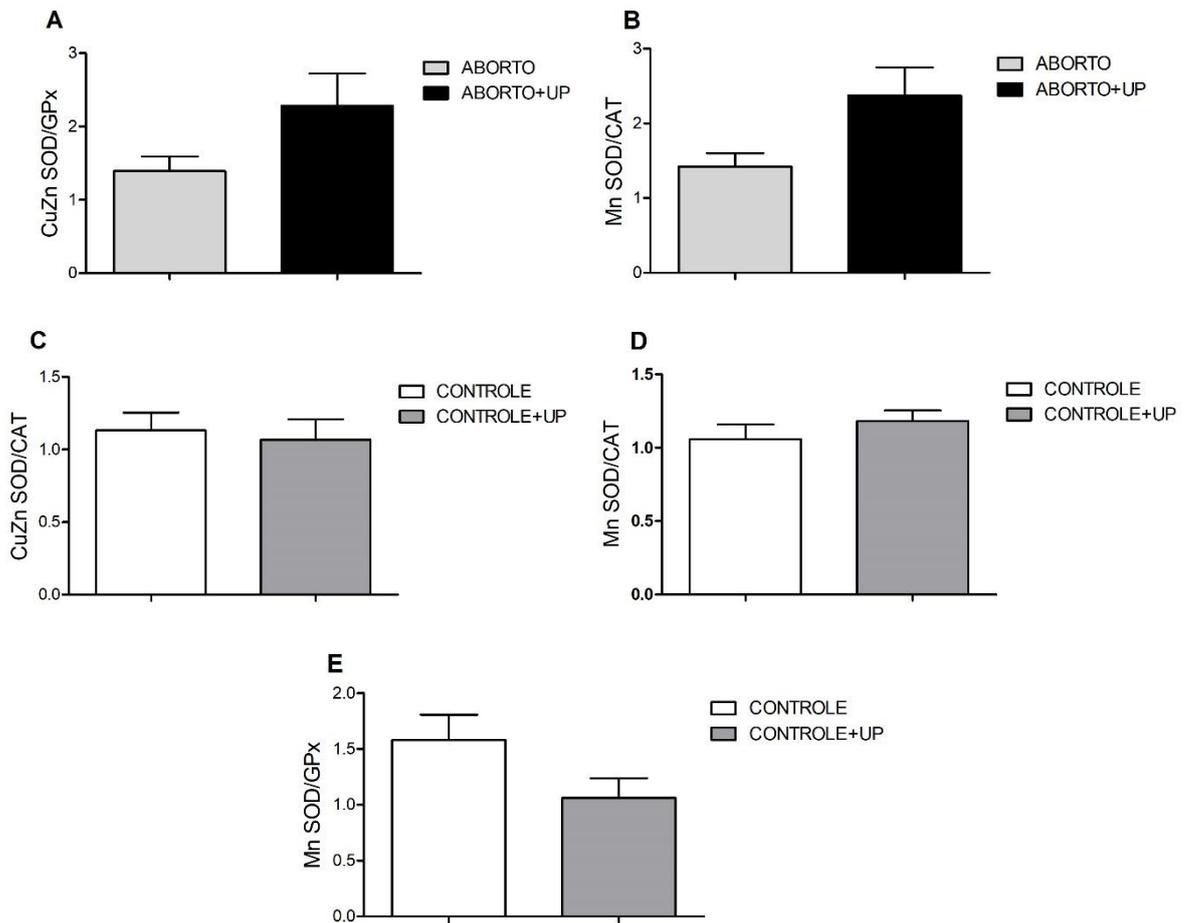
60 A SENHORA APRESENTA OU APRESENTOU NOS ÚLTIMOS 3 MESES INGUAS EM REGIÃO DE VERILHA (LINFADENOPATIA)?

a () SIM b () NÃO

61 A SENHORA APRESENTA OU APRESENTOU NOS ÚLTIMOS 3 MESES ALGUMA OUTRA ALTERAÇÃO?

ESPECIFICAR:

SUPLEMENTAR 1- Razão da expressão gênica de CuZn SOD/GPx (grupo aborto); Mn SOD/CAT (grupo aborto); CuZn SOD/CAT (grupo controle); Mn SOD/CAT (grupo controle) em condições distintas de infecção.



Legenda: Razão da expressão gênica de CuZn SOD/GPx; Mn SOD/GPx na concentração (U/mg de proteína). UP – *Ureaplasma parvum*. As análises foram feitas através do teste ANOVA, seguida pelo teste t de Student. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão. O dado foi considerado estatisticamente significante quando $p < 0,05$.