



JOZIANI BEGHINI JUNQUEIRA DE CARVALHO FERREIRA

**CONCENTRAÇÕES VAGINAIS DOS ISÔMEROS DO
ÁCIDO LÁTICO E DOS MEDIADORES BIOQUÍMICOS
DA RESPOSTA IMUNE NAS VULVOVAGINITES**

*VAGINAL CONCENTRATIONS OF LACTIC ACID
ISOMERS AND BIOCHEMICAL MEDIATORS OF THE
IMMUNE RESPONSE IN VULVOVAGINITIS*

**CAMPINAS
2015**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

JOZIANI BEGHINI JUNQUEIRA DE CARVALHO FERREIRA

**CONCENTRAÇÕES VAGINAIS DOS ISÔMEROS DO
ÁCIDO LÁTICO E DOS MEDIADORES BIOQUÍMICOS
DA RESPOSTA IMUNE NAS VULVOVAGINITES**

*VAGINAL CONCENTRATIONS OF LACTIC ACID
ISOMERS AND BIOCHEMICAL MEDIATORS OF THE
IMMUNE RESPONSE IN VULVOVAGINITIS*

Tese apresentada à Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Ciências da Saúde, área de concentração em Fisiopatologia Ginecológica

Thesis submitted to Gynecology and Obstetrics Post-Graduation Program of the Medical Sciences School of the University of Campinas for obtaining the title of Doctor of Health Sciences, specialization in Gynecological Pathophysiology

ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO CÉSAR GIRALDO
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ELEUTÉRIO JR

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA
JOZIANI BEGHINI JUNQUEIRA DE CARVALHO FERREIRA
E ORIENTADA PELO PROF. DR. PAULO CÉSAR GIRALDO**

Assinatura do Orientador

**CAMPINAS
2015**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

F413c Ferreira, Joziani Beghini Junqueira de Carvalho, 1980-
Concentrações vaginais dos isômeros do ácido láctico e dos mediadores bioquímicos da resposta imune nas vulvovaginites / Joziani Beghini Junqueira de Carvalho Ferreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Paulo César Giraldo.

Coorientador: José Eleutério Junior.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Vulvovaginite. 2. Leucócitos. 3. Ácido láctico. 4. Mediadores da inflamação. 5. Disbiose. 6. Vaginose bacteriana. 7. Candidíase vulvovaginal. I. Giraldo, Paulo César, 1956-. II. Eleutério Junior, José. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Vaginal concentrations of lactic acid isomers and biochemical mediators of the immune response in vulvovaginitis

Palavras-chave em inglês:

Vulvovaginitis

Leukocytes

Lactic acid

Inflammation mediators

Dysbiosis

Vaginosis, Bacterial

Candidiasis, Vulvovaginal

Área de concentração: Fisiopatologia Ginecológica

Titulação: Doutora em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Paulo César Giraldo [Orientador]

Lúcia Helena Simões da Costa Paiva

Adriana Orcesi Pedro

César Eduardo Fernandes

Newton Sérgio de Carvalho

Data de defesa: 31-07-2015

Programa de Pós-Graduação: Tocoginecologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA
JOZIANI BEGHINI JUNQUEIRA DE CARVALHO FERREIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. PAULO CÉSAR GIRALDO

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ELEUTÉRIO JR

MEMBROS:

1. Prof. Dr. Paulo César Giraldo

2. Prof^a. Dr^a. Lúcia Helena Simões da Costa Paiva

3. Prof^a. Dr^a. Adriana Orcesi Pedro

4. Prof. Dr. César Eduardo Fernandes

5. Prof. Dr. Newton Sérgio de Carvalho

**Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Data: 31 / 07 / 2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho...

*Aos meus pais, Tereza e Aroldo,
Por me presentearem com a vida,
E por serem exemplo de honestidade, luta e amor!*

*Ao meu amor, Luizinho,
Por dar sentido aos meus sonhos,
Por caminhar ao meu lado,
E me fazer feliz!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelos dons recebidos, coragem de lutar e pela alegria contagiante que ilumina meus caminhos!

Às pacientes do estudo, por confiarem em mim e contribuírem com esta conquista.

Ao Prof. Dr. Paulo César Giraldo, pela disponibilidade, paciência e carinho na orientação desta tese... você é um exemplo da “arte de ensinar”. Agradeço às inúmeras oportunidades e confiança ao longo deste período. Observar seu entusiasmo, força de vontade e raciocínio lógico consolidou minha crença de que somos capazes de conquistar, realmente, o que desejamos.

Ao Prof. Dr. Steven S. Witkin, Director of Division of Immunology and Infectious Diseases in the Department of Obstetrics and Gynecology of Weill Cornell Medical College, por me receber em seu laboratório, compartilhar seus conhecimentos, despertando em mim mais fascínio pela imunologia.

À AnnMarie Bongiovanni, Manager of Laboratory of Immunology and Infectious Diseases of Weill Cornell Medical College, pela receptividade, amizade e pelos valiosos ensinamentos no laboratório de pesquisas.

Ao meu coorientador e amigo Prof. Dr. José Eleutério Jr, a quem eu admiro pelo profissionalismo e competência. Obrigada pelo apoio e por colaborar com a realização deste estudo.

Aos Professores Doutores que aceitaram compor a banca examinadora da defesa, meu muito obrigada. Em especial, à Dra. Lúcia e Dra. Adriana, que contribuíram na qualificação da tese.

Às amigas do grupo de pesquisa do Ambulatório de Infecções Genitais Femininas: Rose, Nádia, Marcela, Helena, Virgínia, Ruth e Kate, com quem eu tive o prazer de compartilhar deliciosos momentos, os quais levarei para sempre na memória... Agradeço a amizade sincera e o companheirismo!

Aos fellows do Laboratório do Prof. Witkin: Faith, Lamis, Neil, Tommy e Giovanni, conviver com vocês foi um imenso prazer!

À Márcia, Creuza, Laine e Conceição, funcionárias do Ambulatório de Infecções Genitais Femininas, por fazerem nosso ambiente de trabalho tão agradável.

À Marcinha e Bia, secretárias da Divisão de Ginecologia, pela competência e boa vontade ao desempenharem seu papel e, especialmente à Márcia, pelo carinho.

Ao Eduardo e Samir, Departamento de Finanças, sempre tão gentis e prestativos, agradeço por toda ajuda e, principalmente, pelo auxílio na documentação de envio das amostras biológicas para os EUA. Vocês foram incríveis!

Ao Marcelo, Serviço de Estatística, pela gentileza em me ajudar prontamente com o término da análise estatística deste estudo.

Ao bibliotecário Claudinei, pela preciosa ajuda com a formatação da tese.

À Denise e Melissa (Secretárias da Pós-Graduação), Margareth (Secretária do Departamento de Tocoginecologia), Vanda (SAME) e Cylene (Revisora de Português ASTEC), pela cordialidade e profissionalismo. E... a todos aqueles que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

Ao Dr. Fernando Guimarães, querido amigo que encontrei nesta jornada... por participar dos ensinamentos iniciais que despertaram meu interesse pela pesquisa científica.

À minha amiga irmã Tati Nigro, por toda diversão, bate-papos, comilanças e, por me acolher com tanto carinho... meu muito obrigada!

Especialmente, a todos os meus familiares e amigos, que entenderam minha ausência, por muitas e muitas vezes, para conclusão do doutorado!

Agradecimento Institucional:

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento do projeto de pesquisa (projeto n°. 2011/19960-9).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo custeio da minha bolsa de estudos para o doutorado sanduíche na Weill Cornell Medical College (projeto n°. 4889-13-14).

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	vii
AGRADECIMENTOS	ix
SUMÁRIO	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xvii
SIGLAS E ABREVIATURAS	xxi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	29
2.1 Objetivo Geral	29
2.2 Objetivos Específicos	29
3. SUJEITOS E MÉTODOS	31
4. RESULTADOS	45
4.1 Artigo 1	46
4.2 Artigo 2	67
4.3 Artigo 3	84
5. DISCUSSÃO	107
6. CONCLUSÕES	121
7. REFERÊNCIAS	123
8. ANEXOS	139
8.1 Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	140
8.2 Anexo 2 – Parecer Comitê de Ética (CEP/FCM/Unicamp)	142
8.3 Anexo 3 – Instrumento para coleta de dados	147

RESUMO

Introdução: Os mecanismos de defesa da mucosa vaginal e a fisiopatologia das vulvovaginites têm se mostrado complexos e requerem a interação entre diversas substâncias. O papel da acidez vaginal, bem como a expressão de mediadores bioquímicos na luz vaginal necessitam ser melhor investigados para esclarecer as altas prevalências e recorrências das vulvovaginites. **Objetivo:** Avaliar as concentrações vaginais dos isômeros L e D do ácido láctico, EMMPRIN (indutor de metaloproteinase da matriz extracelular), MMP-8 (metaloproteinase da matriz extracelular-8), NGAL (lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos), HA (hialurona), Hyal-1 (hialuronidase-1) e hBD2 (β -defensina) em mulheres híginas e com vulvovaginites, correlacioná-los e verificar as associações com os leucócitos presentes na cavidade vaginal. **Sujeitos e Métodos:** Este estudo de corte transversal envolveu 233 mulheres atendidas no Ambulatório de Infecções Genitais da Unicamp no período de maio à novembro de 2013. Foram incluídas mulheres no menacme com e sem infecções genitais. Durante o exame ginecológico, coletou-se swab vaginal para análise microbiológica (bacterioscopia vaginal e cultura para fungos), além de material endocervical para pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria Gonorrhoeae* e HPV por técnica de PCR (*polymerase chain reaction*). Outro swab da parede vaginal lateral foi diluído em 1 ml de PBS (*phosphate buffer saline*), processado e congelado para posterior análise dos mediadores imunes (ácidos lácticos L e D, EMMPRIN, MMP-8, NGAL, HA, Hyal-1 e hBD2) por técnica de

ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Para analisar as diferenças entre os mediadores nos grupos de pesquisa foram utilizados testes não paramétricos: Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney, devido à distribuição assimétrica dos dados. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa da Unicamp e obteve financiamento FAPESP. **Resultados:** Dos 233 casos coletados foram diagnosticados: 52 casos de candidíase vulvovaginal (22%), 43 de vaginose bacteriana (18%), 21 de vaginose citolítica (9%), outros diagnósticos (n=36) e 77 controles sem infecção (33%). Quatro casos foram excluídos por diagnóstico incompleto. Além disso, foi avaliada a magnitude do processo inflamatório representada pela contagem de leucócitos presentes nos esfregaços vaginais. Consideraram-se os grupos: inflamação ausente (0 leucócitos/campo), inflamação moderada (1-4 leucócitos/campo) e inflamação intensa (>4 leucócitos por campo). Não se observaram diferenças significativas entre os grupos quanto à idade, raça, anos de estudo, método contraceptivo, número de parceiros sexuais, média de relações sexuais/mês e tabagismo. As concentrações medianas (mmol/l) de ácido láctico D e L foram menores no grupo com vaginose bacteriana (ácido láctico-D <0,02; ácido láctico-L 0,02) em comparação à candidíase (ácido láctico-D 0,04 p=0,0004; ácido láctico-L 0,13 p<0,0001) e grupo controle (ácido láctico-D 0,03 p<0,0001; ácido láctico-L 0,11 p<0,0001). Na candidíase, os níveis de EMMPRIN (3,6ng/ml) e MMP-8 (18,3ng/ml) foram mais altos que nos grupos vaginose bacteriana (EMMPRIN 2,1ng/ml p=0,0002; MMP-8 8,5ng/ml p=0,0019) e controle (EMMPRIN 2,2ng/ml p<0,0001; MMP-8 8,1ng/ml p<0,0001). O EMMPRIN esteve fortemente correlacionado ao ácido láctico L, à razão ácido láctico L/D e ao MMP-8 no grupo controle e à HA em toda a amostra estudada. Os níveis de NGAL foram maiores na

candidíase (741ng/ml $p=0,0003$) e menores na vaginose bacteriana (402ng/ml $p=0,0014$) em relação aos controles (561ng/ml). Os níveis de ácido láctico-L e NGAL foram correlacionados. As concentrações vaginais de EMMPRIN ($p<0,0001$), MMP-8 ($p<0,0001$), HA ($p=0,0016$), NGAL ($p<0,0001$) e hBD2 ($p<0,0001$), exceto Hyal-1 ($p=0,3065$), foram maiores nos grupos com inflamação comparado ao grupo sem inflamação vaginal. **Conclusões:** Os isômeros do ácido láctico apresentam maiores concentrações em pacientes cuja flora é dominada por lactobacilos (controles, candidíase e vaginose citolítica) e mais baixos em mulheres com flora anormal (vaginose bacteriana). As concentrações vaginais adequadas de ácido láctico e suas correlações com NGAL, EMMPRIN e MMP-8, são relevantes nas defesas do trato genital inferior. Os níveis de EMMPRIN, MMP-8, HA, NGAL e hBD2 sofrem alteração com a inflamação vaginal, sendo que EMMPRIN, MMP-8 e HA são fundamentais na sua modulação. Mulheres com desequilíbrios nas concentrações destes mediadores podem estar mais sujeitas a desenvolver disbioses vaginais.

Palavras-chave: ácido láctico, EMMPRIN, MMP-8, NGAL, hialurona, hialuronidase, β -defensina, vulvovaginites, candidíase vulvovaginal, vaginose bacteriana, vaginose citolítica, leucócitos, inflamação, disbioses vaginais.

ABSTRACT

Introduction: The defense mechanisms of the vaginal mucosa and the pathophysiology of vulvovaginitis are complex and require interaction between several substances. The role of vaginal acidity, as well as the expression of biochemical mediators in vaginal lumen need to be better investigated to clarify the recurrences and high prevalence of VV. **Objective:** To evaluate the concentrations of L and D lactic acid, EMMPRIN (extracellular matrix metalloproteinase inducer), MMP-8 (metalloproteinase-8), NGAL (neutrophil gelatinase-associated lipocalin), HA (hyaluronan), Hyal-1 (hyaluronidase-1) and hBD2 (human β -defensin-2) from vaginal fluid of healthy women and women with vulvovaginitis, correlate them and verify their associations with leukocytes present in the vaginal cavity. **Subjects and Methods:** This cross-sectional study involved 233 women who were seen at Genital Infections Clinic at Unicamp from May to November 2013. Inclusion criteria: women of reproductive age with or without genital infections. During gynecological examination, vaginal swab was collected for microbiological analysis (Gram stain and culture for fungi) and, endocervical material was analysed for *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and HPV by PCR (polymerase chain reaction) technique. Another swab from lateral vaginal wall was diluted in 1 ml PBS (phosphate buffered saline), processed and frozen for later analysis of immune mediators (L and D lactic acid, EMMPRIN, MMP-8, NGAL, HA, Hyal-1 and hBD2) by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). To analyze the mediators'

differences between research groups, Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney were used due to the asymmetric distribution of data. The study was approved by the Ethics and Research Committee at the Campinas University and received funding from FAPESP. **Results:** After microbiological analysis of 233 cases, 52 vulvovaginal candidiasis cases were diagnosed (22%), 43 bacterial vaginosis (18%), 21 cytolytic vaginosis (9%), other diagnoses (n=36) and 77 uninfected controls (33%). Four cases were excluded due to incomplete diagnosis. In addition, the magnitude of the inflammatory process represented by the leukocyte count present in the vaginal smears was evaluated. It was considered to be in three groups: absent inflammation (0 leukocytes per field), moderate inflammation (1-4 leukocytes per field) and intense inflammation (> 4 white cells per field). There were no significant statistical differences among groups considering age, race, years of education, contraception, number of sexual partners, average of intercourse per month and smoking. The median D and L lactic acid concentrations (mmol/l) were lower in the bacterial vaginosis group (D-lactic acid <0.02; L-lactic acid 0.02) compared to candidiasis (D-lactic acid 0.04 p=0.0004; L-lactic acid 0.13 p<0.0001) and control (D-lactic acid 0.03 p<0.0001; L-lactic acid 0.11 p<0.0001) groups. Levels of EMMPRIN and MMP-8 were higher in candidiasis (EMMPRIN 3.6ng/ml; MMP-8 18.3ng/ml) than bacterial vaginosis (EMMPRIN 2.1ng/ml p=0.0002; MMP-8 8.5ng/ml p=0.0019) and control (EMMPRIN 2.2ng/ml p<0.0001; MMP-8 8.1ng/ml p<0.0001) groups. The EMMPRIN was strongly correlated to L lactic acid, L / D lactic acid ratio and MMP-8 in control group, and to HA across the sample. NGAL levels were higher in candidiasis (741ng/ml p=0.0003) and smaller in bacterial vaginosis (402ng/ml p=0.0014) compared to controls (561ng/ml). The L-lactic acid and NGAL levels were

correlated. Vaginal concentrations of EMMPRIN ($p<0.0001$), MMP-8 ($p<0.0001$), HA ($p=0.0016$), NGAL ($p<0.0001$) and hBD2 ($p<0.0001$), except Hyal-1 ($p=0.3065$), were higher in the groups with vaginal inflammation compared to the group without inflammation. **Conclusions:** The isomers of lactic acid have higher concentrations in patients whose microflora is dominated by lactobacilli (controls, candidiasis and cytolytic vaginosis) and, lower in women with abnormal flora (bacterial vaginosis). Appropriate vaginal concentrations of lactic acid and its correlations with NGAL, EMMPRIN and MMP-8 are relevant in the lower genital tract defenses. The levels of EMMPRIN, MMP-8, HA, NGAL and hBD2 are changed by vaginal inflammation, and EMMPRIN, MMP-8 and HA are critical in modulating vaginal inflammation. Women with imbalances in the concentrations of these mediators may be more likely to develop vaginal disbioses.

Keywords: lactic acid, EMMPRIN, MMP-8, NGAL, hyaluronan, hyaluronidase, human β -defensin, vulvovaginitis, vulvovaginal candidiasis, bacterial vaginosis, cytolytic vaginosis, leukocytes, inflammation, vaginal disbiosis.

SIGLAS E ABREVIATURAS

AcL-L	- ácido láctico L
AcL-D	- ácido láctico D
CVV	- candidíase vulvovaginal
DIP	- doença inflamatória pélvica
DIU	- dispositivo intrauterino
DST	- doença(s) sexualmente transmissível(eis)
ELISA	- enzyme-linked immunosorbent assay (ensaio imunoenzimático)
EMMPRIN	- extracellular matrix metalloproteinase inducer (indutor de metaloproteinases da matriz extracelular)
IL	- interleucina
HA	- hyaluronan (hialurona)
hBD2	- human beta-defensin 2 (beta-defensina 2)
HIV	- Human Immunodeficiency Virus (Vírus da Imunodeficiência Humana)
HPV	- Human Papiloma Virus (Papilomavírus Humano)
Hyal	- hyaluronidase (hialuronidase)
LDH	- lactate dehydrogenase (lactato desidrogenase)
LPS	- lipopolissacarídeo
MBL	- mannose-binding lectin (lectina ligadora de manose)
MCT	- monocarboxylase transporter (transportador de monocarboxilato)
MEC	- matriz extracelular

MMP	- matrix metalloproteinase (metaloproteinases da matriz extracelular)
NGAL	- neutrophil gelatinase-associated lipocalin (lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos)
NFκB	- nuclear factor kappa B (fator nuclear kappa B)
NLR	- NOD-like receptor (receptores do tipo NOD)
NLRP3	- via inflamossoma
NOD	- nucleotide-binding oligomerization domain receptors (receptores de domínio de ligação a nucleótidos de oligomerização)
PAMPs	- pathogen-associated molecular patterns (padrões moleculares associados à patógenos)
PBS	- phosphate buffered saline (solução tampão fosfato-salino)
PCR	- polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
PGN	- peptideoglicano
SLPI	- secretory leukocyte peptidase inhibitor (peptidase inibidora da secreção de leucócitos)
TLR	- Toll-like receptor (receptores do tipo Toll)
TNFα	- tumor necrosis factor alpha (fator de necrose tumoral alfa)
TPP	- trabalho de parto prematuro
VB	- vaginose bacteriana
VC	- vaginose citolítica
VV	- vulvoavaginites

1. INTRODUÇÃO

As vulvovaginites (VV) são doenças referidas desde o século V a.C. como importantes agravos à saúde da mulher, entretanto, somente a partir da década de 90, após sua associação com aumento da transmissibilidade do vírus da imunodeficiência humana (HIV), vêm recebendo a devida atenção por parte da comunidade científica (1, 2). Além dos consideráveis gastos econômicos, as VV causam danos emocionais, reprodutivos e sociais como: desconforto físico, estresse psicológico, transtornos da sexualidade, problemas conjugais e reprodutivos, além de embaraços sociais (2).

Inúmeras são as causas que propiciam distúrbios do epitélio vaginal gerando diferentes tipos de VV que originam o corrimento vaginal. Apesar da causa infecciosa ser a mais prevalente, processos alérgicos, irritativos, traumáticos, doenças dermatológicas e/ou autoimunes sistêmicas, além de modificações fisiológicas do trato genital feminino podem desencadear o mesmo fenômeno (3, 4). Considerando-se as diversas etiologias, provavelmente, toda mulher terá durante sua vida reprodutiva, um ou mais episódios de descarga vaginal que a levará ao consultório médico. Acredita-se, portanto, que o corrimento vaginal é, seguramente, uma das principais queixas relatadas nos consultórios ginecológicos (4). De fato, no Brasil, foram estimados três milhões de episódios ao ano. Os custos para diagnósticos, tratamentos e as despesas com atestados médicos somaram um gasto anual em torno de 80 a 100 milhões de dólares. Estes índices representam

um prejuízo social e econômico considerável para o nosso país (5). Nos Estados Unidos da América, este calculo foi estimado em um bilhão de dólares ao ano (6).

Para o correto diagnóstico da etiologia do corrimento vaginal deve-se levar em conta fatores como: a história clínica adequada, exame físico completo e busca de manifestações de doenças que levam a sintomas genitais, exame ginecológico detalhado, e obrigatoriamente, complementação com mensuração do pH vaginal, teste das aminas e estudo da microbiota vaginal. Infelizmente, muitos médicos não realizam rotineiramente essa propedêutica na prática clínica (4). Para evitar-se tratamentos inadequados ou desnecessários, é preciso basear-se nas diversas técnicas laboratoriais disponíveis e, não apenas na avaliação clínica (7).

As VV mais comuns que acometem as mulheres em idade reprodutiva são a vaginose bacteriana (VB) e a candidíase vulvovaginal (CVV), respondendo por 22% a 50% e 17% a 39% das mulheres sintomáticas, respectivamente (8). Nota-se ainda que estas desordens acometem algumas mulheres, em certos períodos de suas vidas, de forma recorrente (três ou mais episódios por ano). Nestes casos, fica claro que os fatores predisponentes relacionam-se muito mais às características próprias do hospedeiro, do que à patogenicidade do micro-organismo, uma vez que estas VV são causadas por germes comensais da flora vaginal que, em algumas situações, podem se multiplicar gerando quadros variados, desde doença subclínica até quadros graves de recorrência. Dentre os inúmeros fatores predisponentes, destaca-se a resposta imune de cada indivíduo (sistêmica ou local). A resposta imune das mucosas, especialmente a vaginal, vem sendo explorada, contudo, ainda não há uma clareza de interpretação (9, 10).

O ginecologista, por não ter respostas diretas da interação hóspede-hospedeiro no caso das VV, acaba por dar maior atenção ao tratamento do quadro agudo em detrimento da avaliação detalhada da paciente como um todo. É fundamental checar a história clínica, os hábitos sexuais, alimentares, de higiene, doenças concomitantes, além de verificar, o que for clinicamente possível, quanto aos mecanismos de proteção conhecidos. Sabe-se que, para a manutenção do equilíbrio do ecossistema vaginal, vários mecanismos de defesa atuam de forma sinérgica, entre eles: a integridade e o trofismo da mucosa, a produção de muco protetor, o pH vaginal, a microbiota colonizadora da vagina e o sistema imunológico propriamente dito (9). Alterações deste ecossistema podem propiciar a proliferação microbiana. Desta forma, acredita-se que as VV, especialmente nos casos de recorrência, são desencadeadas em função de alterações locais do indivíduo e que, portanto, os mecanismos de defesa do hospedeiro são os mais relevantes para manutenção da homeostase vaginal. Sendo assim, a resposta imune do trato genital inferior feminino é um tema que necessita ser melhor estudado, assim como a fisiopatologia das VV (10).

Características das Principais Vulvovaginites

A vaginose bacteriana (VB) é definida como uma diminuição acentuada dos *Lactobacillus* presentes na flora vaginal normal levando à proliferação exagerada de micro-organismos anaeróbios, em particular a *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Prevotella sp*, *Porphyromonas sp*, *Peptostreptococci sp*, *Mobiluncus sp* e *Atopobium vaginae* (11, 12).

Além de sua alta prevalência, a VB está associada à diversos resultados adversos como: trabalho de parto prematuro (TPP), parto prematuro, ruptura prematura de membranas, corioamnionite, recém-nascido com baixo peso, abortamento espontâneo, endometrite pós-abortamento e pós-parto, infecções pélvicas e pós-cirúrgicas. Outro ponto a ser considerado é a relação entre VB e maior susceptibilidade à aquisição de doenças sexualmente transmissíveis (DST), em especial o HIV (13, 14).

Os fatores predisponentes para VB são: raça negra, tabagismo, estresse crônico, doenças e medicações imunossupressoras, uso de dispositivo intrauterino (DIU), uso de duchas vaginais, alta frequência de atividade sexual, multiplicidade de parceiros, novo parceiro e homossexualismo feminino, sem contudo serem considerados causas do problema (15-19). Ainda precisam ser esclarecidos os detalhes do mecanismo imune de como ocorrem a redução dos lactobacilos e multiplicação das bactérias anaeróbicas específicas da doença, que também são consideradas comensais da flora vaginal.

Uma queixa comum é a descarga vaginal anormal com odor desagradável, todavia, mais da metade das mulheres com VB são assintomáticas. Ao exame clínico observa-se pouca ou nenhuma reação inflamatória cervicovaginal e presença de conteúdo homogêneo (14). Realiza-se o diagnóstico pela análise dos critérios de Amsel e/ou score de Nugent. A observação de três entre os quatro critérios de Amsel: descarga vaginal homogênea, pH vaginal > 4.5, teste de Whiff positivo ou presença de *clue cells* no esfregaço vaginal, fecha o diagnóstico de VB (20). O score de Nugent quantifica, na bacterioscopia pelo Gram, o número de lactobacilos em relação aos morfotipos bacterianos associados à VB (*Gardnerella*,

Prevotella, *Porphyromonas*, *Peptostreptococci* e *Mobillicoccus*) gerando um escore que, será positivo se ≥ 7 (21).

Interessante destacar que, na VB, usualmente não se observa processo inflamatório ao exame especular e, na avaliação microbiológica dos esfregaços vaginais os leucócitos são escassos ou ausentes, daí o nome “vaginose” e não “vaginite” (13, 20). Apesar de não apresentar inflamação clínica com migração de polimorfonucleares para a região (22), pesquisas têm comprovado que existe uma resposta inflamatória em decorrência da estimulação de receptores do tipo *Toll* (TLR, do inglês *Toll-like receptors*) no epitélio, especialmente TLR-4 e TLR-2, levando a um aumento na produção de mediadores pró-inflamatórios, principalmente, interleucina (IL) 1 β , (12, 23-25). Este estímulo provavelmente se deve a sua origem polimicrobiana, uma vez que especificamente a *Gardnerella*, principal micro-organismo envolvido na VB, não desencadeia estímulo inflamatório. Acredita-se que isto seja devido à ausência de lipopolissacarídeo (LPS) em sua estrutura e a escassez de peptideoglicano (PGN) na parede celular bacteriana (26, 27).

Uma vez que existe o estímulo de IL-1 β na VB, esperar-se-ia um aumento de IL-8, um potente estimulador da quimiotaxia leucocitária durante a inflamação. Embora os estudos sejam controversos, parece não haver alteração nos níveis de IL-8 nas amostras vaginais de pacientes com VB comparado aos controles, o que explicaria a ausência dos leucócitos (12, 23, 25, 27-29). O mecanismo suscitado foi que, os ácidos orgânicos produzidos em altas concentrações pelas bactérias associadas à VB, levariam à inibição da migração leucocitária *in vitro*. Foi constatado que o ácido succínico causa inibição potente da quimiotaxia, enquanto

o ácido acético causa baixa inibição (30), e isto justificaria a ausência de polimorfonucleares nos esfregaços vaginais de mulheres com VB.

O fluido vaginal nesta doença parece ser deficiente em diversos fatores da resposta imune inata, entre eles, peptídeos antimicrobianos como defensinas (α -defensina e β -defensina) e antiproteases (Elafin e SLPI, do inglês *secretory leukocyte peptidase inhibitor*). Os estudos ainda são contraditórios sugerindo que estas alterações sejam relacionadas à espécies específicas na VB. Os peptídeos antimicrobianos auxiliam na resistência da superfície epitelial contra a colonização microbiana matando micro-organismos, bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, fungos e vírus. Também são capazes de auxiliar na imunidade agindo como imunomoduladores. A redução destas substâncias antimicrobianas parece ter relação com a frequente associação da VB com outras infecções genitais como clamídiase, infecção pelo HPV (*human papilloma virus*), infecção gonocócica e tricomoníase (27, 31-36).

Com os estudos do microbioma vaginal, fica cada vez mais claro que, os achados discordantes nas concentrações de algumas substâncias imunes em amostras de pacientes com VB estariam relacionados à sua origem polimicrobiana. Isto se deve ao estímulo individual de algumas bactérias e/ou sua ação conjunta incitando diferentes respostas imunes, de acordo com a capacidade de ativação imunológica de cada espécie (37, 38). Estas variações podem justificar o desenvolvimento mais comum de complicações em algumas mulheres com VB.

O sistema complemento, componente do sistema imune inato, parece estar implicado na fisiopatologia da VB. A via da lecitina ligadora de manose (MBL, do inglês *mannose-binding lectin*) possui funções antimicrobianas (fungos, bactérias e

vírus) ligando-se a moléculas de reconhecimento no agente infeccioso. Essa ligação ativa a deposição de complemento e opsonização do patógeno. Já foi mostrado que polimorfismos no gene da MBL se associam a VB recorrente (39). Além disso, outros polimorfismos genéticos, como TLR-4, se correlacionam aos casos recorrentes, restringindo a resposta imune desencadeada pelo receptor (40).

Todas as alterações previamente descritas no ecossistema vaginal de mulheres com VB parecem criar uma condição especial caracterizada por uma imunossupressão local, o que facilitaria as infecções concomitantes e aumentaria o risco de intercorrências como resultados materno-fetais adversos, infecções pós-operatórias, doença inflamatória pélvica (DIP) e aquisição do HIV (12, 14, 23).

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma infecção fúngica causada pela *Candida sp*, sendo que a *Candida albicans* é a espécie responsável por 85% a 95% dos casos sintomáticos. Entre as espécies não albicans a *Candida glabrata* é a mais comum. *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, e *Candida krusei*, raramente causam infecção. Apesar da incidência e prevalência da CVV serem incertas, estima-se que aproximadamente 70% a 75% das mulheres apresentarão pelo menos um episódio durante toda a vida e, 5% a 8% das mulheres com um episódio primário desenvolverão candidíase recorrente definida por quatro ou mais episódios durante um ano, confirmado por cultura (6).

A CVV manifesta-se como um processo infeccioso agudo com maior ou menor sintomatologia, na dependência do grau de inflamação local. A descarga vaginal e o prurido são as queixas mais comuns, seguidas de irritação e ardor vulvovaginal, dispareunia e disúria externa. Ao exame ginecológico observa-se edema e eritema vulvar acompanhado de corrimento branco grumoso aderido às

paredes vaginais. O diagnóstico é confirmado pela identificação do fungo pelo exame microscópico e/ou cultura em meio de Sabouraud. Diferentemente da VB, na CVV observa-se frequentemente uma reação inflamatória de intensidade variável, constatada pelo quadro clínico e pela observação de células de defesa no esfregaço do conteúdo vaginal (6).

Os fatores de risco conhecidos são: diabetes, doenças e medicações imunossupressoras, antibioticoterapia, contraceptivos hormonais combinados de altas doses, polimorfismos genéticos, dermatite atópica, estresse psicossocial (41).

Imunologicamente, as células epiteliais da mucosa vaginal formam a primeira barreira contra a *Candida* além de serem capazes, por si só, de inibir o crescimento deste fungo (42). Uma vez que a quantidade do fungo ultrapassa o limiar tolerado pela célula epitelial (43) ou ocorre a transformação do blastosporo em pseudo-hifa (44), ativam-se receptores na membrana celular, entre eles: TLR-2 e TLR-4, receptores de lectina (dectin-1), receptores do tipo NOD (NLR, do inglês *NOD-like receptors*) desencadeando uma resposta pró-inflamatória via fator nuclear kappa B (NFkB, do inglês *nuclear factor kappa B*) e/ou via inflamossoma (NLRP3), com produção de citocinas, IL-1 α , IL-1 β e TNF- α (*tumor necrosis factor alpha* ou fator de necrose tumoral alfa), e quimiocinas. Ocorrerá a migração de células imunes para o local gerando uma resposta inflamatória que pode ser protetora ou deletéria, a depender do grau da resposta imune e das substâncias envolvidas. O reconhecimento do fungo pelo sistema complemento via MBL também ativa resposta imune contra a *Candida*. A presença de polimorfismos genéticos, entre eles, MBL e NLRP3 podem levar ao desenvolvimento de candidíase recorrente (39, 44, 45).

Mulheres com CVV também apresentam risco aumentado para aquisição do HIV. Acredita-se que seja devido a inflamação que, compromete a integridade da mucosa, altera a proteção da imunidade inata e aumenta o número de células alvo do HIV (linfócitos) na mucosa vaginal (46). Além disso, os baixos níveis de SLPI, um peptídeo antimicrobiano e anti-inflamatório encontrados em pacientes com infecção cervicovaginal, inclusive CVV, têm sido associados ao maior risco de aquisição do HIV (31). O tratamento da CVV na gestação também parece diminuir o risco de TPP (47). Estes dados comprovam que a CVV não é uma condição isenta de complicações.

A vaginose citolítica (VC), antigamente conhecida como citólise de Doderlein, foi descrita por Cibley e Cibley em 1991 como um aumento expressivo do número de lactobacilos levando a lise intensa das células epiteliais vaginais causando irritação local. De lá para cá, pouco foi acrescido à fisiopatogênese desta entidade (48). Na VC, a semelhança da VB, existe uma proliferação microbiana exagerada, todavia, enquanto na VB ocorre o aumento de cocos e cocobacilos, na VC são os lactobacilos que se multiplicam. Os mecanismos que incitam a proliferação excessiva de bactérias comensais, ainda precisam ser elucidados.

Os sintomas irritativos na VC acontecem em decorrência da maior acidez e são comumente confundidos com candidíase vaginal. As pacientes referem corrimento vaginal branco com prurido e ardor que pioram após urinar, além de dispareunia de penetração. Os sintomas, geralmente, se iniciam na fase lútea do ciclo menstrual e melhoram após a menstruação (48, 49). Estudos mostram uma prevalência de 5 a 7% e, frequentemente, estas pacientes vinham sendo tratadas para candidíase sem sucesso (49, 50).

O diagnóstico correto necessita, primeiramente, de alta suspeição. A descarga vaginal é frusta, branca ou pastosa e o pH varia entre 3,5 a 4,5. O exame bacterioscópico a fresco do conteúdo vaginal esclarece o diagnóstico ao se observar aumento do número de lactobacilos, evidência de citólise (núcleos de células epiteliais desnudos) e ausência outros patógenos que poderiam causar lise, como *Trichomonas*, *Gardnerella* e/ou *Candida*. Além disso, existe uma escassez ou ausência de leucócitos no esfregaço, o que denota que os sintomas não são inflamatórios, mas sim, devido a maior acidez vaginal (48, 49). Apesar de não estar associada a consequências graves, a VC merece atenção devido ao desconforto que frequentemente causa às pacientes.

Outra VV infecciosa menos comum é a vaginite aeróbica. É caracterizada por uma depleção dos lactobacilos com aumento de uma microflora aeróbica, composta principalmente por micro-organismos Gram-positivos como estafilococos e estreptococos. Contrariamente a VB, a vaginite aeróbica desencadeia uma intensa resposta inflamatória na mucosa e seus sintomas associados. Apesar de ainda pouco estudada, vem sendo sistematicamente associada aos mesmos resultados materno-fetais adversos encontrados na VB (51).

As infecções cervicais por *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae* também estão associadas a graves consequências para a saúde da mulher. A apresentação clínica é variada podendo ser assintomática ou cursar com endocervicites, endometrites, salpingo-oorites até quadros graves de DIP com abscesso tubo-ovariano. Outras complicações frequentes são a gravidez ectópica e infertilidade (52).

Uma infecção no trato genital inferior indica que algum dos mecanismos de defesa local foi rompido e permitiu a instalação do agente infeccioso. Ocorre, portanto, uma modificação no ambiente vaginal e, a paciente fica susceptível ao desenvolvimento de outras infecções e suas complicações, entre elas as DSTs, estando o HIV entre as mais preocupantes. Já foi mostrado que a ausência de lactobacilos e consequente redução do ácido láctico aumentando o pH vaginal se associam à maior transmissibilidade sexual do HIV. Importante destacar que o aumento de citocinas pró-inflamatórias e baixos níveis de fatores anti-inflamatórios na vagina como SLPI, além da presença de leucócitos, também aumentam esse risco (12, 23, 53, 54). Avaliações de como os mediadores imunes se comportam nas diferentes infecções vaginais são necessárias para auxiliar no entendimento da fisiopatologia destas doenças.

Ecossistema Vaginal e Resposta Inflamatória

A vagina humana, no menacme, pode ser colonizada por uma série de micro-organismos, mas em aproximadamente 70% das mulheres, é dominada por *Lactobacillus spp* (38). Os lactobacilos são primordiais para as defesas do trato genital inferior de mulheres em idade reprodutiva. Acredita-se que estas bactérias e seus produtos como ácido láctico e outros metabólitos, persistiram durante a evolução humana por oferecerem vantagens para reprodução e saúde da mulher, criando uma barreira à invasão e proliferação de micro-organismos indesejáveis (55).

Os lactobacilos previnem o aparecimento de doenças pelo controle do crescimento de patógenos e outros micro-organismos oportunistas devido à

produção de ácido láctico, bacteriocinas e outras substâncias microbidas. Além disso, competem por nutrientes (arginina) e receptores, por ocasião da adesão no epitélio. O ácido láctico, produzido sobretudo por lactobacilos, mas também, por outras bactérias e pela célula epitelial vaginal, é a principal substância para manter o pH vaginal em níveis ideais, entre 3,8 a 4,5 (9). Além disso, estudos recentes mostraram que o ácido láctico também é importante na resposta imune do trato genital inferior (56-59).

Os lactobacilos formam biofilme na superfície mucosa das células epiteliais vaginais favorecendo sua colonização e predomínio. O epitélio pavimento estratificado da mucosa vaginal banhado de muco também constitui uma barreira física e imunológica. A ação conjunta entre os lactobacilos e as células epiteliais libera diversas substâncias antimicrobianas e, na presença de um agente infeccioso, desenvolve uma melhor resposta imune vaginal (38, 53).

Para que ocorra infecção os micro-organismos precisam suplantar as defesas do hospedeiro. Portanto, se a proliferação dos micro-organismos indesejados não for contida, estes estimularão uma resposta imune inespecífica contra o agente infeccioso (resposta inata). Este estímulo ocorre através do reconhecimento de partículas comumente expressadas por um amplo espectro de micro-organismos ou seus produtos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) por receptores presentes na superfície celular. Existe uma série de receptores celulares que fazem este reconhecimento. Os mais conhecidos na imunidade vaginal são os TLR, NLR, receptores de lecitina e receptores *scavenger* (45, 60, 61).

A ligação PAMP-receptor desencadeia a ativação de vias pró-inflamatórias intracelulares, entre elas NF κ B e NLRP3, com liberação de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 α , IL-1 β e TNF- α , e quimiocinas, levando a migração de leucócitos para o *site* da infecção com intuito de combater a infecção (60, 61). Outro mecanismo de reconhecimento aos patógenos são os macrófagos residentes no tecido local. Estas células percebem a alteração da homeostase tecidual e também estimulam o recrutamento de células como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos *natural killer* (62). Os TLRs são as principais moléculas sinalizadoras de infecção. Sua ativação no epitélio vaginal - além de estimular a secreção de fatores antimicrobianos, que matam os micro-organismos - também liga a resposta imune inata à adquirida e auxilia no processo de reconstituição da injúria tecidual (53, 63-65).

O mecanismo da resposta imune inata é imediato, porém não específico contra o micro-organismo. As principais células efetoras são os neutrófilos, capazes de migrar para o tecido nas fases iniciais da inflamação, destruir e fagocitar o micro-organismo invasor. Os macrófagos também são fagócitos, porém seu tempo de vida no tecido é maior, portanto, predominam nas fases mais tardias da inflamação. Por este motivo, são as células responsáveis pela reparação dos tecidos lesados e resolução da inflamação. Quando não é possível debelar a infecção, uma resposta imune tardia é desencadeada e direcionada especificamente contra o micro-organismo. As principais células ativadoras deste processo são as células dendríticas ou células de Langerhans presentes no tecido. Estas células são macrófagos especializados na apresentação do antígeno aos linfócitos T “*naive*”, os quais desenvolverão uma resposta imune adaptativa predominantemente celular –

tipo Th1 (linfócitos T) ou humoral – Tipo Th 2 (linfócitos B) (28, 60, 66, 67). As particularidades da resposta imune na VB e CVV foram previamente descritas.

Ácido Láctico e Mediadores da Resposta Imune Vaginal

O ácido láctico, além de manter o pH vaginal entre 3,8 e 4,5 coibindo a proliferação de micro-organismos indesejáveis, ainda participa da resposta imunológica local. A massiva produção do ácido láctico vaginal depende da presença de estrogênio e da colonização por lactobacilos. Sabe-se que o glicogênio é depositado nas células epiteliais vaginais pelo controle estrogênico e, metabolizado em glicose. A glicose, pela ação da enzima lactato desidrogenase (LDH) dos lactobacilos presentes no lúmen vaginal, é metabolizada em ácido láctico, o que mantém o pH ácido (68).

As espécies de lactobacilos comumente isoladas da cavidade vaginal são: *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii* e *Lactobacillus iners* (38, 69). Os lactobacilos produzem ácido láctico em sua forma levógira (L) e/ou destrógira (D) a depender do número de cópias de genes da enzima lactato desidrogenase L ou D presentes no seu genoma (69, 70). *Lactobacillus crispatus* e *Lactobacillus gasseri* tem duas cópias de LDH-L e uma de LDH-D, produzindo ácido láctico em sua forma levógira (L) e destrógira (D) (70). *Lactobacillus jensenii* possui, inversamente, duas cópias de LDH-D e uma cópia de LDH-L. É interessante notar que o *Lactobacillus iners* não possui o gene que codifica a LDH-D no seu genoma e, portanto, produz apenas ácido láctico-L. As concentrações finais de cada isômero na vagina gera uma proporção que parece ter implicação no papel de defesa atribuído a cada espécie de lactobacilo (69).

Recentemente, foi identificado que outras bactérias como *Atopobium sp*, *Megasphaera sp* e *Leptotrichia sp* são capazes de produzir ácido láctico em uma minoria de mulheres com escassez de lactobacilos (71). A célula epitelial vaginal também produz ácido láctico, mas apenas em sua forma isomérica levogira (AcL-L) e em pequenas concentrações, sendo responsável por até 20% do ácido láctico presente na cavidade vaginal. Neste caso, a glicose, agora no interior da célula é metabolizada em ácido pirúvico e então em AcL-L pela LDH-L celular. O ácido láctico é capaz de difundir-se através da célula epitelial e acumular-se no lúmen vaginal (72).

O isômero levógiro do ácido láctico (AcL-L) induz a célula epitelial vaginal a liberar citocinas pró-inflamatórias quando há um agonista ligado ao TLR, por exemplo, LPS (lipopolissacarídeo) bacteriano ou RNA viral, ou seja, se houver um agente patogênico. Outra função imunológica do AcL-L é a estimulação seletiva de células imunes (via Th17) por meio da IL-23 desencadeando uma resposta pró-inflamatória. A via de linfócitos CD4 Th17 foi recentemente reconhecida como uma via essencial para o recrutamento, ativação e migração de neutrófilos, além de destruição de micro-organismos extracelulares. O ácido láctico também estimula a atividade antimicrobiana pelas células epiteliais vaginais. Além disso, em pH abaixo de 4.5, tem efeito microbicida matando bactérias associadas à vaginose bacteriana, mas não lactobacilos. Todos estes efeitos são específicos do ácido láctico e requerem um ambiente ácido para atuação (56-59).

Em estudos *in vitro*, o ácido láctico foi substituído por outros, entre eles, ácido acético, mas não se obtiveram os efeitos favoráveis atribuídos ao isômero L do ácido láctico. Em resumo, o AcL-L potencializa a habilidade das células epiteliais

vaginais em reconhecer e responder à presença de patógenos, induz a migração de células imunes para a vagina em resposta aos sinais produzidos pela célula epitelial vaginal, e estimula repostas antimicrobianas nas células (55-59).

Portanto, a alteração do pH vaginal ou a redução do número de lactobacilos em mulheres no menacme comprometem mecanismos importantes de defesa da mucosa vaginal gerando um ambiente favorável para proliferação de micro-organismos oportunistas e desenvolvimento de infecções (9, 73). Um exemplo comumente visto na prática clínica é o aumento da incidência de DIP em mulheres com vaginose bacteriana e também o próprio desenvolvimento da VB (74).

As concentrações de ácidos lácticos D e L parecem influenciar os níveis de outras substâncias no ambiente vaginal (69). O CD147, também nomeado indutor de metaloproteinases da matriz extracelular (EMMPRIN, do inglês *extracellular matrix metalloproteinase inducer*) é um cofator essencial para o transporte de AcL-L entre o intracelular e o extracelular realizado por meio de uma proteína de membrana denominada MCT (do inglês, *monocarboxylate transporter*, ou seja, transportador de monocarboxilato) (75) (Figura 1).

O CD147 (EMMPRIN) é uma molécula glicoproteica membro da superfamília de receptores de imunoglobulinas, que está presente na membrana celular da célula epitelial e dispersa no fluido vaginal. Estudos em câncer, observaram que a hipóxia gerada pelo tumor, leva à captação de energia pela via glicolítica com produção de ácido láctico. A concentração intracelular de ácido láctico estimula a expressão de MCT e EMMPRIN, necessários para evitar a morte da célula tumoral por acidose (75, 76) (Figura 1).

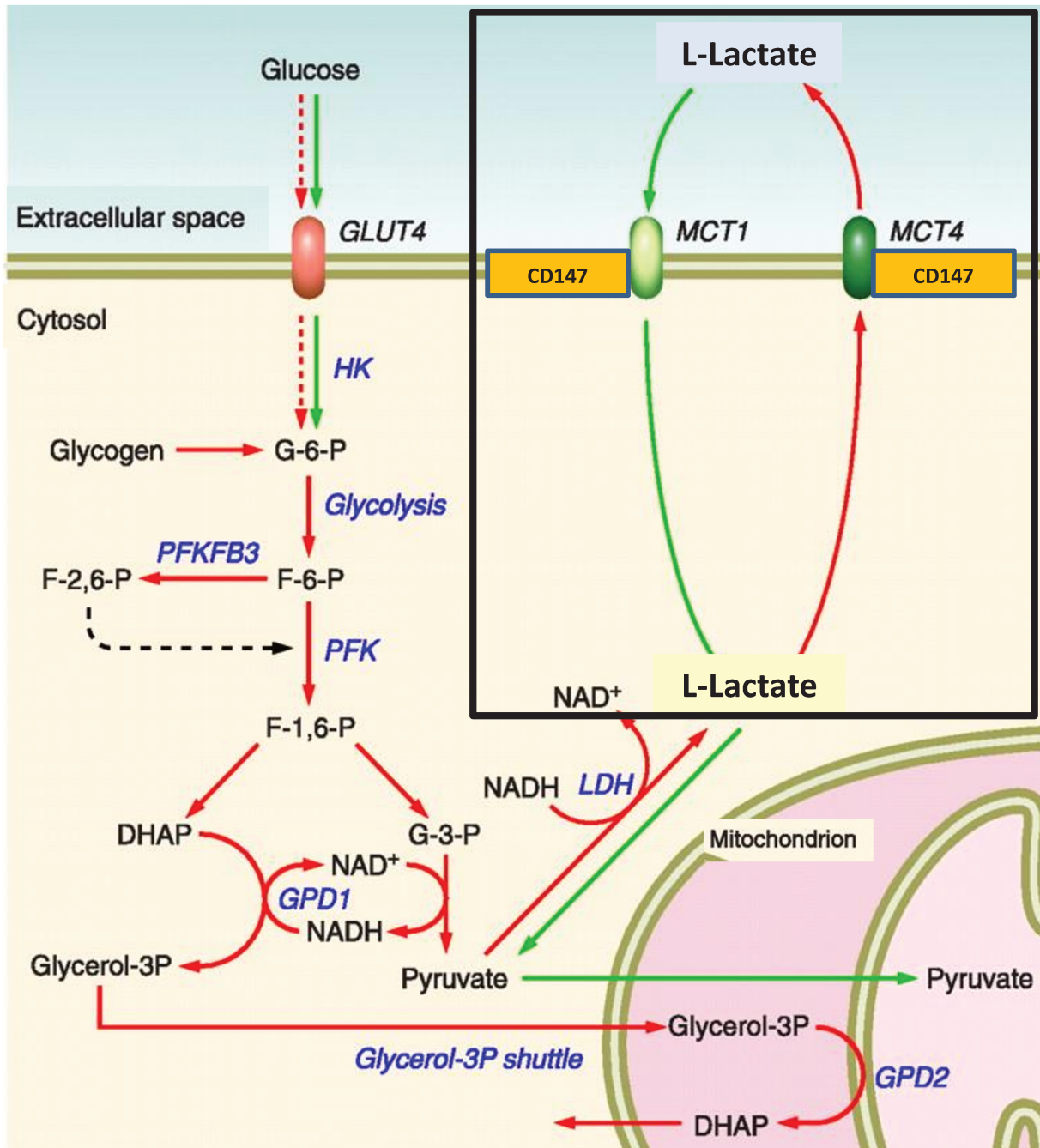


Figura 1. Transporte transmembrana de ácido láctico-L (L-lactate) pelo mecanismo de transporte de monocarboxilato (MCT1 e MCT4) tendo o EMMPRIN (CD147) como cofator.

Witkin et al. (69), estudando o fluido vaginal de mulheres no menacme mostraram que o EMMPRIN esteve diretamente relacionado com o AcL-L, mas não com o AcL-D. Estes dados sugerem que o AcL-L regula a produção de EMMPRIN na vagina, uma vez que o EMMPRIN é necessário para o transporte transmembrana de ácido láctico via MCT e, em concentrações normais, mantém a viabilidade celular (Figura 1). O mesmo estudo mostrou que o AcL-D, apesar de não ser transportado pelo MCT, influencia as concentrações de EMMPRIN no ambiente vaginal, uma vez que bloqueia o MCT controlando as concentrações de AcL-L e, consequentemente, EMMPRIN. Portanto, a proporção dos níveis de AcL-L/AcL-D no fluido vaginal parece ser importante para manutenção da homeostase local (69).

O EMMPRIN também contribui para a resposta inflamatória. Sua interação com outras moléculas ativam sinais intracelulares que levam à produção e secreção de citocinas e quimiocinas com recrutamento de células imunes para o local, aumentando a infiltração leucocitária. É uma molécula largamente expressa em neutrófilos ativados, monócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos T e B, mantendo o processo inflamatório até a neutralização do agente causal (77). A relação do EMMPRIN com o processo inflamatório vaginal ainda não foi demonstrada.

Como o próprio nome diz, o EMMPRIN também é um importante indutor de metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs, do inglês *matrix metalloproteinases*), um conjunto de enzimas da família endopeptidases zinco dependentes com cerca de 25 membros capazes de degradar a matriz extracelular (MEC). São divididas em categorias como collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), gelatinases (MMP-2, MMP-9), entre outras. São produzidas principalmente por

leucócitos polimorfonucleares, monócitos, macrófagos, fibroblastos, células mesenquimais, queratinócitos, além de algumas linhagens de células epiteliais (75, 78-80).

A MMP-8, também chamada *neutrophil collagenase* ou colagenase de neutrófilos, é considerada um mediador central de processos inflamatórios agudos e crônicos. Nas infecções genitais femininas, a MMP-8 tem sido suscitada como responsável pela degradação da MEC na cérvix. Acredita-se que, seu excesso, degradaria demasiadamente a MEC, favorecendo a ascensão das bactérias através da cérvix para o trato genital superior. Haveria, portanto, predisposição à DIP e suas consequências como infertilidade e dor pélvica crônica, além de uma maior susceptibilidade a infecções altas na gravidez com seus resultados adversos como parto prematuro (69, 78, 81-83).

Witkin et al. (69), mostraram uma correlação direta entre os níveis de AcL-L, EMMPRIN e MMP-8 presente no fluido vaginal, sugerindo que, além do AcL-L estimular EMMPRIN, o EMMPRIN proporcionalmente estimula MMP-8. O AcL-D não esteve correlacionado com EMMPRIN e MMP-8, e portanto, não é um indutor de EMMPRIN. Por outro lado, a razão entre os níveis de ácido láctico L/D, esteve fortemente associada aos níveis de EMMPRIN e MMP-8 (69). Foi então postulado que, no ambiente vaginal, existe um retro controle pelo AcL-D, impedindo que o AcL-L estimule em demasia a produção de EMMPRIN e consequentemente MMP-8, bloqueando a degradação excessiva da MEC (69, 70, 84). Acredita-se que este controle protegeria o trato genital evitando as consequências previamente descritas (69, 78, 81-83).

Na prática clínica, esta teoria vem de encontro aos achados benéficos de que a colonização pelo *Lactobacillus crispatus* é valiosa para manutenção da saúde do trato genital feminino. A proporção entre ácidos lácticos L e D produzida por este lactobacilo, uma vez que possui 2 cópias de genes LDH-L e 1 cópia de LDH-D, parece ser ideal. Já o *Lactobacillus iners*, frequentemente isolado em pacientes com vaginose bacteriana e em casos de parto prematuro, não produz AcL-D, sugerindo que o ambiente vaginal gerado por esta espécie não seja tão favorável à saúde vaginal (38, 69). Partindo deste princípio, a avaliação destas substâncias em estudos sobre o uso do *Lactobacillus crispatus* como probiótico poderia auxiliar nas pesquisas sobre infecções genitais.

Hialurona ou ácido hialurônico (HA, do inglês *hyaluronan*) é o principal componente da MEC, sendo responsável pelo seu preenchimento e, por manter a integridade do tecido e sua homeostase. Bioquimicamente, é um hidrato de carbono complexo formado por unidades repetidas de dissacárido de ácido D-glucorônico e N-acetil-D-glucosamina, portanto, proveniente do metabolismo da glicose (85) (Figura 2).

Em tecidos saudáveis, a HA apresenta-se como uma partícula de alto peso molecular (HMW-HA, do inglês *high molecular weight hyaluronan*) extremamente hidratada. HA modula a interação célula-célula e célula-proteínas na MEC, a atividade enzimática e a difusão de moléculas sinalizadoras. Além disso, suas propriedades hidrofílicas, criam um ambiente ideal para que as células possam se mover, migrar e proliferar (85). A organização da HA na MEC impede a difusão de substâncias de alto peso molecular e disseminação de agente infecciosos (86). HMW-HA atua como uma molécula anti-inflamatória (85).

Acredita-se que algumas espécies de lactobacilos são capazes de produzir HA (87). Estudos em câncer apontaram o EMMPRIN como um indutor da produção de HA pela célula tumoral (88). Além disso, EMMPRIN (CD147), HA e CD44 regulam a localização do MCT na membrana celular das células tumorais, alterando portanto o efluxo de ácido láctico pela célula (89) (Figura 2). Contudo, estudos no ambiente vaginal precisam ser realizados para corroborar com esta idéia.

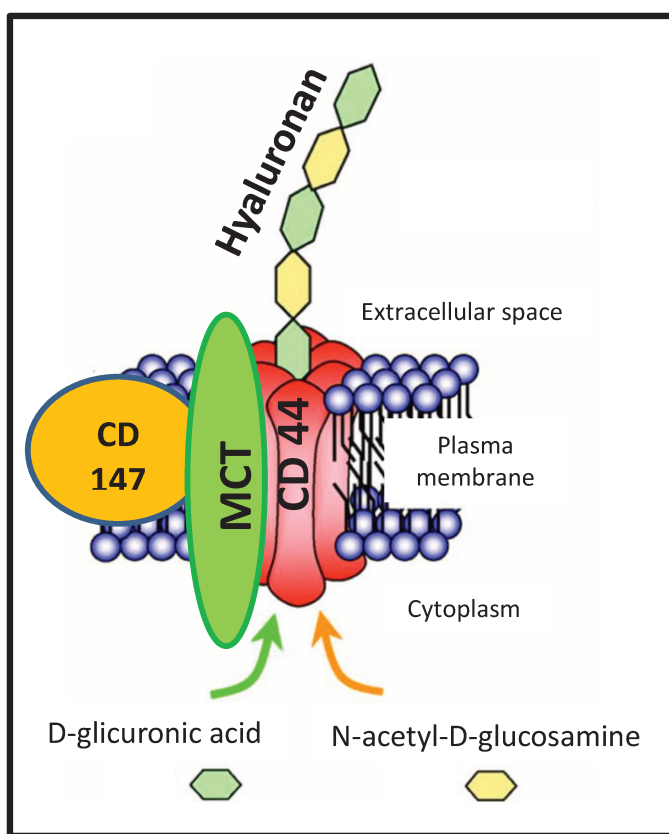


Figura 2. Hialurona é um hidrato de carbono complexo formado por unidades repetidas de dissacárido de ácido D-glucorônico e N-acetil-D-glucosamina. A produção de hialurona pelas células tumorais é dependente de CD44, EMMPRIN (CD147).

Na presença de qualquer estímulo inflamatório, a HA presente na MEC, é quebrada em pequenos fragmentos com propriedades pró-inflamatórias (LMW-HA, do inglês *low molecular weight hyaluronan*). Estas partículas estimulam a produção de mediadores imunológicos como interleucinas, quimiocinas, fatores de

crecimento e proteases como MMPs. Nas fases iniciais da inflamação, LMW-HA funciona como molécula sinalizadora de perigo, auxiliando a neutralizar o agente causal. Posteriormente, atua na resolução da inflamação, remodelando a MEC (90). No ambiente vaginal, observou-se que os níveis de HA são mais elevados no fluido vaginal de mulheres com candidíase recorrente e associados aos sintomas inflamatórios, o que vem de encontro às funções da LMW-HA (91). Por outro lado, um estudo recente mostrou que a depleção de HA no colo do útero e na vagina em modelo animal de infecção vaginal ascendente resultou em diferenciação inadequada de células epiteliais, aumento da permeabilidade epitelial e da mucosa, e aumento notável das taxas de parto prematuro. Este estudo mostra que HA também é capaz de prevenir que agentes infecciosos presentes na vagina ascendam através da MEC cervical, protegendo contra infecções no trato genital superior (92).

Hialuronidases (Hyal, do inglês *hyaluronidase*) são um grupo de enzimas que degradam HMW-HA em fragmentos de LMW-HA. Estas enzimas participam na regulação do metabolismo e função da HA. Existem três tipos de Hyal, Hyal-1, Hyal-2 e Hyal-3. Em geral, são ativas em pH ácido. A Hyal-1 e Hyal-2 são as principais expressas em tecidos humanos (93).

Um estudo sobre o ambiente vaginal mostrou que os fragmentos de LMW-HA ativam TLR-2 e TLR-4 na superfície da célula epitelial vaginal e estimulam a secreção do peptídeo antimicrobiano β -defensina 2 (hBD2, do inglês *human beta-defensin 2*) (94). β -defensina 2 é um peptídeo antimicrobiano ativo contra muitas bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos e vírus envelopados. É uma molécula expressa em células epiteliais e leucócitos. Seu efeito microbicida inclui a

ligação ao polo negativo das membranas microbianas causando morte do micro-organismo e quimioatração de leucócitos. É um componente do sistema imune inato, mas modula o sistema imune adaptativo por meio da quimiotaxia de monócitos, linfócitos-T e mastócitos ao local da infecção (32, 95).

Considerando-se as infecções vaginais, outro estudo mostrou que os compostos microbianos LPS de bactérias Gram-negativas, PGN de bactérias Gram-positivas e zimosan da *Candida albicans*, induzem não só a expressão de hBD2, mas também, citocinas pró-inflamatória e quimiocinas na célula epitelial vaginal. Este estímulo se faz via TLR-2 e TLR-4 mediante ativação da via NFκB, elemento chave para a resposta imune inata e adaptativa (32). Estes dados são reforçados pela maior produção de hBD2 observada em mulheres com candidíase quando comparadas a mulheres híginas (96). Outro estudo mostrou que o *Atopobium vaginae* também induz uma intensa resposta com produção de citocinas pró-inflamatórias e hBD2 (97).

Outro componente antimicrobiano essencial do sistema imune inato é a lipocalina associada à gelatinase dos neutrófilos (NGAL, do inglês, *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*), também conhecida como lipocalina-2. NGAL atua especialmente nos estágios precoces da infecção e, é produzida por neutrófilos, monócitos e células epiteliais (98). Esta substância ainda não foi estudada no ambiente vaginal.

NGAL funciona como agente bacteriostático ao se ligar e sequestrar sideróforos bacterianos (proteína bacteriana que facilita a obtenção de ferro) privando, portanto, o micro-organismo de adquirir ferro para suas atividades metabólicas. Também modula diversas funções dos neutrófilos como fagocitose,

destruição bacteriana, extravasamento para o site da infecção, quimiotaxia e adesão. Evidências sugerem que NGAL pode conectar o sistema imune inato e adaptativo modulando a imunidade celular mediada pela ativação da via reguladora de linfócitos T CD4⁺ (98, 99).

Na célula epitelial, NGAL é fortemente induzida pela inflamação e infecção bacteriana, atuando especialmente nos estágios iniciais da infecção. Sua produção é estimulada rapidamente após a ativação de TLR 2, 4 e 5 por partículas bacterianas. O LPS (presente nas bactérias Gram-negativas) especificamente induz NGAL via ativação de TLR-4. Sua expressão nas células epiteliais é induzida pela IL-1 β e dependente da via NF κ B, sendo, portanto, associada à uma resposta pró-inflamatória (100, 101).

Na prática clínica, é utilizada como reagente de fase aguda, funcionando como marcador sérico, urinário e tecidual para lesão renal aguda (102, 103). Tem-se observado que as concentrações de NGAL em determinados fluidos corpóreos se relacionam com a contagem de células brancas nestas amostras, possivelmente, por ser produzida por neutrófilos e modular suas funções (104-106).

Os sideróforos são proteínas presentes em algumas espécies bacterianas que captam o ferro do hospedeiro transportando-o para uso no metabolismo bacteriano (Figura 3). A presença de sideróforos na *Gardnerella vaginalis* revela que este micro-organismo utiliza ferro para seu metabolismo e, portanto, é susceptível à ação da NGAL (107). Sabe-se que na VB, o LPS das bactérias Gram-negativas são ligantes de TLR-4 na célula epitelial vaginal, um receptor que estimula a produção de NGAL em outros sites. Ligantes da *Candida sp* também estimulam TLRs no epitélio vaginal (61), o que poderia estimular a síntese de NGAL. Mediante

estes achados e, considerando as diferentes respostas imunes desencadeadas nestas infecções vaginais, houve interesse em analisar o comportamento da NGAL em patologias que são tão frequentes na ginecologia e obstetrícia.

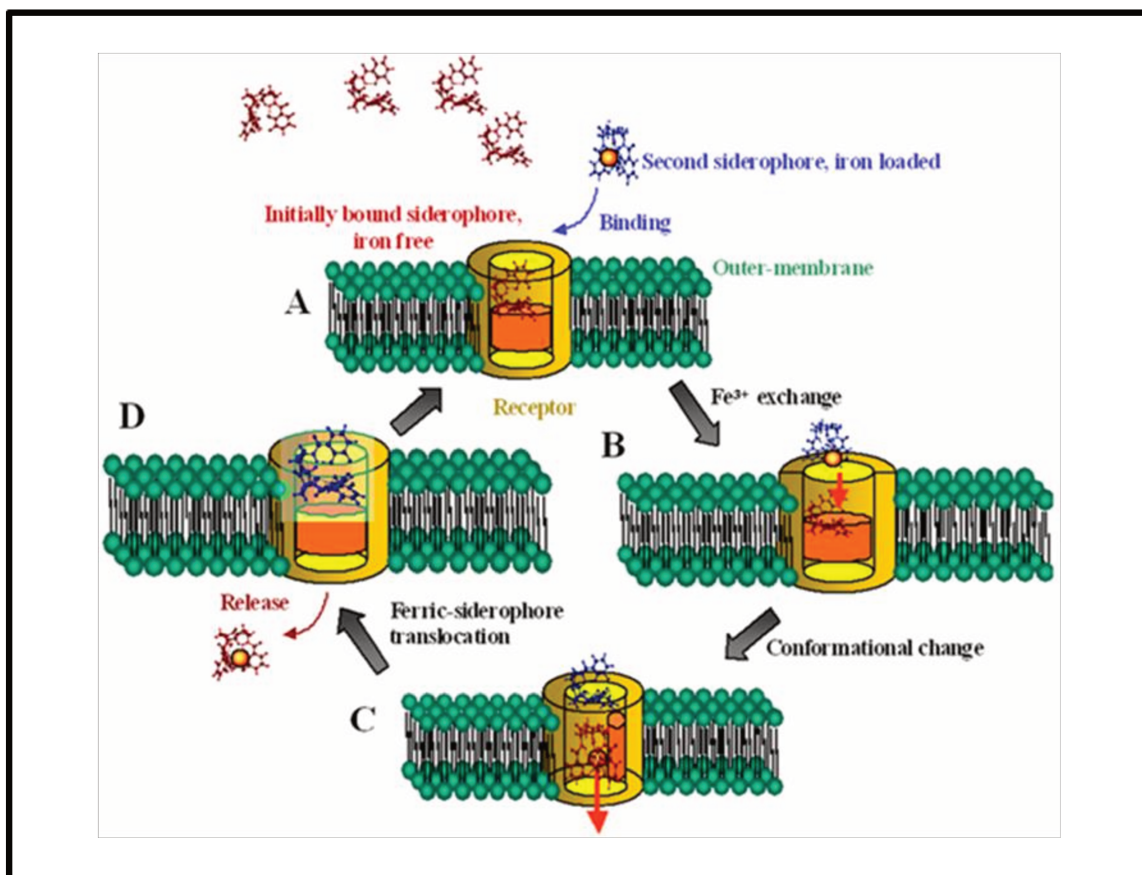


Figura 3. Mecanismo de utilização dos sideróforos pelas bactérias. Extraído de www.cchem.berkeley.edu/knrgpr/fe.html com autorização do Professor Ken Raymond.

As principais funções dos ácidos lácticos (D e L) e dos mediadores bioquímicos analisados neste estudo são descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Principais funções do ácido láctico e dos mediadores bioquímicos

Substância	Principais funções
Ácido Láctico-D	Acidificação vaginal
Ácido Láctico-L	Acidificação vaginal Propriedades imunológicas
EMMPRIN	Cofator para MCT (transporte transmembrana ácido láctico-L) Potente indutor de metaloproteinases (MMPs) Indutor de hialurona Contribui para resposta inflamatória
MMP-8	Degrada matriz extracelular Mediador central dos processos inflamatórios agudo e crônico
Hialurona	Principal componente da matriz extracelular Propriedades anti-inflamatórias e pró-inflamatórias
Hialuronidase	Enzima que degrada a HMW-HA em LMW-HA
NGAL	Peptídeo antimicrobiano ativo contra micro-organismos que utilizam sideróforos para seu metabolismo
β-defensina	Peptídeo antimicrobiano com efeito microbicida contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, fungos e vírus

As VV são patologias extremamente frequentes no ambiente de trabalho de qualquer ginecologista e obstetra, não isentas de riscos que deveriam receber a devida atenção por parte da comunidade médica e científica. O estado atual de conhecimento necessita de novos estudos para se compreender a fisiopatologia das diversas VV, principalmente nos casos recorrentes e os mecanismos relacionados às suas nefastas consequências.

Os mecanismos de defesa da mucosa vaginal têm se mostrado complexos e requerem a interação entre várias substâncias e células. Diversos mediadores imunes, entre eles, ácido láctico (D e L), EMMPRIN, MMP-8, HA, hBD2 e NGAL, já conhecidos na imunologia, precisam ter seu papel estabelecido na resposta imune vaginal. O ácido láctico vem sendo relacionado a funções de defesa do trato genital inferior e sabe-se que é capaz de melhorar a resposta imune local. Por outro lado, o seu papel como indutor desses mediadores ainda precisa ser definido. Apesar do seu efeito microbicida, não se conhece as implicações do ácido láctico na indução de peptídeos antimicrobianos como NGAL e hBD2. Nas VV, as relações entre EMMPRIN, MMP-8, HA e ácido láctico também precisam ser investigadas. Estas informações são fundamentais para se elucidar, no ambiente vaginal, os mecanismos de remodelação da MEC e de proteção da barreira epitelial contra infecções.

A partir destes dados, uma gama de aplicações clínicas pode ser possível. A elaboração de uma bateria de testes para dosar substâncias importantes na imunidade vaginal. Este painel poderia ser usado em mulheres susceptíveis à infecções recorrentes na tentativa de identificar as alterações responsáveis pelas recorrências. A administração de uma ou mais destas substâncias,

preventivamente, ou como adjuvantes ao tratamento, para reposição ou para controle do processo inflamatório, também seria outro ponto interessante.

Portanto, este estudo é fundamental para avaliar como estes mediadores se expressam no ambiente vaginal e, principalmente, qual seria a inter-relação entre eles em condições saudáveis e durante um episódio de VV. As pesquisas sobre os mecanismos fisiopatológicos do ecossistema vaginal, podem, no futuro, implementar a abordagem das VV, sobretudo nos casos recorrentes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Comparar e correlacionar as concentrações vaginais de ácido láctico e de mediadores imunes em mulheres híginas e com vulvovaginites, além de verificar as associações destes mediadores com os leucócitos presentes na cavidade vaginal.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar os níveis dos isômeros D e L do ácido láctico, EMMPRIN, MMP-8 no fluido vaginal de mulheres com vaginose bacteriana, candidíase, vaginose citolítica e mulheres híginas.
- Verificar se há correlação entre os níveis de ácido láctico, EMMPRIN, MMP-8.
- Comparar os níveis de NGAL no fluido vaginal de mulheres com vaginose bacteriana, candidíase e mulheres híginas.
- Verificar se há correlação entre os níveis de ácido láctico e NGAL.
- Dosar os níveis de EMMPRIN, MMP-8, HA, Hyal-1, NGAL e hBD2 no fluido vaginal de mulheres com diferentes diagnósticos e correlacioná-los com os leucócitos presentes nos esfregaços vaginais.

3. SUJEITOS E MÉTODOS

Sujeitos de pesquisa

Participaram deste estudo 233 mulheres provenientes do Ambulatório de Infecções Genitais Femininas e de outros Ambulatórios do Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (DTG/FCM/Unicamp). Este estudo analítico de corte transversal foi realizado no período de maio à novembro de 2013.

Foram incluídas mulheres no menacme com e sem infecções genitais e, que já tivessem iniciado a atividade sexual. Não foram incluídas mulheres no período menstrual, gestantes, mulheres que usaram antibióticos, antifúngicos, corticosteroides, imunossupressores ou cremes vaginais nas últimas 2 semanas ou, que tiveram relação sexual nas últimas 48 horas. Foram excluídos os casos que o material coletado para análise foi inadequado ou que os resultados dos testes foram inconclusivos.

Todas as mulheres foram previamente informadas sobre as propostas do estudo e, preencheram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pós-informação (Anexo 1) respeitando as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (CEP/FCM/Unicamp). Este estudo foi aprovado pelo CEP/FCM/Unicamp em 16 de novembro de 2012 (Anexo 2) e financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), projeto n°. 2011/19960-9.

Tamanho amostral

O cálculo foi baseado em um experimento piloto que observou as concentrações vaginais de ácido láctico-D aferidas por ELISA (*Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*). Nas amostras analisadas, a média de ácido láctico-D foi de 0,58 mM em mulheres com flora lactobacilar versus 0,03 mM naquelas em que a flora não era dominada por lactobacilos. Portanto, usando um cálculo para análise de poder, foi calculado que seriam necessárias 222 mulheres com e sem infecção genital para alcançar 80% de poder estatístico.

Variáveis

Concentração vaginal de ácido láctico-L: definida pelos níveis de ácido láctico-L no material coletado da cavidade vaginal das mulheres estudadas, mensurada por técnica de ELISA (mM).

Concentração vaginal de ácido láctico-D: definida pelos níveis de ácido láctico-D no material coletado da cavidade vaginal das mulheres estudadas, mensurada por técnica de ELISA (mM).

Concentração vaginal de EMMPRIN: definida pelos níveis de EMMPRIN no material coletado da cavidade vaginal das mulheres estudadas, mensurada por técnica de ELISA (ng/ml).

Concentração vaginal de MMP-8: definida pelos níveis de MMP-8 no material coletado da cavidade vaginal das mulheres estudadas, mensurada por técnica de ELISA (ng/ml).

Concentração vaginal de NGAL: definida pelos níveis de NGAL no material coletado da cavidade vaginal das mulheres estudadas, mensurada por técnica de ELISA (ng/ml).

Concentração vaginal de HA: definida pelos níveis de HA no material coletado da cavidade vaginal das mulheres estudadas, mensurada por técnica de ELISA (ng/ml).

Concentração vaginal de Hyal-1: definida pelos níveis de Hyal-1 no material coletado da cavidade vaginal das mulheres estudadas, mensurada por técnica de ELISA (ng/ml).

Concentração vaginal de hBD2: definida pelos níveis de hBD2 no material coletado da cavidade vaginal das mulheres estudadas, mensurada por técnica de ELISA (ng/ml).

Mulheres sem infecção genital (hígidas): definida pela ausência de sinais clínicos de processo inflamatório da mucosa vaginal, presença de flora predominantemente lactobacilar, sem agentes patogênicos na bacterioscopia e, resultado negativo da cultura para fungo e do PCR (*polymerase chain reaction*) para *Chlamydia trachomatis* e *Neisseria gonorrhoeae*.

Vaginose bacteriana: definida pela presença de pelo menos três dos quatro critérios de Amsel: pH $\geq$ 4,5, teste das aminas positivo, conteúdo vaginal fino e homogêneo, presença de *clue cells* no exame bacterioscópico, confirmada pelo escore de Nugent $\geq$ 7.

Candidíase: definida pela presença de conteúdo vaginal associado à visualização de blastosporos e/ou pseudo-hifas no exame bacterioscópico a fresco e/ou corado pelo Gram do conteúdo vaginal e/ou cultura para fungo positiva.

Vaginose citolítica: definida pela visualização de conteúdo vaginal acompanhado da queixa prurido e/ou ardor, exame bacterioscópico mostrando lise celular, aumento do número de lactobacilos, ausência de leucócitos e/ou patógenos no esfregaço e, cultura para fungos negativa.

Tricomoniase: definida pela visualização de *Trichomonas vaginalis* no exame bacterioscópico a fresco e/ou corado pelo Gram do conteúdo vaginal.

Infecção por HPV: definida pelo PCR do material vaginal positivo para HPV.

Infecção por clamídia: definida pelo PCR do material vaginal positivo para *Chlamydia trachomatis*.

Infecção por gonococo: definida pelo PCR do material vaginal positivo para *Neisseria gonorrhoeae*.

Inflamação vaginal intensa: definida pela presença de mais que 4 leucócitos por campo na bacterioscopia vaginal corada pelo Gram em aumento de 1000x (objetiva de imersão).

Inflamação vaginal moderada: definida pela presença de 1 a 4 leucócitos por campo na bacterioscopia vaginal corada pelo Gram em aumento de 1000x (objetiva de imersão).

Inflamação vaginal ausente: definida pela ausência de leucócitos por campo na bacterioscopia vaginal corada pelo Gram em aumento de 1000x (objetiva de imersão).

Idade: anos completos por ocasião da consulta, referidos pela mulher.

Cor da pele: cor da pele da mulher, conforme observação do pesquisador: branca, negra, parda, amarela, indígena, outra.

Nível de escolaridade: anos de estudo completos por ocasião da consulta, informado pela mulher.

Método anticoncepcional: método usado pela mulher no intuito de evitar filho conforme informação da mulher, caracterizado em nenhum, vasectomia, laqueadura, coito interrompido, método hormonal (pílula oral e injetável), método de barreira (condom e diafragma) e dispositivo intra-uterino (hormonal e de cobre).

Número de gestações: número de vezes que a mulher ficou grávida, informados pela mulher.

Paridade: número de partos ocorridos por vias vaginal ou cesariana, informados pela mulher.

Número de abortos: total de perdas gestacionais com menos vinte semanas, informados pela mulher.

Quantidade de parceiros sexuais: número de parceiros sexuais nos últimos seis meses, informados pela mulher.

Quantidade de relações sexuais vaginais no último mês: número de coitos vaginal com penetração no período de um mês, referido pela mulher.

Tabagismo: hábito de fumar caracterizado pelo número de cigarros fumados por dia, e tempo em anos desde o início do hábito, referido pela mulher.

Coleta dos dados

Após admissão no estudo, todas as mulheres completaram um questionário sobre suas características sociodemográficas e histórias clínica, obstétrica e ginecológica (Anexo 3). Posteriormente foram submetidas a exame ginecológico para avaliação do conteúdo vaginal, medida do pH vaginal, teste das aminas, coleta

de material para bacterioscopia a fresco e corada pelo Gram e cultura para fungo em meio de Sabouraud, material para pesquisa de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria Gonorrhoeae* e HPV por técnica de PCR. Toda esta avaliação foi realizada para o diagnóstico de cada caso. O exame ginecológico e a coleta de todas as amostras foram realizados pela pesquisadora principal. Os exames microbiológicos (bacterioscopia e cultura) foram processados no Laboratório de Microbiologia do CAISM/Unicamp por profissional experiente e os PCRs foram realizados pelo Laboratório IPOG-Diagnóstico molecular, São Paulo.

Durante o exame ginecológico, coletou-se também material proveniente da parede vaginal para pesquisa dos mediadores imunes (ácidos lácticos D e L, EMMPRIN, MMP-8, NGAL, HA, Hyal-1 e hBD2). Um swab foi uniformemente esfregado à parede vaginal lateral direita e, a seguir, diluído em tubo cônico de eppendorf contendo 1 ml de solução tampão PBS (*phosphate buffered saline*) a 2%. Posteriormente, foi centrifugado por 8 minutos a 12.000 rpm para separar o pelet sobrenadante. O sobrenadante recuperado foi armazenado a -20°C. Ao término da coleta de dados, estas amostras foram devidamente encaminhadas por empresa especializada (World Courier do Brasil Transportes Internacionais Ltda) ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Obstetrícia e Ginecologia da Weill Cornell Medical College, Nova York, EUA, para análise futura.

Todas as amostras foram identificadas pelo número do sujeito de pesquisa e testadas sem conhecimento dos dados clínicos.

Exames e técnicas

Teste das aminas ou teste de Whiff: realizado seguindo a técnica padrão, colocando-se uma gota do conteúdo vaginal em lâmina de vidro e adicionado-se duas gotas de hidróxido de potássio a 10%. O teste é considerado positivo se exalar odor característico.

Mensuração do pH vaginal: realizada com fita colorimétrica da marca MERCK® (com faixa de variação que abrangem os valores de 4 a 7 com intervalos de variação de 0,3) colocando-se a fita na parede vaginal por um minuto e evitando o contato com o muco cervical.

Bacterioscopia a fresco: uma amostra do conteúdo vaginal foi coletada com swab estéril da parede vaginal e colocada em um frasco contendo 1 ml de solução salina. O processamento e leitura foi realizado por profissional experiente. Este exame esclarece o tipo de flora vaginal (1, 2 ou 3), a celularidade do esfregaço, a presença de *clue cells*, quantifica os leucócitos identificando a presença ou não de inflamação e identifica patógenos como fungos, tricomonas, entre outros.

Bacterioscopia com coloração de Gram: outra amostra do conteúdo vaginal foi espalhada em lâmina de vidro deixando-se secar para posterior coloração pelo método de Gram. Também foi processada e analisada por profissional competente. Este exame define o tipo de flora vaginal (1, 2 ou 3), identifica a celularidade do esfregaço, a presença de *clue cells*, quantifica os leucócitos identificando a presença ou não de inflamação, identifica patógenos como fungos, tricomonas, entre outros, além de realizar o score de Nugent para diagnóstico da vaginose bacteriana.

Cultura para fungo: uma amostra do conteúdo vaginal colhida da parede com swab estéril foi semeada em meio de Sabouraud, processada e analisada por profissional competente. Quando a cultura foi positiva para fungo semeou-se em meio específico para identificação da espécie (CHROMagar Candida).

PCR: amostra endocervical coletada por meio de escova específica, armazenada em frasco próprio (PreservCyt ThinPrep) para realização dos ensaios de amplificação de DNA para identificação de *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoea* e HPV por profissional competente. Os ensaios de PCR para *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoea* e HPV são testes qualitativos que necessitam de 1 mL de amostra de citologia líquida. O DNA é extraído, purificado e preparado para PCR a partir de amostras de citologia PreservCyt. O DNA alvo é amplificado por PCR com subsequente hibridização de ácidos nucleicos. Realiza-se controle interno da celularidade de amostra, além de se incluir em cada teste uma amostra de controle positivo e negativo.

Testes para mensuração dos mediadores imunes:

O sobrenadante proveniente do swab da parede vaginal foi analisado pela pesquisadora principal no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Weill Cornell Medical College. Foram mensuradas as concentrações vaginais dos isômeros do ácido láctico (AcL-L e AcL-D), EMMPRIN, MMP-8, NGAL, HA, Hyal-1 e hBD2 por técnica de ELISA seguindo o protocolo específico do fabricante para cada teste: ácido láctico (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA), EMMPRIN, MMP-8, NGAL, HA, Hyal-1 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) e hBD2 (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA, USA).

Princípio dos métodos:

*Human Total EMMPRIN DuoSet IC ELISA, Human Total MMP-8 DuoSet ELISA, Hyaluronan DuoSet ELISA, Human Hyaluronidase-1 DuoSet ELISA, Human Lipocalin-2/NGAL DuoSet ELISA, Human β -defensin 2 ELISA: O método baseia-se em reações individuais utilizando anticorpos específicos contra EMMPRIN, MMP-8, NGAL, HA, Hyal-1 ou hBD2, imobilizados em placas, para captura dos respectivos EMMPRIN, MMP-8, NGAL, HA, Hyal-1 ou hBD2, presentes nas amostras do fluido vaginal. Após a etapa de captura, o material não ligado é removido por lavagens da placa. O EMMPRIN, MMP-8, NGAL, HA, Hyal-1 ou hBD2 ligados ao anticorpo de captura são identificados por meio da adição de anticorpo de detecção específico conjugado à biotina que, pela ação da estreptavidina peroxidase é revelado (produção de cor).

*EnzyChrom™ L-Lactate Assay Kit e EnzyChrom™ D-Lactate Assay Kit: Baseia-se na ação da oxidação enzimática do lactato pela catalase lactato desidrogenase, formando NADH, o qual reduz o reagente MTT (formazan) gerando coloração azulada ao meio. A intensidade de coloração é proporcional a concentração de lactato e medida por espectrofotometria no comprimento de onda igual a 565 nm.

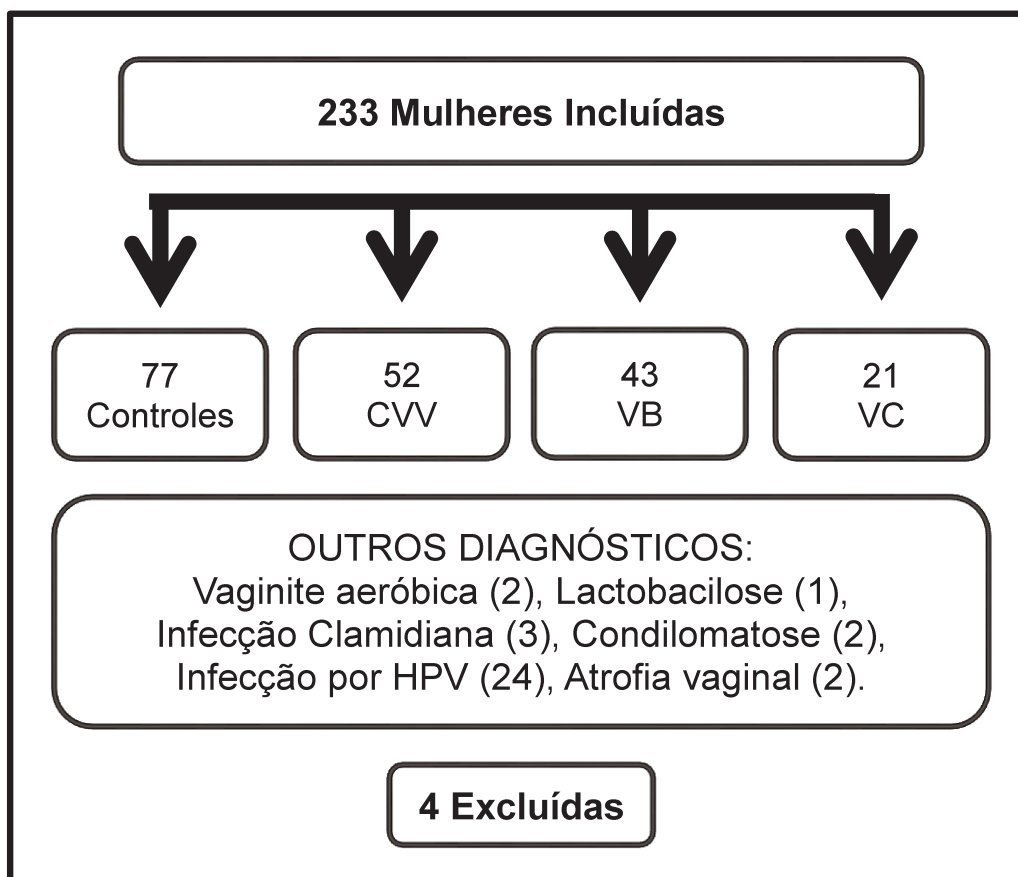
*O controle de qualidade das amostras considera as diferentes concentrações de ácidos lácticos D e L, EMMPRIN, MMP-8, NGAL, HA, Hyal-1 e hBD2 testadas em paralelo com cada lote de amostras de teste e utilizadas para construir uma curva padrão de densidade óptica versus concentração. A densidade óptica das amostras de teste é convertida em ng/ml ou pg/ml como referência para a curva padrão.

Após o processamento das amostras, seus valores de densidade óptica foram convertidos em ng/ml (EMMPRIN, MMP-8, HA, NGAL, hBD2), ou pg/ml (Hyal-1) segundo a curva padrão de referência gerada em concomitância com cada teste. Os limites inferiores de sensibilidade dos testes foram: 0.02 mmol/l para AcL-L e AcL-D, 39 pg/ml para EMMPRIN, 62.5 pg/ml para MMP-8, 78 pg/ml para NGAL, 0.4 ng/ml para HA, 12.5 pg/ml para Hyal-1 e 7.8 pg/ml para hBD2.

Grupos de pesquisa

Com os resultados dos exames diagnósticos, as mulheres foram alocadas nos seguintes grupos: candidíase vulvovaginal (n= 52; 22,3%), vaginose bacteriana (n= 43; 18,5%), vaginose citolítica (n= 21; 9,0%), vaginite aeróbia (n= 2; 0,8%), atrofia vaginal (n= 2; 0,8%), lactobacilose (n= 1; 0,4%), CVV+BV (n= 2; 0,8%), infecção por *Chlamydia trachomatis* (n= 3; 1,3%), DNA/HPV+ (n=24; 10,3%), condilomatose (n= 2; 0,8%) e controles sem infecção genital (n= 77; 33,1%). Quatro casos foram excluídos por diagnóstico incompleto (resultados dos testes não interpretáveis e/ou material inadequado para análise) (Quadro 1).

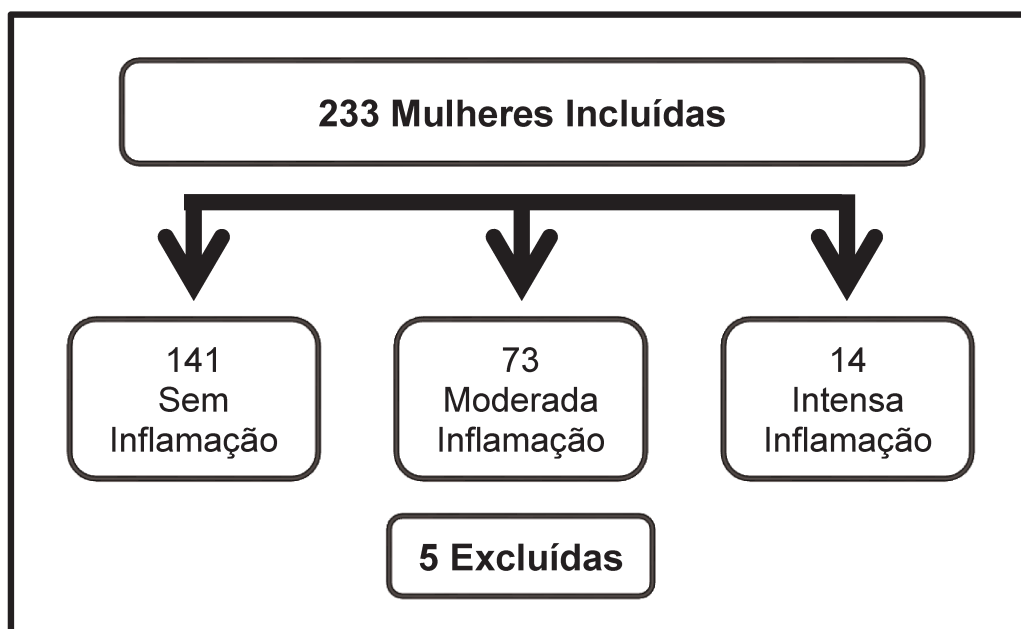
Após esta classificação, os maiores grupos, candidíase vulvovaginal (CVV), vaginose bacteriana (VB), vaginose citolítica (VC) e controles foram analisados em relação à concentração dos mediadores imunes.



Quadro 1. Grupos de pesquisa segundo o diagnóstico

Uma reanálise dos dados de toda a amostra foi realizada considerando-se as concentrações dos mediadores imunes em relação à magnitude da inflamação vaginal, representada pelo número de leucócitos presentes no esfregaço. Na bacterioscopia pelo Gram, foram eleitos os 10 campos melhores para visualizar bactérias, células epiteliais e leucócitos em aumento de 1000 (100x10). O número dos leucócitos (que eram predominantemente neutrófilos polimorfonucleares) foi mensurado no esfregaço considerando os campos escolhidos e, a média por campo foi calculada.

As amostras foram categorizadas em três grupos: ausência de inflamação (0 leucócitos por campo) (n= 141), inflamação moderada (1-4 leucócitos por campo) (n= 73) e inflamação intensa (> quatro leucócitos por campo) (n=14). Cinco casos foram excluídos desta análise devido a diagnóstico incompleto (resultados do teste não interpretáveis e/ou material inadequado para análise) restando o total de 228 mulheres para esta análise (Quadro 2).



Quadro 2. Grupos de pesquisa segundo a intensidade da inflamação vaginal

Análise Estatística

Calculou-se média, mediana, desvio-padrão (DP) e percentis das concentrações vaginais de AcL-L, AcL-D, EMMPRIN, MMP-8, NGAL, HA, Hyal-1, hBD2. Foram apresentados mediana e DP devido a distribuição assimétrica dos dados. Desta forma, os testes estatísticos utilizados para analisar as diferenças entre os grupos estudados foram testes não paramétricos: Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney.

Para verificar a associação dos mediadores imunes entre si, utilizou-se um teste de correlação não paramétrico: coeficiente de correlação de postos de Spearman (Spearman's rank correlation coefficient).

Para avaliação da homogeneidade entre os grupos de estudo em relação às variáveis descritivas foram utilizados os testes de qui-quadrado ou Exato de Fisher para as variáveis qualitativas e Kruskal-Wallis seguido de Mann-Whitney para as variáveis quantitativas.

O nível de significância foi assumido em 5% e o software utilizado para análise dos dados foi Graph Pad (Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA).

4. RESULTADOS



ARTIGO 1.

Beghini J, Linhares I, Giraldo P, Ledger W, Witkin S.
DIFFERENTIAL EXPRESSION OF LACTIC ACID ISOMERS, EXTRACELLULAR MATRIX METALLOPROTEINASE INDUCER, AND MATRIX METALLOPROTEINASE-8 IN VAGINAL FLUID FROM WOMEN WITH VAGINAL DISORDERS.

PUBLICADO: BJOG. 2014 SEP 8.

FATOR DE IMPACTO: 3.862

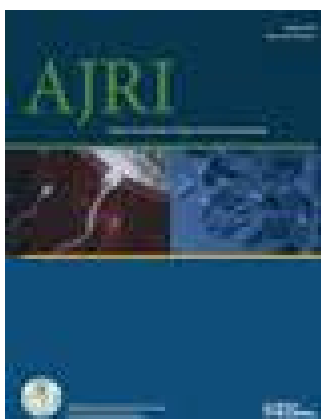


ARTIGO 2.

Beghini J, Giraldo PC, Linhares IM, Ledger WJ, Witkin SS.
NEUTROPHIL GELATINASE-ASSOCIATED LIPOCALIN CONCENTRATION IN VAGINAL FLUID: RELATION TO BACTERIAL VAGINOSIS AND VULVOVAGINAL CANDIDIASIS.

PUBLICADO: REPROD SCI. 2015 FEB 10.

FATOR DE IMPACTO: 2.179



ARTIGO 3.

Beghini J, Giraldo PC, Eleutério Jr J, Amaral RL, Polpeta NC, Gonçalves AKS.

VAGINAL INFLAMMATION: ASSOCIATION BETWEEN LEUKOCYTE CONCENTRATION AND IMMUNE MEDIATORS LEVELS.

SUBMETIDO: AJRI

FATOR DE IMPACTO: 2.668

4.1 Artigo 1

Differential expression of lactic acid isomers, extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinase-8 in vaginal fluid from women with vaginal disorders

Joziani Beghini^{a,b}, Iara M. Linhares^{a,c}, Paulo C. Giraldo^b, William J. Ledger^a, Steven S. Witkin^a

^aDivision of Immunology and Infectious Diseases, Department of Obstetrics and Gynecology, Weill Cornell Medical College, New York, New York, USA

^bDepartment of Gynecology and Obstetrics, University of Campinas, Campinas, Sao Paulo, Brazil

^cDepartment of Gynecology and Obstetrics, University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, Brazil

Correspondence: Steven S. Witkin, PhD, Department of Obstetrics and Gynecology, Weill Cornell Medical College, 525 East 68th Street, New York, New York 10065
Telephone: 212 746 3165 Fax: 212 7746 8799 email: switkin@med.cornell.edu

Running title: altered metabolites in vaginal disorders

Abstract

Objective Do metabolites in vaginal samples vary between women with different vaginal disorders.

Design Cross-sectional study

Setting Campinas, Brazil

Sample Seventy seven women (39.9%) with no vaginal disorder, 52 (26.9%) with vulvovaginal candidiasis (VVC), 43 (22.3%) with bacterial vaginosis (BV) and 21 (10.9%) with cytolytic vaginosis.

Methods Concentrations of D- and L-lactic acid, extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and matrix metalloproteinase (MMP)-8 and the influence of *Candida albicans* on EMMPRIN production by cultured vaginal epithelial cells were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Associations were determined by the Mann-Whitney test and by Spearman's rank correlation test.

Main outcome measures Metabolite levels and their correlation with diagnoses.

Results Vaginal concentrations of D- and L-lactic acid were reduced from control levels in BV ($p < 0.0001$). L-lactic acid levels were elevated in CTV ($p = 0.0116$). EMMPRIN and MMP-8 concentrations were elevated in VVC ($p < 0.0001$). EMMPRIN and L-lactic acid concentrations ($p \leq 0.008$), but not EMMPRIN and D- lactic acid, were correlated in all groups. EMMPRIN also increased in proportion to the ratio of L- to D-lactic acid in controls and in women with BV ($p \leq 0.009$). Concentrations of EMMPRIN and MMP-8 were correlated in controls and women with VVC ($p \leq 0.0002$). *Candida albicans* induced EMMPRIN release from vaginal epithelial cells.

Conclusions Vaginal secretions from women with BV are deficient in D-and L-lactic acid, women with VVC have elevated EMMPRIN and MMP-8 levels and women with CTV have elevated L-lactic acid levels. These deviations may contribute to the clinical signs, symptoms and sequelae characteristic of these disorders.

Keywords

D-lactic acid, L-lactic acid, extracellular matrix metalloproteinase inducer, matrix metalloproteinase-8, bacterial vaginosis, vulvovaginal candidiasis, cytolytic vaginosis

Tweetable abstract

The composition of vaginal fluid varies by clinical diagnosis

Introduction

Bacterial vaginosis (BV) and vulvovaginal candidiasis (VVC) are the first and second most frequent vulvovaginal disorder of reproductive age women¹. BV is characterized by alterations in the vaginal bacterial microbiota. *Lactobacillus* species become greatly reduced in number, whereas concentrations of *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, and gram-positive anaerobic rods are greatly elevated². VVC is mostly caused by an overgrowth of *Candida albicans* although other *Candida* species are sometimes involved. There is typically no change in the composition of the vaginal microbiota and vaginal pH remains unchanged³. Two additional common microbial vaginal disorders are trichomoniasis⁴ and cytolytic vaginosis (CTV). CTV is a disorder characterized by a large increase in the number of vaginal *Lactobacilli*, lysis of vaginal epithelial cells, absence of inflammation and symptoms of discharge and burning and/or itching⁵. The mechanisms responsible for the initiation and persistence of each of these disorders remain incompletely determined.

Recent studies on interactions between the vaginal microbiota and vaginal epithelial cells have provided an enhanced appreciation of the role of individual components in maintaining vaginal well being. L-lactic acid is produced by vaginal epithelial cells, *Lactobacilli* and other lactic acid-producing bacteria⁶. In addition to maintaining vaginal acidity, L-lactic acid participates in a number of immunological activities. It activates the Th17 subclass of T lymphocytes⁷, induces vaginal epithelial cells to release pro-inflammatory cytokines in the presence of a synthetic viral RNA⁸, modulates dendritic cell activation⁹, and is a potent inhibitor of the bacteria associated with BV¹⁰. D-lactic acid is produced almost exclusively by bacteria. Of

the four most prevalent species of vaginal *Lactobacilli* – *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus iners*, *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus jensenii* – all but *Lactobacillus iners* produce D-lactic acid¹¹. The function(s) of D-lactic acid in the vagina has been scarcely investigated. A recent report from our laboratory suggests that the ratio of L- to D-lactic acid in vaginal fluid may regulate the local production of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) by vaginal epithelial cells¹¹. EMMPRIN is an essential co-factor for monocarboxylate transporter-1, the receptor responsible for the regulation of intracellular lactic acid levels and prevention of acid-mediated cell death¹². EMMPRIN is also a potent inducer of matrix metalloproteinase (MMP)-8¹³. MMP-8 is capable of degrading the cervical plug and, thereby, allowing bacteria to gain access to the upper genital tract¹⁴.

In this communication we characterize the vaginal concentrations of D- and L-lactic acid, EMMPRIN and MMP-8 in women with BV, VVC and CTV, and compare the results with the levels present in women with no vaginal disorder. We then hypothesize on the influence of these findings on the pathogenesis and possible novel treatment of each disorder.

Methods

Subjects

A total of 209 premenopausal sexually active women attending the outpatient genital infections clinic in the Department of Obstetrics and Gynecology at Campinas University between May and November 2013 were eligible for analysis. Exclusion criteria were women having menses, pregnancy, current use of antibiotics, anti-fungal medications, corticosteroids or any other immunosuppressive medication or

any vaginal product and whose last vaginal sexual intercourse was <24 hours before attending the clinic. Women with a *Chlamydia trachomatis* cervical infection (n=3), mixed infections (n=2), vulvovaginal condylomatosis (n=2), other infrequent infections (lactobacillosis [n=1], aerobic vaginitis [n=2], atrophic vaginitis [n=2]), or incomplete diagnosis (n=4) were subsequently excluded, leaving a total of 193 women for analysis. All women completed a detailed questionnaire about medical history and demographic characteristics, and underwent a speculum-based gynecological examination.

Clinical evaluation

Vaginal samples were collected by swabbing the lateral wall with sterile cotton swabs. VVC was detected in symptomatic women by the presence of yeast or pseudohyphae in the vaginal discharge by microscopic examination, and confirmed by inoculating a Sabouraud dextrose CC agar slant (Becton-Dickinson, Sparks, MD) and by visual analysis of a Gram stain. Cervical samples were analysed for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by polymerase chain reaction (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ). BV was first identified by the Amsel criteria¹⁵ and then diagnosed by Gram stain as a Nugent score ≥ 7 ¹⁶. CTV was diagnosed in women with a vaginal discharge accompanied by itching and/or burning, whose Gram stain showed vaginal epithelial cell lysis, a massive increased number of *Lactobacillus* morphotypes, the absence of leukocytes or microbial pathogens, and a negative *Candida* culture⁵. The presence of *Trichomonas vaginalis* was ruled out by the absence of leukocytes and the protozoan on wet mount light microscopy of a vaginal sample.

In vitro Candida-vaginal epithelial cells analysis

We determined whether *C. albicans* had a direct effect on the induction of EMMPRIN by vaginal epithelial cells. A clinical isolate of *C. albicans* was inoculated onto Sabouraud agar and cultured at 28°C for 24 hours. A colony was then transferred to a centrifuge tube, washed three times by suspension and centrifugation in the Vx2/E6E7 cell culture medium, and resuspended in the same medium to a final concentration of 2×10^6 cells/ml. Actively proliferating cultures of the vaginal epithelial cell line, Vx2/E6E7, propagated and maintained as described previously⁸, were harvested and incubated at a concentration of 1×10^5 cells/well for 24 hours at 37°C, 5% CO₂ in the presence or absence of $1-2 \times 10^5$ *C. albicans* yeast cells. Culture supernatants were obtained by centrifugation and tested for EMMPRIN concentrations, as described below.

Laboratory analyses

Vaginal swab contents were released into 1 ml sterile phosphate-buffered saline by vigorous shaking, followed by centrifugation to remove particulate matter. The supernatants were stored in aliquots at -20°C. Samples were shipped overnight on dry ice to Weill Cornell Medical College in New York City for analysis. All samples were analysed without knowledge of clinical findings. Vaginal concentrations of the D- and L-lactic acid chiral isomers were determined colorimetrically using commercial kits (BioAssay Systems, Hayward, CA). Levels of EMMPRIN and MMP-8 were determined in duplicate by commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits (R & D Systems, Minneapolis, MN). Values were converted to mM (D- and L-Lactic acid) or ng/ml (EMMPRIN, MMP-8) by reference to a standard curve

that was generated in parallel to each assay. The lower limits of sensitivity were 0.02 mM for D- and L-lactic acid, 39 pg/ml for EMMPRIN and 62.5 pg/ml for MMP-8.

Statistics

Differences in concentration of D- and L-lactic acid, EMMPRIN, MMP-8 and the L/D lactic acid ratio between the subject groups was analyzed by the Mann-Whitney test because values were not normally distributed. Associations between D- and L-lactic acid, the L/D lactic acid ratio and EMMPRIN and MMP-8 were determined by the Spearman's rank correlation test. A p value < 0.05 was considered significant. All analyses utilized Graph Pad (Graph Pad Software, La Jolla, CA).

Results

Characteristics of our study population are detailed in Table 1. VVC was identified in 52 women, BV was present in 43 women and CTV was present in 21 women, whereas 77 women did not have any signs, symptoms, or laboratory analysis of a vaginal disorder, and were designated as healthy controls. None of the subjects were positive for *T. vaginalis* or *N. gonorrhoeae*. There were no statistically significant differences between groups in any of the variables listed.

The association between vaginal concentrations of D- and L-lactic acid, EMMPRIN and MMP-8, and clinical diagnosis is shown in Table 2. Median vaginal fluid concentrations of L-lactic acid were similar in control women and women with VVC. Levels were reduced in women with BV and elevated in women with CTV. D-lactic acid levels were similar in controls and in women with VVC and CTV, but lower in women with BV. Median vaginal EMMPRIN concentrations were similar in control women and those with BV or CTV, but were markedly elevated in women with VVC.

MMP-8 levels were similar in control women and women with BV, but were elevated in women with VVC and were reduced in women with CTV.

Associations between vaginal metabolites in the four subject groups are shown in Table 3. There was a strong correlation between concentrations of EMMPRIN and L-lactic acid, but not between EMMPRIN and D- lactic acid, in all groups. EMMPRIN levels also increased in proportion to the ratio of L- to D-lactic acid in vaginal fluid in the control group and in women with BV. The vaginal concentrations of EMMPRIN and MMP-8 were highly correlated in both the control women and in women with VVC.

To assess whether *C. albicans* was an inducer of EMMPRIN in vaginal epithelial cells, we determined EMMPRIN concentrations in culture supernatants of the vaginal epithelial cell line VK2/E6E7 following a 24 incubation with medium alone or with medium plus *C. albicans*. The vaginal epithelial cells spontaneously released EMMPRIN into the culture medium (mean of 9.4 ng/ml). The addition of 1×10^5 *C. albicans* increased EMMPRIN release to a mean of 11.9 ng/ml, and a doubling of the *C. albicans* concentration to 2×10^5 organisms resulted in a doubling of the EMMPRIN level to a mean value of 20.3 ng/ml. At the end of the incubation both yeast and hyphae forms of *C. albicans* were present. VK2/E6E7 cell viability was unaffected by the presence of *C. albicans*.

Discussion

Main findings

Compared with control women, vaginal concentrations of D- and L-lactic acid were decreased in women with BV, levels of EMMPRIN and MMP-8 were elevated

in women with VVC, and L-lactic acid concentrations were increased in women with CTV. In control women, vaginal concentrations of L-lactic acid and the L/D lactic acid ratio were highly correlated with levels of EMMPRIN and MMP-8. *C. albicans* induced the release of EMMPRIN from cultured vaginal epithelial cells.

Strengths and limitations

The strengths of the present study were that all subjects were seen at the same outpatient clinic during the same time period, and were evaluated by the same individual who also obtained the samples for laboratory analysis. Thus, diagnostic criteria and sample handling were identical for all women. All laboratory analyses were previously validated for vaginal samples and all testing was performed by a single individual, thereby minimizing interpersonal variability. A limitation of the present investigation is that we were unable to characterise the vaginal microbiota by gene amplification methodologies, and thus could not identify the species of *Lactobacilli* or the presence of *Gardnerella* and other bacteria associated with BV in our samples. Identification of individual species or genera in women with vaginal disorders is necessary to more completely define the associations that were evidenced in the present investigation.

Interpretation

We previously reported on associations between D- and L-lactic acid, EMMPRIN and MMP-8 in vaginal fluid from asymptomatic reproductive age women in which the vaginal microbiota were characterised by non-culture, gene amplification technology¹¹. In that study, vaginal communities dominated by *L. crispatus*, *L. gasseri* and *L. jensenii* had the highest levels of D-lactic acid and this isomer was essentially absent in communities dominated by *Gardnerella* or *L. iners*.

Vaginal L-lactic acid levels were also lowest in women whose vaginal microbiota was dominated by *Gardnerella*. As BV is characterized by a loss of *Lactobacilli*, with the possible exception of *L. iners*, and is frequently dominated by *Gardnerella*, it was not unexpected, therefore, that in the present study vaginal fluid from women with BV had reduced levels of D- and L-lactic acid compared with the other groups evaluated. The detection of vaginal D-lactic acid at low levels, rather than being totally absent, in women with BV may reflect the presence of minor concentrations of lactic acid-producing bacteria. Although L-lactic acid and EMMPRIN levels were highly associated in women with BV, similar to what was observed in the other subjects, there was no association between EMMPRIN and MMP-8 levels in women with BV. As MMP-8 is predominantly released by phagocytic cells, which are strikingly absent in BV, this finding is not surprising. The immunological properties of L-lactic acid⁷⁻⁹, as well as the ability of L-lactic acid to preferentially kill bacteria associated with BV¹⁰, are being increasingly recognized. The diminution in L-lactic acid concentration in women with BV may contribute to the proliferation of BV-associated bacteria as well as a decreased vaginal pro-inflammatory immune response. Providing additional exogenous L-lactic acid, or a more favorable L/D lactic acid ratio to women with BV may be beneficial in restoring the normal vaginal microbiota and preventing recurrences.

The elevation in vaginal EMMPRIN concentration in women with VVC, and the lack of a strong association between the L- to D-lactic acid ratio and EMMPRIN levels, were unexpected, especially since levels of the lactic acid isomers in women with candidiasis were similar to those found in vaginal fluid from control women. We, therefore, evaluated whether *Candida* is also an inducer of EMMPRIN from vaginal

epithelial cells, and this was clearly the case. *In vitro* incubation of vaginal VK2/E6E7 cells with *C. albicans* led to the release of EMMPRIN in proportion to the *Candida* concentration. This excessive induction of EMMPRIN by *C. albicans* may be necessary because *Candida* also possesses a cell surface monocarboxylate transporter-1¹⁷ and, therefore, EMMPRIN may be an essential co-factor for the optimal regulation of L-lactic acid transport into and out of the yeast cells. The concomitant elevation in MMP-8 in vaginal fluid from women with VVC would be expected as EMMPRIN is a potent inducer of this enzyme, and leukocytes are abundantly present in women with VVC³. Elevated MMP-8 levels may enhance tissue destruction, induce a pro-inflammatory immune response, facilitate *Candida* penetration of the vaginal epithelia, and exacerbate clinical symptoms. It would be of interest to determine further possible relationships between vaginal EMMPRIN and/or MMP-8 concentrations, the *C. albicans* yeast-to-hyphal transition, and susceptibility to VVC or its recurrences.

As CTV is characterized by an excess of *Lactobacilli*, it is not unexpected that L-lactic acid levels would be elevated in vaginal fluid from women positive for this disorder, however, the levels of D-lactic acid were not elevated. This suggests that it is not the *Lactobacilli* that produce D-lactic acid, namely *L. crispatus*, *L. jensenii* and *L. gasseri*, that are present in higher concentrations. A plausible explanation for the lysis of vaginal epithelial cells in women with this disorder is that the excess L-lactic acid production in the absence of a concomitant increase in D-lactic acid leads to a reduction of the intracellular pH and induction of cell necrosis. It has been demonstrated that D-lactic acid competes with L-lactic acid for binding to monocarboxylate transporter-1 and thereby decreases the entry of L-lactic acid into

cells¹⁸. Perhaps exogenous administration of D-lactic acid would reduce the influx of L-lactic acid into the vaginal epithelial cells and diminish or prevent acid-mediated cell destruction. EMMPRIN levels were not higher in women with CTV compared to controls, despite elevated L-lactic acid production, probably as a result of the lysis of vaginal epithelial cells.

In the present study, in control women with no evidence of a vaginal disturbance, vaginal concentrations of EMMPRIN and L-lactic acid, but not EMMPRIN and D-lactic acid, were highly correlated. Similarly, EMMPRIN levels increased with an increasing L-to D-lactic acid ratio, and the concentrations of EMMPRIN and MMP-8 were also highly correlated. These observations agree with our prior report on associations between D and L-lactic acid, EMMPRIN and MMP-8 in vaginal fluid from asymptomatic reproductive age women¹¹.

Conclusion

By influencing the relative vaginal levels of D- and L-lactic acid, which determines the rate of release of mediators from host cells, the composition of the endogenous vaginal microbiome may play a larger than expected role in the pathophysiology and consequences of female genital tract disorders. Manipulation of the vaginal concentration of lactic acid isomers may be a novel means of prevention and treatment of these problems.

Disclosure of interests

None of the authors have a conflict of interest

Contribution to authorship

JB and PCG performed and analyzed all of the clinical data, obtained the vaginal samples and contributed to data analysis and manuscript writing. JB performed the actual laboratory analyses. WJL contributed to data analysis and manuscript writing. SSW and IML conceived of the study, analyzed the data and wrote the first draft of the manuscript.

Details of ethics approval

The study was approved by the Ethics and Research Committee at the University of Campinas on 11/16/2012 (#155.315) and written informed consent was obtained from all participants.

Funding

The investigation was funded by a grant to PCG from the Research Support Foundation of Sao Paulo (FAPESP), project no. 2011/19960-9. JB was the recipient of a CAPES fellowship , project no. 4889-13-14.

Acknowledgments

The supervision of the laboratory studies by Ann Marie Bongiovanni at Weill Cornell Medical College and technical assistance of Ruth Riboldi at the University of Campinas are gratefully acknowledged.

References

1. Anderson MR, Klink K, Cohrssen A. Evaluation of vaginal complaints. *JAMA* 2004;291:1368-79.
2. Donders G. Diagnosis and management of bacterial vaginosis and other types of abnormal vaginal bacterial flora: a review. *Obstet Gynecol Surv* 2010;65:462-73.
3. Sobel JD, Faro S, Force RW, Foxman B, Ledger WJ, Nyirjesy PR, et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:203-11.
4. Muzny CA, Schwebke JR. The clinical spectrum of *Trichomonas vaginalis* infection and challenges to management. *Sex Transm Infect* 2013;89:423-5.
5. Cerikcioglu N, Beksac MS. Cytolytic vaginosis: misdiagnosed as candidal vaginitis. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2004;12:13-6.
6. Linhares IM, Summers PR, Larsen B, Giraldo PC, Witkin SS. Contemporary perspectives on vaginal pH and lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol* 2011;204:120e1-5.
7. Witkin SS, Alvi S, Bongiovanni AM, Linhares IM, Ledger WJ. Lactic acid stimulates interleukin-23 production by peripheral blood mononuclear cells exposed to bacterial lipopolysaccharide. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2011;61:153-8.
8. Mossop H, Linhares IM, Bongiovanni AM, Ledger WJ, Witkin SS. Influence of lactic acid on endogenous and viral RNA-induced immune mediator production by vaginal epithelial cells. *Obstet Gynecol* 2011;118:840-6.

9. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Ebner S, Mueller-Klieser W, Hoves S, Andreesen R, et al. Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. *Blood* 2006;107:2013-21.
10. O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. *BMC Infect Dis* 2011;11:200. Doi. 10.1186/1471-2334-11-200.
11. Witkin SS, Mendes-Soares H, Linhares IM, Jayaram A, Ledger WJ, Forney LJ. Influence of vaginal bacteria and D- and L-lactic acid isomers on vaginal extracellular matrix metalloproteinase inducer: implications for protection against upper genital tract infections. *mBio* 2013;4:e00460-13.
12. Wilson MC, Meredith D, Fox JE, Manoharan C, Davies AJ, Halestrap AP. Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4; the ancillary protein for the insensitive MCT2 is EMBIGIN (GP70). *J Biol Chem* 2005;280:27213-21.
13. Iacono KT, Brown AL, Greene MI, Saouaf SJ. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. *Exp Mol Pathol* 2007;83:283-95.
14. Rahkonen L, Rutanen EM, Unkila-Kallio L, Nuutila M, Nieminen P, Sorsa T, et al. Factors affecting matrix metalloproteinase-8 levels in the vaginal and cervical fluids in the first and second trimester of pregnancy. *Hum Reprod* 2009;24:2693-2702.
15. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiological associations. *Am J Med* 1983;74:14-22.

16. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL, Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standard method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991;29:297-301.
17. Baltazar FI, Cassio F, Laeo C. Functional purification of the monocarboxylate transporter of the yeast *Candida utilis*. *Biotechnol Lett* 2006;28:1221-6.
18. Ling B, Peng F, Alcorn J, Lohmann K, Bandy B, Zello GA. D-lactate altered mitochondrial energy production in rat brain and heart but not liver. *Nutrition Metabolism* 2012;9:6-13.

Table 1. Sociodemographic and medical characteristics of the study population

Characteristic	Healthy women N = 77	Vulvovaginal candidiasis N = 52	Bacterial vaginosis N = 43	Cytolytic vaginosis N = 21
Age in years (SD)	31 (8.3)	28 (7.3)	29 (8.6)	32 (9.0)
White race	68.8%	69.2%	50.0%	71.4%
Years education (SD)	9.4 (3.8)	10.3 (4.2)	9.2 (3.1)	9.5 (3.7)
No. pregnancies				
0	40.2%	55.8%	30.9%	52.4%
1	14.3%	21.1%	16.7%	19.0%
>1	45.5%	23.1%	52.4%	28.8%
≥1 abortion	11.7%	15.4%	19.1%	9.5%
Contraception				
Pill	53.2%	57.8%	50.0%	47.7%
Condom	9.1%	19.2%	7.1%	19.0%
IUD	2.6%	1.9%	7.1%	0
Other/none	31.2%	19.2%	35.8%	28.5%
Recent sex partners (last six months)				
0	11.7%	7.7%	7.1%	9.5%
1	85.7%	82.7%	85.8%	80.9%
>1	2.6%	9.6%	7.1%	4.8%
Average no. vaginal intercourse per month (SD)	9.5 (6.1)	8.8 (5.8)	10.1 (6.8)	6.0 (5.4)
Smoker	13%	19.2%	28.6%	14.3%

Table 2. Concentration of vaginal metabolites in healthy controls and women with bacterial vaginosis, vulvovaginal candidiasis and cytolytic vaginosis

Assay	Diagnosis	Median value (range)
L-lactic acid	Controls	0.11mM (<0.02-1.64)
	BV	0.02mM (<0.02-1.43) ^a
	VVC	0.13mM (<0.02-2.14)
	CTV	0.31mM (0.04-3.75) ^b
D-lactic acid	Controls	0.03mM (<0.02-4.15)
	BV	<0.02mM (<0.02-0.40) ^c
	VVC	0.04mM (<0.02-2.47)
	CTV	0.03 mM (<0.02-1.71)
EMMPRIN	Controls	2.2ng/ml (0.2-7.6)
	BV	2.1ng/ml (0.3-6.5)
	VVC	3.6ng/ml (1.2-11.9) ^d
	CTV	2.4ng/ml (1.1-5.9)
MMP-8	Controls	8.1 ng/ml (0.08-61.4)
	BV	8.5 ng/ml (0.2-52.1)
	VVC	18.3 ng/ml (0.1-61.7) ^e
	CTV	3.7 ng/ml (<0.06-31.3)

^ap<0.0001 vs. control and VVC; ^bp = 0.0116 vs. control; ^cp <0.0001 vs. control, 0.0004 vs. VVC; ^dp<0.0001 vs. control, 0.0002 vs. BV; ^ep<0.0001 vs. control, 0.0019 vs. BV

Vaginal fluid from 77 controls, 43 women with bacterial vaginosis (BV), 52 women with vulvovaginal candidiasis (VVC) and 21 women with cytolytic vaginosis (CTV) were assayed for D- and L-lactic acid, EMMPRIN and MMP-8 by ELISA.

Table 3. Correlation between clinical diagnosis and metabolites in vaginal fluid

Pair	Spearman r			
	p value			
	Controls	BV	VVC	CTV
EMMPRIN – L-lactic acid	0.5009	0.6278	0.3730	0.6688
	<0.0001	<0.0001	0.0083	0.0009
EMMPRIN – D-lactic acid	0.0507	0.3093	-0.2563	0.0172
	0.6636	0.0462	0.0787	0.9410
EMMPRIN – L/D ratio	0.3311	0.4893	0.2953	0.0857
	0.0066	0.0096	0.0546	0.3106
EMMPRIN – MMP-8	0.4491	0.0415	0.5020	0.2558
	<0.0001	0.7928	0.0002	0.2630

BV, bacterial vaginosis; VVC, vulvovaginal candidiasis; CTV, cytolytic vaginosis

4.2 Artigo 2

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin concentration in vaginal fluid: relation to pathogenesis

Joziani Beghini^{a,b}, Paulo C. Giraldo^b, Iara M. Linhares^{a,c}, William J. Ledger^a, Steven S. Witkin^a

^aDivision of Immunology and Infectious Diseases, Department of Obstetrics and Gynecology, Weill Cornell Medical College, New York, New York, USA

^bDepartment of Gynecology and Obstetrics, University of Campinas, Campinas, Sao Paulo, Brazil

^cDepartment of Gynecology and Obstetrics, University of Sao Paulo Medical School, Sao Paulo, Brazil

Short title: NGAL and vaginal disorders

Correspondence: Dr. Steven S. Witkin, Department of Obstetrics and Gynecology, Weill Cornell Medical College, 525 East 68th Street, New York, New York 10065, telephone 212 746 3165, fax 212 746 8799, email switkin@med.cornell.edu

Abstract

Objective: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a component of innate immunity that prevents iron uptake by microorganisms. We evaluated whether NGAL was present in vaginal fluid and whether concentrations were altered in women with bacterial vaginosis (BV) or vulvovaginal candidiasis (VVC). **Methods:** Vaginal secretions from 52 women with VVC, 43 with BV, and 77 healthy controls were assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for NGAL, and for concentrations of L-lactic acid. **Results:** The median concentration of NGAL in vaginal fluid was significantly higher in control women (561 pg/ml) than in women with BV (402 pg/ml) ($p = 0.0116$) and lower in women with VVC (741 pg/ml) ($p = 0.0017$). Median lactic acid levels were similar in controls (0.11 mM) and women with VVC (0.13 mM) and lower in BV (0.02 mM) ($p < 0.0001$). The NGAL and lactic acid concentrations were highly correlated ($p < 0.0001$). **Conclusion:** A decrease in Lactobacilli and/or lactic acid plus the absence of leukocytes results in lower vaginal NGAL levels that might facilitate the growth of bacteria associated with BV.

Keywords: neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL); bacterial vaginosis; vulvovaginal candidiasis; vaginal fluid; innate anti-microbial immunity

Introduction

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), otherwise known as lipocalin-2, is a 25-kDa peptide produced by neutrophils, monocytes, and epithelial cells.^{1,2} It is a component of the antimicrobial innate immune system. By binding to siderophores, bacterial proteins that facilitate bacterial iron uptake, NGAL prevents bacterial iron acquisition and inhibits growth of gram-negative bacteria.³ Neutrophil gelatinase associated lipocalin is an acute-phase reactant whose production is upregulated following activation of Toll-like receptors by bacterial ligands and induction of the transcription factor, nuclear factor-kappa activated B cells.³⁻⁵ In addition, NGAL has received much recent attention as a biomarker in serum, urine, and tissue of acute renal injury.⁶ Both pro- and antitumor effects of NGAL expression have also been reported.⁵

Bacterial vaginosis (BV) and vulvovaginal candidiasis (VVC) are the 2 most common vaginal disorders of reproductive-age women. Bacterial vaginosis is a disorder characterized by the disappearance of *Lactobacillus* species from the vagina and their replacement by a large overgrowth of anaerobic and facultative gram-negative bacteria that are usually present only at low levels at this site.⁷ Bacterial vaginosis is diagnosed clinically by the presence of at least 3 of the following 4 criteria: a thin homogeneous discharge, a foul odor when vaginal fluid is mixed with KOH, the presence of bacteria lining the surface of epithelial cells when viewed by microscopy (clue cells), and a vaginal pH >4.5.⁸ The laboratory diagnosis of BV is considered more accurate and consists of analysis of bacterial morphotypes by Gram stain (Nugent score).⁹ Bacterial vaginosis is called “vaginosis” rather than

“vaginitis” because the vaginal discharge is typically not accompanied by leukocytosis, a classic sign of inflammation.

Vulvovaginal candidiasis is due to an overgrowth of *Candida* species, most commonly *Candida albicans*. It is associated with a thick curd-like discharge, symptoms of burning and pruritus, leukocyte infiltration, and the presence of intense inflammation.¹⁰ In contrast to BV, in most women with VVC the underlying vaginal microbiota remains unaltered.¹¹

The different associations between BV and VVC and the endogenous vaginal bacterial populations as well as variations in inflammatory immune responses to their occurrence prompted us to evaluate whether NGAL was a component of antimicrobial immunity when these disorders were present, and specifically was the concentration of NGAL in vaginal fluid altered in women with BV or VVC.

Material and method

Women who were seen at the outpatient clinic in the Department of Obstetrics and Gynecology at the University of Campinas in Brazil between May and November 2013 were recruited for this investigation. Women determined to be positive for BV were symptomatic and exhibited at least 3 of the Amsell clinical criteria⁸ and had a Gram stain Nugent score⁹ of ≥ 7 . Patients with VVC had *Candida* hyphae identified on a microscopic evaluation of vaginal fluid, a positive vaginal culture for *C. albicans*, and clinical signs and symptoms consistent with VVC. Healthy control women were those with a vaginal pH < 4.5, no vaginal discharge or physical complaints, and the presence of a *Lactobacillus*-dominated vaginal microbiota by Gram stain analysis. Patients were excluded if they were menstruating, were pregnant, used any

antibacterial, antifungal, or immunosuppressive medication within the previous 2 weeks, or had recent vaginal intercourse (48 hours). Women with a mixed infection (VVC plus BV) or other vaginal disorders were also excluded.

All women completed a detailed questionnaire about medical history and demographic characteristics and underwent a speculum-based gynecological examination. The final study population included 52 women with VVC, 43 with BV, and 77 healthy controls. The study was approved by the Ethics and Research Committee at the University of Campinas on 16 November, 2012 (#155.315) and written informed consent was obtained from all participants. All vaginal fluids were collected by a single investigator with a cotton swab, and the contents vigorously shaken into a tube containing 1 mL of sterile phosphate-buffered saline. The supernatant fraction was obtained by centrifugation and stored in aliquots at -20°C. Samples were shipped on dry ice by overnight express mail to Weill Cornell Medical College in New York City for analysis. All samples were tested without knowledge of clinical findings.

Vaginal concentrations of NGAL were quantitated by a commercial enzyme-linked immunosorbent assay kit (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota). L-Lactic acid levels were determined by colorimetric analysis (BioAssay Systems, Hayward, California). Values were converted to ng/mL (NGAL) or mmol/L (L-lactic acid) by reference to a standard curve that was generated in parallel to each assay. The lower limits of sensitivity were 78 pg/mL for NGAL and 0.02 mmol/L for L-lactic acid.

Differences in NGAL and lactic acid concentrations between the 3 participant groups were analyzed by the Kruskal-Wallis test, and differences between any 2 groups were determined by the Mann-Whitney test because the values were not

normally distributed. The association between lactic acid and NGAL levels was determined by the Spearman's rank correlation test. A p value <0.05 was considered significant. All analyses utilized Graph Pad (Graph Pad Software, La Jolla, California).

Results

There were no significant differences between women in each of the 3 study groups with respect to age, race, years of education, contraceptive usage, number of recent sexual partners, and smoking history. Women with VVC had fewer pregnancies than did women with BV ($p=0.0055$) or control women ($p=0.0149$). The data are shown in Table 1.

The median concentrations of both NGAL ($p=0.0014$) and lactic acid ($p<0.0001$) were significantly lower in vaginal fluid from women with BV than in the healthy control group. In contrast, the median concentration of NGAL was higher in vaginal samples from women with VVC than in the control women ($p=0.0003$). Vaginal lactic acid levels were comparable in fluid from the VVC and control groups (Table 2). The median (range) NGAL level was 402 (45-944) ng/mL in the women with BV, 741 (280-1969) ng/mL in women with VVC, and 561 (71-1228) ng/mL in the controls. The difference between the 3 groups was highly significant ($p<0.0001$). The median (range) lactic acid level was 0.02 (< 0.02-0.67) mmol/L in the women with BV, 0.13 (< 0.02-2.14) mmol/L in women with VVC, and 0.11 (< 0.02-1.64) mmol/L in the control women. The difference between women with BV and the other 2 groups was very significant ($p<0.0001$). In addition, the vaginal fluid concentrations of NGAL and lactic acid were highly correlated (Spearman $r = 0.5756$, $p<0.0001$).

The NGAL concentration in the vaginal sample from each individual from the 3 participant groups is shown in Figure 1. The lactic acid concentration in the vaginal sample from each individual from the 3 participant groups is shown in Figure 2.

Discussion

The present study demonstrated that NGAL is present in the vagina of healthy reproductive-age women and its concentration in vaginal fluid is associated with the lactic acid level in the vaginal lumen. Furthermore, the vaginal NGAL level is increased in women with VVC and, conversely, is decreased relative to control values in vaginal fluid obtained from women with BV.

These results suggest that NGAL is a physiological component of antimicrobial innate immunity in the vagina. It has been previously observed that NGAL is an acute-phase reactant whose release is greatly accentuated by the presence of microbes or their products that bind to and activate Toll-like receptors on host cells.³ In addition, NGAL has been shown to be constitutively produced by human trophoblast cells and levels were increased in the setting of intra-amniotic infection or by addition of proinflammatory cytokines to cultured trophoblast cells.¹² Thus, the elevated level of NGAL seen in women with VVC is most likely a consequence of a *Candida*-induced proinflammatory immune response in both vaginal epithelial cells and infiltrating neutrophils. Vaginal epithelial cells have been shown to possess Toll-like receptors.¹³ It is interesting to speculate that the elevated production of NGAL may contribute to the maintenance of a normal vaginal microbiota in most women with a *Candida* infection by preventing iron acquisition by BV-associated bacteria.^{11,14}

In BV, there is a loss of lactic acid-producing Lactobacilli that results in an elevation in vaginal pH and a concomitant large increase in the concentration of anaerobic and facultative gram-negative bacteria that are normally present in the vagina of healthy women at a much decreased level. The mechanisms responsible for this marked shift in the composition of the vaginal microbiota remain undetermined. The observation in the present investigation that NGAL concentrations are decreased in the vagina of women with BV suggests a novel hypothesis to at least partially explain this phenomenon. The low level of vaginal NGAL in women with BV may create conditions favorable to the growth of bacteria that utilize siderophores to obtain iron for growth. As mentioned previously, NGAL prevents iron uptake by gram-negative bacteria,³ which are the predominant bacterial genera that becomes elevated in the vagina of patients with BV. One of the most prevalent bacteria associated with BV is *Gardnerella vaginalis*. The presence of siderophores has been detected in 8 different strains of this microorganism,¹⁵ implying that an NGAL-involved mechanism may be involved in downregulating its proliferation.

In addition, our finding that NGAL and lactic acid concentrations in the vagina are highly correlated suggests that Lactobacilli or Lactobacillus-generated lactic acid may be an NGAL inducer. A recent report has demonstrated that IL-17 is a potent inducer of NGAL in mice.¹⁶ We and others have previously shown that lactic acid stimulates the IL-23/IL-17 T lymphocyte pathway^{17,18} and is capable of inducing the release of proinflammatory cytokines from vaginal epithelial cells.¹⁹ Thus, the loss in NGAL concentration in women with BV may be due, at least in part, to the dramatic decrease in Lactobacilli and/or lactic acid production. In addition, the absence of

leukocyte influx in BV, in contrast to the leukocyte infiltration that occurs in VVC, may further contribute to the different NGAL levels in the 2 vaginal disorders. The production of proteases by BV-associated bacteria may be a third mechanism resulting in lowered NGAL concentrations. Further study is required to validate the mechanisms and consequences of reduced vaginal NGAL levels in women with BV.

A limitation of the present study is that our protocol for collecting vaginal samples, while commonly employed, has limited reproducibility and so the reported values may not be precisely accurate. A further limitation is the absence of direct measurement of iron levels in the vagina of the various groups of participants. This analysis is complicated since we would need to determine the concentrations of both free iron and bound iron-containing complexes. This was not possible with the present samples. With the exception of *G vaginalis*, the mechanism of iron uptake by other BV-related bacteria and the influence of NGAL on this property can only be inferred. Furthermore, although the median differences in NGAL concentrations are highly significant, there is a degree of overlap in vaginal NGAL levels by individual women in the 3 groups. This suggests that additional factors, yet to be identified, also influence the extent of expression of NGAL in women with different clinical diagnoses. Thus, determination of a contributory role for NGAL in the etiology of BV, as well as in VVVC, awaits further analysis. Nevertheless, the identification of NGAL in vaginal fluid and its reduction in women with BV points to the potential involvement of this protein in development or persistence of this disorder and highlights the potential value of further studies to better define these relationships. It also suggests a potential mechanism whereby the exogenous addition of Lactobacilli, or even recombinant NGAL, may prevent or reduce the rate of recurrence of BV.

Acknowledgement

The supervision of the laboratory studies by Ann Marie Bongiovanni at Weill Cornell Medical College and technical assistance of Ruth Riboldi at the University of Campinas are gratefully acknowledged.

Declaration of Conflicting Interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: his work was supported by a grant to PCG from the Research Support Foundation of Sao Paulo (FAPESP), project no. 2011/19960-9. JB was the recipient of a CAPES fellowship, project no. 4889-13-14.

References

1. Schmidt-Ott KM, Mori K, Li JY, et al. Dual action of neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(2):407-413.
2. D'Anna R, Baviera G, Corrado F, Giordano D, Recupero S, Di Benedetto A. First trimester serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin in gestational diabetes. *Diabetic Med*. 2009;26(12):1293-1295.
3. Flo TH, Smith KD, Sato S, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*. 2004;432(7019):917-921.
4. Cowland JB, Sorensen OE, Schested M, Borregaard N. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is up-regulated in human epithelial cells by IL-1b, but not by TNF-a. *J Immunol*. 2003;171(12):6630-6639.
5. Bolignano D, Donato V, Lacquaniti A, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human neoplasias: a new protein enters the scene. *Cancer Lett*. 2012;288(1):10-16.
6. Haase M, Bellomo R, Haase-Fielitz A. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin. *Curr Opin Crit Care*. 2010;16(6):526-532.
7. Donders G. Diagnosis and management of bacterial vaginosis and other types of abnormal vaginal bacterial flora: a review. *Obstet Gynecol Surv*. 2010;65(7):462-473.
8. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med*. 1983;74(1):14-22.

9. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol.* 1991;29(2):297-301.
10. Sobel JD, Faro S, Force RW, et al. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. *Am J Obstet Gynecol.* 1998;178(2):203-211.
11. Zhou X, Westman R, Hickey R, et al. Vaginal microbiota of women with frequent vulvovaginal candidiasis. *Infect Immun.* 2009;77(9):4130-4135.
12. Tadesse S, Luo G, Park JS, et al. Intra-amniotic infection upregulates neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) expression at the maternal-fetal interface at term: implications for infection-related preterm birth. *Reprod Sci.* 2011;18(8):713-722.
13. Fichorova RN, Cronin AO, Lien E, Anderson DJ, Ingalls RR. Response to *Neisseria gonorrhoeae* by cervicovaginal epithelial cells occurs in the absence of toll-like receptor 4-mediated signaling. *J Immunol.* 2002;168(5):2424-2432.
14. Biagi E, Vitali B, Pugliese C, et al. Quantitative variations in the vaginal bacterial population associated with asymptomatic infections: a real-time polymerase chain reaction study. *Eur J Clin Microbiol Infect.* 2009;28(3):281-285.
15. Jarosik GP, Land CB, Duhon P, Chandler R Jr, Mercer T. Acquisition of iron by *Gardnerella vaginalis*. *Infect Immun.* 1998;66(10):5041-5047.
16. Ferreira MC, Whibley N, Mamo AJ, Siebenlist U, Chan YR, Gaffen SL. Interleukin-17-induced protein lipocalin 2 is dispensable for immunity to oral candidiasis. *Infect Immun.* 2014;82(3):1030-1035.

17. Witkin SS, Alvi S, Bongiovanni AM, Linhares IM, Ledger WJ. Lactic acid stimulates interleukin-23 production by peripheral blood mononuclear cells exposed to bacterial lipopolysaccharide. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011;61(2):153-158.
18. Shime H, Yabu M, Akazawa T, et al. Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23/IL-17 proinflammatory pathway. *J Immunol*. 2008;180(11):7175-7183.
19. Mossop H, Linhares IM, Bongiovanni AM, Ledger WJ, Witkin SS. Influence of lactic acid on endogenous and viral RNA-induced immune mediator production by vaginal epithelial cells. *Obstet Gynecol*. 2011;118(4):840-846.

Table 1. Characteristics of the study population

Characteristic	Bacterial vaginosis N = 43	Vulvovaginal candidiasis N = 52	Controls N = 77
Age in years (SD)	29 (8.6)	28 (7.3)	31 (8.3)
White race	50.0%	69.2%	68.8%
Years education (SD)	9.2(3.1)	10.3 (4.2)	9.4 (3.8)
Never pregnant	30.0%	55.8%	40.2%
>1 pregnancy	52.4%	23.1% ^a	45.5%
Contraception			
Pill	50.0%	57.8%	53.2%
Condom	7.1%	19.2%	9.1%
Other/none	42.9%	23.0%	37.7%
No. partners in last 6 months			
0	7.1%	7.7%	11.7%
1	85.8%	82.7%	85.7%
>1	7.1%	9.6%	2.6%
Smoker	28.6%	19.2%	13.0%

^ap = 0.0055 vs. BV, 0.0149 vs. controls.

Table 2. Concentrations of NGAL and lactic acid in vaginal secretions from women with bacterial vaginosis or vulvovaginal candidiasis

Diagnosis	No. tested	Median value (range)	
		NGAL (ng/ml)	Lactic acid (mM)
Bacterial vaginosis	43	402 (45-944) ^a	0.02 (<0.02-0.67) ^c
Vulvovaginal candidiasis	52	741 (280-1969) ^b	0.13 (<0.02-2.14)
Controls	77	561 (71-1228)	0.11 (<0.02-1.64)

^ap = 0.0014 vs. controls; ^bp = 0.0003 vs. controls; ^cp < 0.0001 vs. vulvovaginal candidiasis and controls. Analysis was by the Mann-Whitney test.

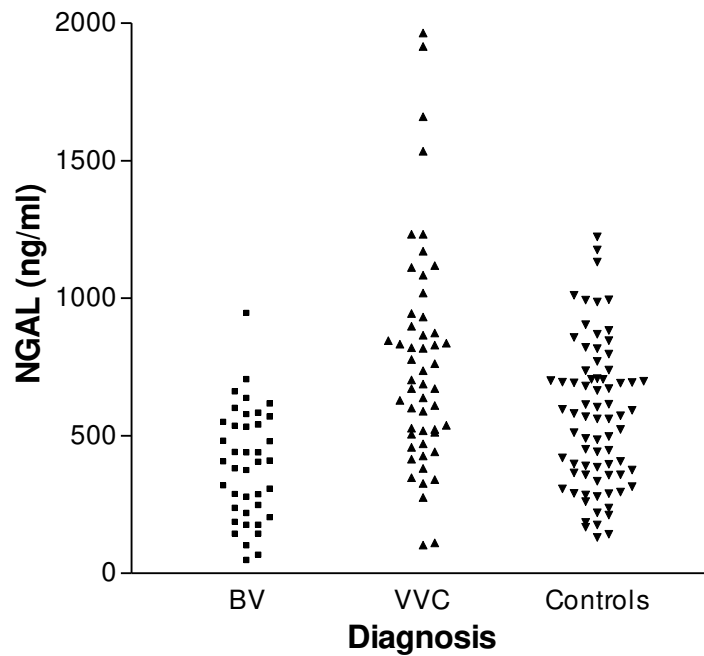


Figure 1. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) concentrations in vaginal secretions from individual women. Vaginal secretions in women with bacterial vaginosis (BV), vulvovaginal candidiasis (VVC) and healthy controls were analyzed for NGAL concentration by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

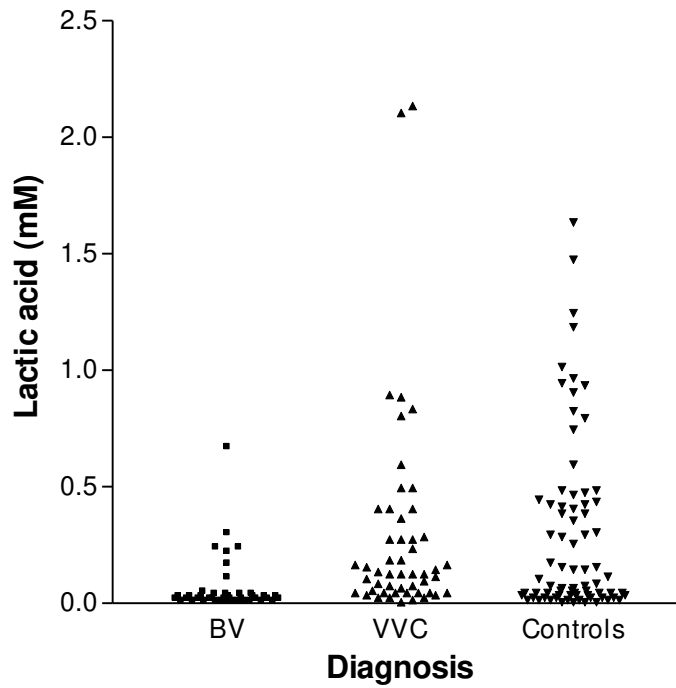


Figure 2. L-lactic acid concentrations in vaginal secretions from individual women. Vaginal secretions in women with bacterial vaginosis (BV), vulvovaginal candidiasis (VVC) and healthy controls were analyzed for L-lactic acid concentration by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

4.3 Artigo 3

Vaginal Inflammation: Association between leukocyte concentration and immune mediators levels

Joziani Beghini¹, Paulo Cesar Giraldo¹, José Eleutério Jr², Rose Luce do Amaral¹, Nádia Cristina Polpeta¹, Ana Katherine Gonçalves³

¹ Department of Gynecology and Obstetrics, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

² Department of Motherhood and Child, Federal University of Ceará, Fortaleza, Brazil

³ Department of Gynecology and Obstetrics, Federal University of do Rio Grande do Norte, Natal, Brazil

Running Head: Leukocytes and immune mediators in vaginal Inflammation

Correspondence:

Joziani Beghini, MD. Divisão de Ginecologia. CAISM – UNICAMP

Rua Alexander Fleming 101, Campinas, SP, Brazil, 13083-970.

Telephone/FAX: +55 19 35219306. Email: jozibeghini@yahoo.com.br

Abstract

Labeled problem: A wide variety of mediators are involved in inflammatory processes. However, the identity of those participating in vaginal immune responses has not been established. We correlated extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN), matrix metalloproteinase-8 (MMP-8), hyaluronan (HA), hyaluronidase-1 (Hyal-1), human β -defensin-2 (hBD2) and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) concentrations with the extent of leukocyte infiltration into the vagina and suggest their participation in vaginal inflammation. **Methods of study:** Vaginal fluid was obtained from 233 women seen at the outpatient clinic in the Department of Obstetrics and Gynecology at Campinas University, Brazil. The magnitude of vaginal inflammation was determined by the leukocyte count on vaginal smears and categorized as: no inflammation (0 leukocytes/field), moderate inflammation (1 to 4 leukocytes/field) and intense inflammation (>4 leukocytes/field). Concentrations of EMMPRIN, MMP-8, HA, Hyal-1, hBD2 and NGAL were determined in vaginal fluid by ELISA. **Results:** EMMPRIN, MMP-8, HA, hBD2 and NGAL concentration increased with elevated leukocyte numbers ($p < 0.05$), while Hyal-1 did not. EMMPRIN concentrations were correlated with HA and MMP-8 levels. **Conclusions:** EMMPRIN, MMP-8, HA, β -defensin and NGAL are elevated in women with vaginal inflammation.

Keywords: beta-defensin, extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN), hyaluronan, inflammation, leukocytes, matrix metalloproteinase-8 (MMP-8), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)

Introduction

The pro-inflammatory immune response is a substantial contributor to the inhibition of undesirable microorganisms from colonizing and propagating in the vagina. However, an overly vigorous inflammation can damage the cervix and vaginal epithelium, increasing the risk of sexually transmitted diseases (STDs) acquisition, including human immunodeficiency virus (HIV)⁽¹⁻³⁾.

Pathogen-associated ligands stimulate the release of pro-inflammatory cytokines that lead to the influx of immune cells to kill the invading microorganism. Subsequently, there is a resolution of inflammation and a remodeling of the extracellular matrix (ECM)⁽⁴⁾. Various mediators are implicated in this process. Hyaluronan (HA) is the main component of the ECM. It promotes cell adhesion, cell-to-cell communication and differentiation⁽⁵⁾, while concomitantly preventing dissemination of infection⁽⁶⁾. Hyaluronidases (Hyal) are a group of enzymes that participate in the regulation of HA metabolism and function. They degrade HA, generating oligosaccharides of different chain length⁽⁷⁾. During an established infection, HA degradation supports the immune system's anti-microbial responses⁽⁸⁾. In the lower genital tract, HA was shown to be crucial for the integrity of the epithelial barrier and consequently to prevent microorganisms from reaching the upper genital tract⁽⁹⁾.

Bacterial and fungi ligands as well as HA oligosaccharides induce self-defense mechanisms in the vaginal epithelium by activation of Toll-like receptors (TLRs) that stimulates epithelial cells to secrete human β -defensin 2 (hBD2)^(10,11). Beta defensins are microbicidal peptides active against many Gram-negative and Gram-positive bacteria, fungi, and enveloped viruses. This antimicrobial peptide is

implicated in the resistance of epithelial surfaces to microbial colonization. Defensins not only have the ability to strengthen the innate immune system but can also enhance the adaptive immune response by promoting chemotaxis of monocytes, T-lymphocytes, and mast cells to the infection site⁽¹¹⁾.

Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) or CD147 is an inducer of hyaluronan (HA) and the master regulator of matrix metalloproteinases (MMPs). It is widely expressed by epithelial cells and immune cells and plays a critical role in the regulation of inflammatory and immune responses⁽¹²⁾. MMPs are matrix-degrading enzymes secreted by inflammatory and stromal cells. Additionally, they control inflammatory responses by cleaving cytokines and chemokines to enhance or inhibit their activity. While appropriate concentration of MMPs facilitates an effective immune response, increased activity can elicit host tissue damage⁽⁴⁾. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) also known as collagenase-2 or neutrophil collagenase is expressed by neutrophils as well as inflammatory, epithelial and mesenchymal cells. It is associated with several inflammatory disorders and has been considered as a central mediator in both acute and chronic inflammation^(13,14). Neutrophil gelatinase-associated lipocalin protein (NGAL) is another protein involved in the vaginal immune response. It is an acute-phase reactant produced by neutrophils and monocytes and is up-regulated in acute and chronic inflammation^(15,16,17).

Most of the immune mediators described above are well known to be involved in the control or dissemination of infectious agents in others parts of the body. However, their participation in inflammation in the female lower genital tract has not been established.

The aim of this study was to correlate vaginal levels of EMMPRIN, MMP-8, HA, Hyal-1, hBD2 and NGAL with the concentration of leukocytes in the vaginal lumen and delineate the participation of these compounds in vaginal inflammation.

Methods

Subjects:

This cross-sectional study enrolled 233 women seen at the outpatient clinic in the Department of Obstetrics and Gynecology at Campinas University, Brazil, between May and November 2013. Inclusion criteria: women of childbearing age who had initiated sexual activity. Patients were not eligible for the study if they were menstruating, pregnant or using antibiotics, antifungals, corticosteroids, immunosuppressive drugs or vaginal cream (previous 2 weeks), or had vaginal intercourse (last 2 days). The study was approved by the Ethics and Research Committee at the University of Campinas and all participants provided written informed consent.

Clinical and microbiological evaluation:

All enrolled women completed a detailed questionnaire about their medical history and demographic characteristics, and underwent a speculum-based gynecological examination. Vaginal samples were collected by swabbing the lateral wall with sterile cotton swabs to perform a Gram stain and to culture for fungi on Sabouraud Dextrose CC Agar slants (Becton Dickinson and Company, Sparks, MD). Cervical samples were collected and placed in the Thinprep Pap Test medium (Hologic, Marlborough, MA) for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* identification by polymerase chain reaction (Roche Molecular Systems, Branchburg, NJ, USA).

The examination and microbiological analysis identified patients without any vaginal disorder who presented with a *Lactobacillus*-dominated vaginal microbiota and without clinical and microbiological signs of a cervicovaginal infection (n=101). Other women were diagnosed with vulvovaginal candidiasis (VVC), bacterial vaginosis (BV), cytolytic vaginosis, aerobic vaginitis, vaginal atrophy, lactobacillosis, VVC+BV, *Chlamydia trachomatis* infection and condylomatosis. Five women were excluded from this analysis due to uninterpretable test results and/or inadequate material collected for analysis.

Laboratory analysis:

The Gram stain was used to determine the magnitude of vaginal inflammation. To codify the analysis 10 fields were assessed to visualize bacteria, epithelial cells and leukocytes in a 1000 high power field (100x10). The number of leukocytes present in the 10 fields (predominantly polymorphonuclear neutrophils) were determined by direct counting and the average number per field was calculated. The vaginal samples were categorized as: no inflammation (0 leukocytes per field), moderate inflammation (1 to 4 leukocytes per field) and intense inflammation (>4 leukocytes per field). The same investigator collected all samples and a single expert biologist performed the Gram stain analysis.

For the ELISA assays, samples obtained from the lateral vaginal wall were diluted by vigorous agitation into 1 ml of sterile phosphate-buffered saline, followed by centrifugation and the supernatants were stored in aliquots at -20°C. Samples were shipped on dry ice by overnight express mail to Weill Cornell Medical College and analyzed by a single investigator blinded to all clinical information.

The vaginal levels of EMMPRIN, MMP-8, HA, HYAL-1, NGAL (R&D Systems, Minneapolis, MN) and human β -defensin (Phoenix Pharmaceuticals, Burlingame, CA) were determined in duplicate by commercial ELISA kits. Values were converted to ng/ml (EMMPRIN, MMP-8, HA, NGAL, hBD2), or pg/ml (HYAL-1) by reference to a standard curve that was generated in parallel to the test samples. The lower limit of sensitivity was 39 pg/ml for EMMPRIN, 62.5 pg/ml for MMP-8, 0.4 ng/ml for HA, 12.5 pg/ml for Hyal-1, 78 pg/ml for NGAL, 7.8 pg/ml for hBD2.

Statistics:

Differences in immune mediators concentrations among the subject groups were analyzed by the Kruskal-Wallis test, and differences between any two groups were determined by the Mann-Whitney test because the values were not normally distributed. A p value < 0.05 was considered significant. All analyses utilized Graph Pad (Graph Pad Software, La Jolla, CA).

Results

The final study population included 141 women with no vaginal inflammation, 73 with moderate inflammation and 14 with intense inflammation. Characteristics of the study population are detailed in Table 1. There were no significant differences among groups considering age, race, years of education, number of pregnancies, contraception, number of sexual partners, average intercourse per month and smoking status.

The immune mediator concentrations in women with different leukocyte counts are shown in Table 2. EMMPRIN, MMP-8 and NGAL levels were significantly associated with the leukocyte count in vaginal samples. HA levels were significantly higher in

both the moderate and intense inflammation groups when compared to the no inflammation group, but there was no difference in concentration between women in the two inflammation groups. HBD2 levels were highest in the intense inflammation group compared with women with moderate inflammation or no inflammation.

Correlations between EMMPRIN and MMP-8 and EMMPRIN and HA are shown in Figs 1 and 2, respectively. EMMPRIN concentrations in vaginal fluid were strongly correlated with HA (Spearman rho = 0.3997, $p < 0.0001$) and MMP-8 (Spearman rho = 0.3928, $p < 0.0001$) levels.

Discussion

This study analyzed components of the vaginal immune response in a large number of healthy asymptomatic women and in women diagnosed with inflammatory conditions. Cervicovaginal inflammation is linked to adverse maternal and fetal outcomes and a higher risk of acquiring sexually transmitted pathogens, including HIV^(1,3,18). *Candida*, *Trichomonas*, *Chlamydia* and *Gonococcus* infection are associated with leukocyte infiltration into the cervicovaginal mucosae⁽¹⁸⁾. Many gynecologists deal constantly with Pap smear tests showing intense inflammatory results but are unaware of the long-term significance and consequences of this finding. In our earlier studies we observed that women with VVC had elevated levels of EMMPRIN, MMP-8, HA, β -defensin and NGAL in vaginal fluid⁽¹⁹⁻²¹⁾. In the present study, we evaluated women with various diagnoses to evaluate the relationship between mucosal inflammation, measured by leukocyte numbers on a vaginal Gram stain, and the levels of these immune mediators.

Vaginal immune responses against pathogens typically involves activation of TLRs by microbial compounds triggering an acute inflammatory response through the NF κ B pathway. This leads to production of pro-inflammatory cytokines and chemokines, culminating in leukocyte infiltration into the vaginal mucosae^(22,23). EMMPRIN is expressed by vaginal epithelial cells and is up-regulated in activated neutrophils, T and B lymphocytes, monocytes, macrophages and dendritic cells. EMMPRIN elicits leukocyte recruitment in a number of inflammatory diseases⁽¹²⁾. In the present study, higher PMN numbers in vaginal smears corresponded to increased EMMPRIN levels in vaginal fluid (Table 2). Thus, the more intense is the inflammatory process the more EMMPRIN is produced by vaginal epithelial cells and immune cells present in vagina.

EMMPRIN is also a potent inducer of matrix metalloproteinases (MMPs) and regulates their activity⁽¹²⁾. MMP-8 is a matrix-degrading enzyme and a central regulator of acute and chronic inflammation. It is produced by inflammatory cells and cleave cytokines to regulate their activity in addition to its role in remodeling the ECM^(13,14). Our data indicates the higher PMN number on vaginal smears independent of diagnosis, the higher is the median MMP-8 level in vaginal fluid (Table 2). It has become clear that EMMPRIN is an inducer of MMP-8 in vaginal fluid^(19,24) and we found that EMMPRIN was highly correlated with MMP-8 in vaginal samples from women with and without inflammation (Figure 2). Excessive ECM degradation by higher levels of MMP-8 may contribute to the ability of microorganisms to bypass the epithelial barrier and induce lower and upper genital tract infections.

HA is the main component of the ECM and has been poorly studied in the vaginal environment. Studies in cancer have shown that EMMPRIN is an inducer of HA in tumor cells⁽²⁵⁾. HA is synthesized from glucose metabolism⁽⁸⁾ and vaginal epithelial cells are rich in glycogen, the major storage form of glucose⁽²⁶⁾. Our results showed that HA levels were higher in vaginal samples from women presenting with moderate and intense inflammation comparing to women with no inflammation (Table 2). Other previous studies revealed that HA is higher in vaginal samples from women with VVC and was associated with inflammatory symptoms^(21,27). In addition, our results demonstrated that EMMPRIN levels increased in proportion to HA levels in vaginal fluid from women with or without inflammation (Figure 3). Since EMMPRIN is an inducer of HA at other sites, this finding supports the hypothesis that EMMPRIN is also an inducer of HA in vaginal epithelial cells.

Hyal-1 concentrations were not statistically different among women with or without inflammation (Table 2). It has been reported that Hyal-2 and Hyal-3 are up-regulated by inflammatory cytokines, whereas Hyal-1 is not⁽⁷⁾. This may explain our observation.

As previously mentioned, bacterial and fungal compounds trigger TLR-2 and/or TLR-4 on epithelial cells and activate a series of events culminating in leukocyte infiltration and antimicrobial peptide production, including hBD2^(11,28). Human β -defensin 2 binds to negatively charged microbial membranes causing cell death and chemoattraction of immune cells⁽²⁹⁾. This pathway reinforces our findings that hBD2 increases according the degree of inflammation in vaginal smears (Table 2). Studies have observed elevated levels of hBD2 in patients with VVC, a common disorder presenting with leukocyte infiltration in the vaginal mucosae^(21,30).

NGAL is another molecule involved in inflammation. It is mainly produced by neutrophils and is up-regulated following activation of TLRs by bacterial ligands triggering events that lead to leukocyte migration. Pro-inflammatory cytokines are also able to activate the NF κ B pathway increasing NGAL up-regulation⁽¹⁵⁻¹⁷⁾. NGAL was recently demonstrated to be present in vaginal fluid. NGAL levels were higher relative to controls in patients with VVC and, conversely, lower in vaginal fluid from patients with BV⁽²⁰⁾. NGAL concentrations were shown to be directly related to leukocyte counts in samples from blood, urine and cerebrospinal fluid⁽³¹⁻³³⁾. Disparities in leukocyte influx that occur in VVC and BV can be one of the mechanisms implicated in the distinct NGAL concentrations. Our findings that NGAL levels were higher in association with elevated leukocyte numbers reinforce these observations (Table 2).

Studies have associated levels of immune mediators to leukocytes in body fluids⁽³¹⁻³³⁾. In the vaginal environment, Nenadic and Pavlovic measured a wide varied of cytokines in cervicovaginal samples and showed that only IL-8 was associated with elevated polymorphonuclear (PMN) cell counts on wet mount⁽³⁴⁾.

In the present study, patients presenting with elevated leukocytes in their vagina more frequently expressed elevated concentrations of compounds related to mucosae inflammation. This could increase the likelihood of tissue damage and lead to a worsening of their genital disorder. Our results support the idea that women presenting with large numbers of leukocytes on a vaginal smear should be investigated to find an explanation. Perhaps an easily performed and inexpensive vaginal smear showing 4 or more leukocytes per field of high magnification could

become the cut off, suggesting the need for further investigation on the cause of inflammation. Moreover, additional research in this field could identify vaginal markers that influence host susceptibility to infections and create a panel to be measured in patients at risk for genital infections. Establishing optimal levels of these substances in the vagina could be in the future, a new approach to prevent recurrences. A limitation of this study was that relations between leukocytes and mediators could be only inferred since it was a cross-sectional study.

In this study, we demonstrated that EMMPRIN, MMP-8, HA, NGAL, hBD2 were related to leukocytes present in vaginal fluid independent of the clinical vaginal diagnosis. Further studies are necessary to clarify the mechanism of activation of these substances in the vagina under conditions of changes in the vaginal microbiota, inflammation and infection.

Disclosure of interests

None of the authors have a conflict of interest

Details of ethics approval

The study was approved by the Ethics and Research Committee at the University of Campinas on 11/16/2012 (#155.315) and written informed consent was obtained from all participants.

Funding

The investigation was funded by a grant to PCG from the Research Support Foundation of Sao Paulo (FAPESP), project no. 2011/19960-9. JB was the recipient of a CAPES fellowship, project no. 4889-13-14.

Acknowledgments

The supervision of the laboratory studies by Ann Marie Bongiovanni at Weill Cornell Medical College, technical assistance of Ruth Riboldi at the University of Campinas and English language editing by Dr. Steven S. Witkin are gratefully acknowledged.

References

1. Mirmonsef P, Krass L, Landay A, Spear GT: The role of bacterial vaginosis and trichomonas in HIV transmission across the female genital tract. *Curr HIV Res.* 2012;10(3):202-10.
2. Mirmonsef P, Zariffard MR, Gilbert D, Makinde H, Landay AL, Spear GT: Short-chain fatty acids induce pro-inflammatory cytokine production alone and in combination with toll-like receptor ligands. *Am J Reprod Immunol.* 2012;67(5):391-400.
3. Mitchell C, Marrazzo J: Bacterial vaginosis and the cervicovaginal immune response. *Am J Reprod Immunol.* 2014;71(6):555-63.
4. Elkington PT, O'Kane CM, Friedland JS: The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clin Exp Immunol.* 2005;142(1):12-20.
5. Vigetti D, Karousou E, Viola M, Deleonibus S, De Luca G, Passi A: Hyaluronan: biosynthesis and signaling. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(8):2452-9.
6. Romagnoli M, Belmontesi M: Hyaluronic acid-based fillers: theory and practice. *Clin Dermatol.* 2008;26(2):123-59.
7. Girish KS, Kemparaju K: The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci.* 2007;80(21):1921-43.
8. Petrey AC, de la Motte CA: Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation. *Front Immunol.* 2014;5:101.

9. Akgul Y, Word RA, Ensign LM, Yamaguchi Y, Lydon J, Hanes J, et al. Hyaluronan in cervical epithelia protects against infection-mediated preterm birth. *J Clin Invest.* 2014;124(12):5481-9.
10. Dusio GF, Cardani D, Zanobbio L, Mantovani M, Luchini P, Battini L, et al. Stimulation of TLRs by LMW-HA induces self-defense mechanisms in vaginal epithelium. *Immunol Cell Biol.* 2011;89(5):630-9.
11. Pivarcsi A, Nagy I, Koreck A, Kis K, Kenderessy-Szabo A, Szell M, et al. Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human beta-defensin-2 in vaginal epithelial cells. *Microbes Infect.* 2005;7(9-10):1117-27.
12. Zhu X, Song Z, Zhang S, Nanda A, Li G: CD147: a novel modulator of inflammatory and immune disorders. *Curr Med Chem.* 2014;21(19):2138-45.
13. Van Lint P, Libert C: Matrix metalloproteinase-8: cleavage can be decisive. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006;17(4):217-23.
14. Dejonckheere E, Vandenbroucke RE, Libert C: Matrix metalloproteinase8 has a central role in inflammatory disorders and cancer progression. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2011;22(2):73-81.
15. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature.* 2004;432(7019):917-21.

16. Cowland JB, Sorensen OE, Sehested M, Borregaard N: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is up-regulated in human epithelial cells by IL-1 beta, but not by TNF-alpha. *J Immunol.* 2003;171(12):6630-9.
17. Chakraborty S, Kaur S, Guha S, Batra SK: The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1826(1):129-69.
18. Workowski KA, Berman S, Centers for Disease C, Prevention: Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. *MMWR Recomm Rep.* 2010;59(RR-12):1-110.
19. Beghini J, Linhares I, Giraldo P, Ledger W, Witkin S: Differential expression of lactic acid isomers, extracellular matrix metalloproteinase inducer, and matrix metalloproteinase-8 in vaginal fluid from women with vaginal disorders. *BJOG.* 2014.
20. Beghini J, Giraldo PC, Linhares IM, Ledger WJ, Witkin SS: Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Concentration in Vaginal Fluid: Relation to Bacterial Vaginosis and Vulvovaginal Candidiasis. *Reprod Sci.* 2015.
21. Nasioudis D, Beghini J, Bongiovanni AM, Giraldo PC, Linhares IM, Witkin SS: alpha-Amylase in Vaginal Fluid: Association With Conditions Favorable to Dominance of Lactobacillus. *Reprod Sci.* 2015.
22. Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L: Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Rev.* 2005;206:306-35.

23. Ledger WJ, Witkin SS: Vulvovaginal infections. Washington: ASM Press; 2007.
24. Witkin SS, Mendes-Soares H, Linhares IM, Jayaram A, Ledger WJ, Forney LJ: Influence of vaginal bacteria and D- and L-lactic acid isomers on vaginal extracellular matrix metalloproteinase inducer: implications for protection against upper genital tract infections. *MBio*. 2013;4(4).
25. Marieb EA, Zoltan-Jones A, Li R, Misra S, Ghatak S, Cao J, et al. Emmprin promotes anchorage-independent growth in human mammary carcinoma cells by stimulating hyaluronan production. *Cancer Res*. 2004;64(4):1229-32.
26. Linhares IM, Summers PR, Larsen B, Giraldo PC, Witkin SS: Contemporary perspectives on vaginal pH and lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;204(2):120 e1-5.
27. Lev-Sagie A, Nyirjesy P, Tarangelo N, Bongiovanni AM, Bayer C, Linhares IM, et al. Hyaluronan in vaginal secretions: association with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;201(2):206 e1-5.
28. Eade CR, Diaz C, Wood MP, Anastos K, Patterson BK, Gupta P, et al. Identification and characterization of bacterial vaginosis-associated pathogens using a comprehensive cervical-vaginal epithelial coculture assay. *PLoS One*. 2012;7(11):e50106.
29. Cobo ER, Chadee K: Antimicrobial Human beta-Defensins in the Colon and Their Role in Infectious and Non-Infectious Diseases. *Pathogens*. 2013;2(1):177-92.

30. Wang W, Di W, Liao QP, Liu ZH, Zhang N, Zhang HY, et al. [Study on vaginal production of human defensins and the correlated pathogenetic factors of vulvovaginal candidiasis]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*. 2008;43(7):486-9.
31. Landro L, Damas JK, Flo TH, Heggelund L, Ueland T, Tjonnfjord GE, et al. Decreased serum lipocalin-2 levels in human immunodeficiency virus-infected patients: increase during highly active anti-retroviral therapy. *Clin Exp Immunol*. 2008;152(1):57-63.
32. Decavele AS, Dhondt L, De Buyzere ML, Delanghe JR: Increased urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin in urinary tract infections and leukocyturia. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49(6):999-1003.
33. Lippi G, Avanzini P, Calzetti C, Caleffi A, Pipitone S, Musa R, et al. The role of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in cerebrospinal fluids for screening of acute bacterial meningitis. *Clin Lab*. 2014;60(3):377-81.
34. Nenadic DB, Pavlovic MD: Cervical fluid cytokines in pregnant women: Relation to vaginal wet mount findings and polymorphonuclear leukocyte counts. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008;140(2):165-70.

Table 1. Demographic characteristics of women by vaginal inflammation intensity

	No Inflammation (n= 141)	Moderate Inflammation (n= 73)	Intense Inflammation (n= 14)	p value
Age (X±SD)	31 (8.6)	28 (8.0)	29 (7.1)	0.0716 ^a
White race (%)	65.5	68.5	78,6	0.5718 ^b
Years of education (SD)	9.2 (3.6)	10.3 (3.9)	9.8 (4.4)	0.0880 ^a
Pregnancy (%)				0.0794 ^b
Never pregnant	39.6	56.2	35.7	
≥1 pregnancy	60.4	43.8	64.3	
Contraception (%)				0.5477 ^c
Hormonal	50.4	64.4	57.1	
Condom	14.4	12.3	14.3	
IUD	3.6	1.4	0	
Other/none	31.6	21.9	28.6	
Sex Partners - last 6 months (%)				0.9647 ^c
0	5,8	6,8	7.1	
1	86.3	85.0	85.8	
>1	7.9	8.2	7.1	
Average sex/month (SD)	8.4 (6.0)	8.5 (7.2)	5.9 (4.9)	0.3940 ^a
Smoking (%)	18.0	13.7	28.7	0.3764 ^b

^a Kruskal-Wallis test^b Chi-squared test^c Fisher's exact test

Table 2. Median concentrations of vaginal immune mediators by vaginal inflammation intensity

n=228	No Inflammation (n= 141)	Moderate Inflammation (n= 73)	Intense Inflammation (n= 14)	p value
EMMPRIN (ng/ml)	2.23 (0.23 – 7.80)	3.05 (0.51 – 11.91)	4.67 (2.12 – 6.54)	<0.0001 ^a
MMP-8 (ng/ml)	5.59 (0.02 – 61.41)	17.30 (0.11 – 5.53)	36.15 (1.82 – 6.55)	<0.0001 ^b
Hyaluronan (ng/ml)	1.34 (0.0 – 137.83)	4.13 (0.0 – 106.16)	6.81 (0.0 – 38.68)	0.0016 ^c
Hyaluronidase (pg/ml)	34.46 (0.0 – 245.83)	30.54 (0.0 – 312.82)	53.37 (0.0 – 126.81)	0.3065
NGAL (ng/ml)	456 (45 – 1230)	596 (142 – 2093)	780 (455 – 2920)	<0.0001 ^d
β Defensin (ng/ml)	1.39 (0.11 – 63.62)	2.65 (0.23 – 62.19)	11.74 (0.88 – 59.11)	<0.0001 ^e

Analysis was by Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney test

^a p=0.006 No vs. Moderate; p<0.0001 No vs. Intense; p=0.0059 Moderate vs. Intense

^b p<0.0001 No vs. Moderate, No vs. Intense; p=0.0038 Moderate vs. Intense

^c p=0.0019 No vs. Moderate; p=0.0023 No vs. Intense

^d p=0.0002 No vs. Moderate; p<0.0001 No vs. Intense; p=0.0182 Moderate vs. Intense

^e p=0.0006 No vs. Intense; p=0.0193 Moderate vs. Intense

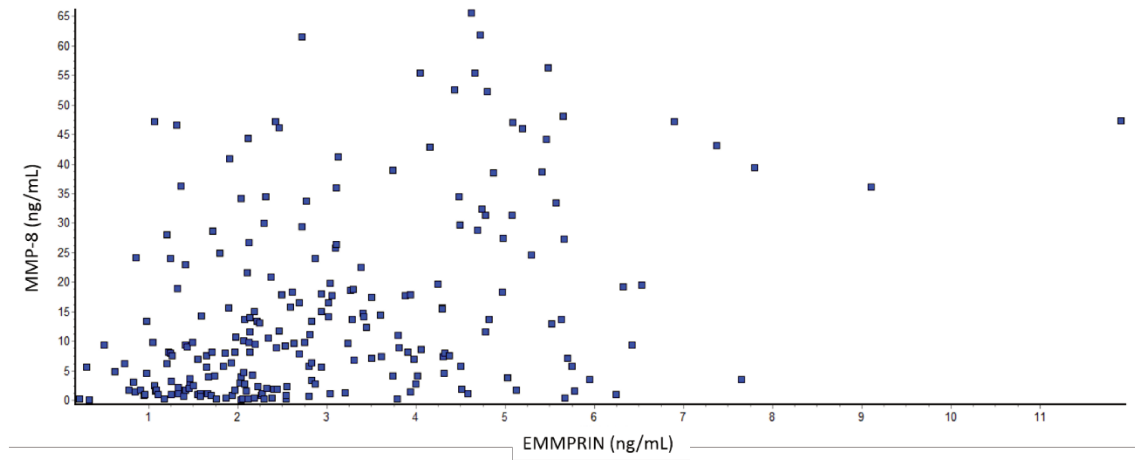


Figure 1. Correlation between extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) levels in vaginal fluid from women with and without vaginal inflammation. Spearman's $r = 0.3997$, $p < 0.0001$. EMMPRIN and MMP-8 concentrations were assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

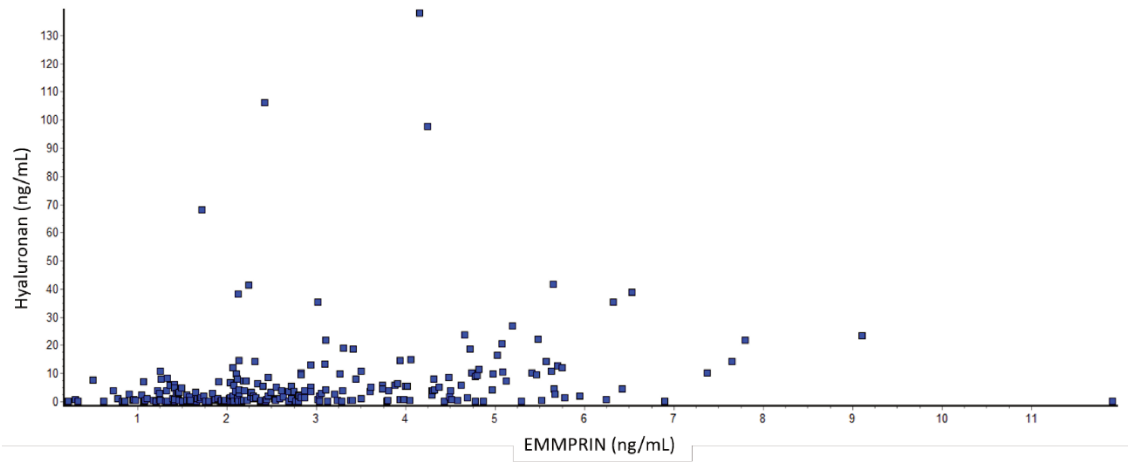


Figure 2. Correlation between extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and hyaluronan levels in vaginal fluid from women with and without vaginal inflammation. Spearman's $r = 0.3928$, $p < 0.0001$. EMMPRIN and hyaluronan concentrations were assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

5. DISCUSSÃO

A observação de diferentes concentrações dos mediadores imunes no fluido vaginal de mulheres com desordens vaginais e as correlações entre estas substâncias parecem estar abrindo um leque de possibilidades para entender a fisiopatologia destas doenças e traçar novos meios de prevenir e tratar estes problemas. Além disso, a avaliação destes mediadores considerando a resposta inflamatória vaginal também se faz importante para esclarecer os mecanismos de defesa da mucosa vaginal.

Já é vastamente conhecido que, no período reprodutivo, a colonização vaginal por lactobacilos está associada a diversos fatores responsáveis pela manutenção de um ambiente vaginal saudável. A produção de ácido láctico, de substâncias antimicrobianas e a indução de uma resposta imune adequada na presença de micro-organismos inconvenientes, são algumas das ações benéficas dos lactobacilos. Desta forma, protegem o organismo contra infecções por germes oportunistas e DSTs incluindo o HIV. Também não é novidade que o ácido láctico possui um papel fundamental na acidificação vaginal auxiliando nestes mecanismos de defesa, contudo, ainda não é de conhecimento geral, que o isômero L do ácido láctico atua como um mediador da resposta imunológica (9, 38, 55).

O presente estudo observou que, na VB, os níveis de AcL-L e AcL-D encontrados no fluido vaginal foram muito menores do que nos demais grupos (Tabela 2 – Artigo 1). Nestes grupos (controle, CVV e VC), a microbiota costuma

ser dominada por lactobacilos, bactérias produtoras de ácido láctico, fato que justifica os níveis mais altos encontrados nestas mulheres. A VB, é uma condição polimicrobiana caracterizada pela depleção de lactobacilos e proliferação de outras bactérias anaeróbicas (12). A maioria das bactérias encontradas em mulheres com VB, não são produtoras de ácido láctico. O *Atopobium vaginae* é uma exceção (71) e, o *Lactobacillus iners*, um produtor de AcL-L, já foi isolado da vagina de mulheres com VB (38, 69). Além disso, a célula epitelial vaginal também produz pequenas concentrações de AcL-L (70, 72). A presença de algumas bactérias produtoras de ácido láctico na flora vaginal de mulheres com VB e a produção pelas células epiteliais explicam as pequenas concentrações de ácido láctico encontradas neste grupo. Acredita-se que os baixos níveis de ácido láctico na VB estão entre os fatores responsáveis pela maior susceptibilidade destas mulheres a outras infecções, uma vez que o AcL-L possui importantes funções imunes. Destaca-se sua atividade antimicrobiana e a indução de uma melhor resposta imune pró-inflamatória na presença de um agente patogênico (56-59).

Sabe-se que o AcL-L altera a produção de EMMPRIN e MCT na membrana celular com o intuito de permitir o transporte de AcL-L através da membrana. O fluxo de AcL-L ocorre através do MCT, que utiliza o EMMPRIN como cofator. Por sua vez, o EMMPRIN estimula a produção de MMP-8, uma collagenase que degrada MEC (75). Já foi evidenciado que o AcL-D regula as concentrações de EMMPRIN na célula epitelial, uma vez que é capaz de bloquear os receptores de MCT (75, 84). No ambiente vaginal, um estudo identificou que o *Lactobacillus crispatus* possui 2 cópias do gene LDH-L e 1 cópia de LDH-D e, portanto, as proporções ideais de

ácido láctico L/D produzidas por este lactobacilo, regulariam os níveis de EMMPRIN e MMP-8 (69).

No nosso estudo, observamos uma associação entre o AcL-L, EMMPRIN, MMP-8 e também entre a razão de AcL L/D com EMMPRIN e MMP-8 na cavidade vaginal de mulheres sem infecção vaginal com flora constituída predominantemente por lactobacilos. Por outro lado, notou-se que, o AcL-D não se correlacionou com EMMPRIN e MMP-8 neste grupo de mulheres (Tabela 3 – Artigo 1). Isto faz sentido, uma vez que o AcL-D não é transportado pelo MCT. Estes achados são concordantes com a literatura que descreveu as mesmas correlações em mulheres assintomáticas (69). Portanto, os dados do presente estudo reforçam o conceito (69) de que, na cavidade vaginal o AcL-L induz EMMPRIN e consequentemente MMP-8. E que, em mulheres com predomínio de lactobacilos na flora vaginal, a proporção ideal entre AcL-L e AcL-D, controla a produção excessiva de EMMPRIN e consequentemente evita a degradação da MEC pela MMP-8.

As dosagens de EMMPRIN e MMP-8 foram maiores nas pacientes diagnosticadas com CVV (Tabela 2 – Artigo 1). O EMMPRIN possui função chave na inflamação e resposta imune estimulando a produção de MMPs (77). A MMP-8 é uma proteinase responsável pela degradação de MEC e, é produzida principalmente pelos neutrófilos (80). Uma vez que a CVV é uma condição que cursa frequentemente com inflamação e intensa migração de polimorfonucleares neutrófilos, justificam-se os achados de maiores concentrações de EMMPRIN e MMP-8 na CVV deste estudo (Tabela 2 – Artigo 1). Estes dados foram confirmados ao se dividir a amostra total deste estudo, que envolveu pacientes com diversos diagnósticos, e observar que os níveis de EMMPRIN e MMP-8 aumentaram de

acordo com a intensidade do processo inflamatório, aferido pelo número de leucócitos presentes no esfregaço vaginal (Tabela 2 – Artigo 3).

Os elevados níveis de MMP-8 na CVV, por induzirem uma resposta pró-inflamatória, podem aumentar a destruição tecidual, facilitar a penetração da cândida no epitélio vaginal e assim exacerbar os sintomas clínicos, fato que precisa ser mais bem estudado. Foi interessante notar que, na CVV, apesar de se observar uma correlação significativa entre os níveis de EMMPRIN e AcL-L, a associação entre EMMPRIN e a razão L/D não foi estatisticamente significativa (Tabela 3 – Artigo 1). Isto pode ser explicado pelos achados deste estudo de que a cândida é um indutor de EMMPRIN na célula epitelial e possivelmente aumentou as concentrações desta substância e consequentemente de MMP-8, o que pode ter colaborado para o processo inflamatório.

No grupo com VB, a diminuição de AcL-L, que possui propriedades imunológicas, pode contribuir para a proliferação das bactérias associadas à VB, assim como, para a diminuição da resposta imune local observada nestes casos. Estas alterações podem ser facilitadoras da manutenção da VB, e também, predispor infecções concomitantes por HPV, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria Gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginallis*, comumente associadas aos casos de VB. Não se observou correlação entre os níveis de EMMPRIN e MMP-8 na VB, fato que pode ser explicado pela ausência de infiltração leucocitária na vagina destas pacientes, uma vez que a MMP-8 é produzida por neutrófilos.

Notou-se uma maior concentração de AcL-L em pacientes com VC provavelmente devido ao excesso de lactobacilos, imperativo para o diagnóstico desta condição (Tabela 2 – Artigo 1). Os níveis de AcL-D não estavam elevados

(Tabela 2 – Artigo 1). O aumento do AcL-L poderia ser causado por alguma alteração do mecanismo celular, pois a célula produz AcL-L, ou pela presença de outras espécies de lactobacilos colonizando a vagina destas mulheres.

Sabe-se que o AcL-D compete com o AcL-L nas ligações do MCT, mecanismo que faz o transporte de AcL-L através da membrana celular (de dentro para fora e de fora para dentro da célula). O excesso de AcL-L dentro da célula pode levar a lise celular por acidose. Por outro lado, sua falta pode alterar o metabolismo celular que, na vagina, é estritamente anaeróbico, ou seja, dependente de ácido láctico (69, 70, 84). Observamos que, nas pacientes sem infecção genital e predomínio de uma flora lactobacilar, a razão L/D encontrada foi ideal para manter a homeostase vaginal. Acreditamos que, na VC, o aumento nas concentrações do AcL-L não acompanhados do AcL-D aumentaria o transporte de AcL-L para dentro da célula possivelmente causando citólise. É provável que o EMMPRIN não esteve aumentado em decorrência da lise celular observada nestes casos. A falta de correlação entre o EMMPRIN e MMP-8 (Tabela 3 – Artigo 1) pode ser justificada pela ausência de leucócitos na VC, como ocorre na VB.

A composição da microbiota vaginal está diretamente envolvida nas defesas do trato genital inferior visto que o ácido láctico influencia na produção de mediadores imunes pelas células do hospedeiro. O uso de cepas específicas de probióticos que mantenham as concentrações apropriadas de ácido láctico, ou mesmo, a introdução de dosagens adequadas dos isômeros na vagina poderiam ser avaliados. Além dos parâmetros clínicos para avaliação destes resultados, a dosagem dos mediadores envolvidos poderiam ser averiguadas.

Outra possibilidade futura é a utilização de bloqueadores de EMMPRIN. Esse bloqueio tem sido sugerido como um alvo atrativo no tratamento de doenças inflamatórias e surgem como um novo desafio neste campo (77). A possibilidade de uso tópico nos casos de CVV complicada com intenso infiltrado inflamatório, poderia auxiliar o tratamento aliviando os sintomas das pacientes que sofrem com as recorrências.

O presente estudo apresentou dados significativos de que, os níveis de NGAL são maiores no fluido vaginal de mulheres com CVV e menores na VB quando comparado ao grupo controle (Tabela 2 - Artigo 2).

Sabe-se que o estímulo de TLRs nas células epiteliais ativa a produção de NGAL por estas células e, além disso, estimula uma resposta pró-inflamatória com migração leucocitária, incluindo neutrófilos, que também sintetizam NGAL (100, 101). Uma vez que a resposta à *Candida sp* na cavidade vaginal inclui o estímulo de TLR 2 e 4 na superfície da célula epitelial desencadeando uma atividade pró-inflamatória com extravasamento de leucócitos para o local, justificam-se as altas concentrações de NGAL encontradas em pacientes com CVV. Como a NGAL é uma substância antimicrobiana, seu aumento na CVV pode ser um fator de proteção local que contribui para evitar a alteração da flora vaginal e infecções concomitantes nestas pacientes.

Nossos dados mostraram que os níveis de NGAL estavam fortemente correlacionados com os níveis de ácido láctico no fluido vaginal (Artigo 2). O AcL-L é um componente da resposta imune vaginal estimulando a via de linfócitos T IL-23/Th-17 (56, 59). Interessante observar que, esta via foi descrita como uma potente via estimuladora de NGAL (108). Estes dados sugerem que o ácido láctico, ou até

mesmo os lactobacilos, seriam indutores de NGAL no fluido vaginal. A depleção de lactobacilos com aumento do pH vaginal poderia ser o gatilho para diminuição dos níveis de NGAL e proliferação de outras bactérias causadoras de infecção, como é o caso da VB.

Sabe-se que a NGAL evita a utilização de ferro por bactérias Gram-negativas ligando-se a sideróforos bacterianos, o que dificulta sua proliferação (101). A maioria das espécies bacterianas que se proliferam na VB são em geral Gram-negativas, e entre elas a *Gardnerella vaginalis* é a mais prevalente. A presença de sideróforos já foi detectada em 8 cepas deste micro-organismo (107). Portanto, com a redução dos lactobacilos e consequente redução dos níveis de ácido láctico e NGAL, as bactérias associadas à VB teriam a chance de se multiplicar e causar doença.

Apesar de ser considerada uma infecção com graves consequências, a VB não desencadeia infiltração leucocitária na mucosa vaginal. Tem-se sugerido que isto se deve aos ácidos orgânicos produzidos pelas bactérias associadas à VB, o que inibiria a quimiotaxia dos leucócitos (30). Levando-se em conta que a NGAL também é produzida por neutrófilos, a ausência de migração leucocitária observada na VB seria mais um fator para os baixos níveis de NGAL observados nestas pacientes.

Considerando-se que na VB ocorre uma intensa ativação de TLR-4 pelos LPS bacterianos, isto deveria induzir a produção de NGAL pelas células epiteliais vaginais. Porém, nosso estudo não observou aumento nos níveis de NGAL na VB, pelo contrário, os níveis foram mais baixos que nos controles (Tabela 2 - Artigo 2). Uma vez que os níveis de NGAL foram associados aos níveis de ácido láctico neste

estudo, acreditamos que a produção de NGAL pela célula epitelial vaginal seja dependente de ácido láctico, substância escassa na VB.

Alguns estudos já relataram que as concentrações de NGAL são diretamente relacionadas ao número de células brancas em amostras de fluidos corpóreos como sangue, urina e liquor (104-106), o que faz sentido porque os neutrófilos são produtores de NGAL. No presente estudo, observou-se que, os níveis de NGAL variaram, em concordância, com os níveis de leucócitos encontrados em cada doença (Tabela 2 Artigo 3). Já se sabe que, na VB, é comum haver ausência de infiltrado leucocitário na mucosa. Nestas pacientes, os níveis de NGAL encontrados foram baixos. Na CVV, é habitual a presença de leucócitos e os níveis de NGAL foram mais altos (Tabela 2 - Artigo 2).

Portanto, na VB, os baixos níveis de NGAL, podem estar relacionados ao desenvolvimento e persistência desta condição. O mecanismo por nós aventado, seria que a depleção dos lactobacilos e consequente redução do ácido láctico levaria a redução na produção de NGAL que por sua vez permitiria a instalação da VB. Apesar das bactérias associadas à VB induzirem TLR-4, que induziria a célula epitelial a produzir NGAL, é possível que, na ausência de ácido láctico não haja produção de NGAL. A ausência de neutrófilos acabaria por contribuir ainda mais com a redução dos níveis desta substância. Todos estes fatores podem colaborar para a maior frequência de infecções associadas à VB. No ambiente vaginal saudável, ou seja, com flora predominantemente lactobacilar e ausência de processo inflamatório, acreditamos que a presença de ácido láctico seja importante para induzir a célula epitelial a produzir concentrações basais de NGAL no epitélio, o que auxiliaria nos mecanismos de proteção do ecossistema vaginal.

Seria interessante, investigar se os níveis elevados de NGAL na CVV contribuiriam para manutenção de uma flora predominantemente lactobacilar na grande maioria destas mulheres, uma vez que NGAL limita o crescimento de bactérias sideróforo-dependentes, como é o caso da *Gardnerella vaginalis* na cavidade vaginal (107, 109). Seria conveniente averiguar também se a reposição de NGAL recombinante poderia prevenir ou reduzir as taxas de VB recorrente e suas consequências.

Como mencionado anteriormente, os ligantes bacterianos e fúngicos ativam TLR-2 e/ou TLR-4 na superfície das células epiteliais e conduzem a uma série de eventos que culminam com a infiltração de leucócitos e liberação de peptídeos antimicrobianos, entre eles, hBD2 (32, 97). A hBD2 se liga ao potencial negativo da membrana microbiana causando sua morte e estimulando mais quimiotaxia leucocitária (95). Esta via, reforça os achados deste estudo de que a hBD2 aumenta de acordo com o grau de inflamação no esfregaço vaginal (Tabela 2 - Artigo 3). Alguns estudos observaram níveis mais elevados de hBD2 em pacientes com CVV, um distúrbio comum que apresenta infiltração de leucócitos na mucosa vaginal (96, 110). Acreditamos que o aumento da hBD2 na CVV seria mais um fator colaborador para evitar o desenvolvimento de outras infecções associadas à candidíase.

HA é o principal componente da MEC. A sua organização forma uma estrutura reticular que associada ao seu alto poder de hidratação fornece suporte bioquímico para as células vizinhas e impede a disseminação de agentes infecciosos (85, 86, 90). HA e suas proteínas de ligação regulam a expressão de genes, liberação de citocinas e recrutamento de células imunes com ação pró-inflamatória. Também podem atenuar o curso de inflamação, proporcionando

proteção contra danos teciduais. Estas funções são dependentes do peso molecular da HA. Na presença de qualquer estímulo inflamatório, a HA é quebrada em pequenos fragmentos que têm efeitos pró-inflamatórios. LMW-HA interage com TLR-2 e TLR-4 e ativa a via NF- κ B liberando mediadores imunes pró-inflamatórios como o TNF- α , IL-1 β e MMPs (85, 90).

Os resultados deste estudo mostraram que os níveis de HA foram maiores em amostras de mulheres com inflamação no esfregaço vaginal em comparação com as mulheres sem inflamação (Tabela 2 – Artigo 3). Outros trabalhos já revelaram que as concentrações de HA são maiores em amostras vaginais de pacientes com CVV, que comumente apresentam inflamação vaginal, e que, também esteve associada aos sintomas inflamatórios (91, 110). Estes dados reforçam o papel da HA na inflamação vaginal. Do ponto de vista clínico, resta saber se a utilização de inibidores de hialuronidase, que impediriam a degradação da HMW-HA (anti-inflamatória) em LMW-HA (pró-inflamatória), poderiam reduzir os sinais e sintomas inflamatórios na CVV.

A HA foi pouco estudada no ambiente vaginal. Estudos em câncer mostraram que o EMMPRIN é um indutor de HA em células tumorais (88). A HA é sintetizada a partir do metabolismo da glicose (90), assim como o ácido láctico (73). Considerando-se que as células epiteliais vaginais são ricas em glicogênio, principal forma de armazenamento de glicose (73), decidimos avaliar se a HA correlacionava-se com o EMMPRIN no fluido vaginal. O presente estudo demonstrou que os níveis EMMPRIN aumentaram proporcionalmente aos níveis de HA em toda a amostra (Figura 2 – Artigo 3). Visto que, EMMPRIN é um indutor de HA em outros *sites*,

estes dados levam à hipótese de que EMMPRIN também é um indutor de HA nas células do epitélio vaginal.

No ambiente vaginal, o EMMPRIN parece induzir a produção de HA, principal componente da MEC (Figura 2 – Artigo 3), e de MMP-8, enzima que degrada MEC (Figura 1 – Artigo 3), o que sugere que o EMMPRIN seja uma importante molécula na remodelação da MEC neste meio. Este controle parece ser dependente de ácido láctico, visto que no presente estudo observou-se que o AcL-L se correlacionou com EMMPRIN (Tabela 3 – Artigo 1), MMP-8 e HA (dados não mostrado nos artigos da tese). Portanto, níveis fisiológicos destas substâncias protegeriam a MEC. Por outro lado, as menores concentrações de ácido láctico, a redução de HA e o aumento de MMP-8 alterariam as funções de barreira e defesa da MEC. Os desequilíbrios destas substâncias deixariam a MEC mais susceptível podendo levar à infiltração de patógenos no epitélio intensificando o processo inflamatório em uma infecção vaginal ou, até mesmo, permitir a ascensão de bactérias através da cérvix para o trato genital superior causando infecções altas.

Já foi constatado que a depleção de HA no colo do útero e na vagina resulta em diferenciação inadequada de células epiteliais, aumento da permeabilidade epitelial e da mucosa, e aumento notável das taxas de parto prematuro (92). Algumas espécies de lactobacilos, além de produzir ácido láctico, também são capazes de produzir HA (87). Levando-se em conta a importância dos lactobacilos para a saúde vaginal e que podem produzir HA, molécula com importantes funções na MEC, isto indicaria mais um fator de proteção destes micro-organismos no ecossistema vaginal.

HA e EMMPRIN vem sendo muito estudados em estudos de câncer. Foi demonstrado que o CD44, receptor responsável pela produção da HA, e o EMMPRIN (CD147) são coligados com o MCT na superfície de membrana da célula cancerígena. Esta integração modula a localização do MCT na membrana da célula tumoral. Perturbações na interação HA-CD44 ou *down-regulation* do EMMPRIN desestabilizaria o MCT suprimindo o efluxo de ácido láctico levando a morte celular por acidose (89). Os estudos vêm tentando atuar sobre este mecanismo para controlar a doença. Sabendo-se que o ambiente vaginal também é dependente da via glicolítica anaeróbica assim como nos tumores, mais estudos sobre a inter-relação deste mecanismo no ambiente vaginal também poderiam ser promissores.

As concentrações de Hyal-1 não foram estatisticamente diferentes entre os grupos (Tabela 2 – Artigo 3). Os estudos mostram que a Hyal-2 e Hyal -3 são estimuladas por citocinas inflamatórias, ao passo que Hyal-1 não (93). Isto pode explicar os achados deste estudo.

Algumas VV têm sido associadas a resultados materno-fetais adversos e maior risco para aquisição de DST, inclusive HIV. Isto tem sido atribuído a alterações no ambiente vaginal como, depleção de lactobacilos e consequente aumento do pH e redução das substâncias antimicrobianas, transição para uma excessiva flora microbiana anormal e/ou presença de inflamação vaginal propriamente dita. Todos estes mecanismos envolvem a resposta imune da mucosa vaginal e, ainda foram pouco explorado mediante a sua importância. Os detalhes sobre a fisiopatologia das VV e os mecanismos de ativação ou inibição de resposta inflamatória em cada situação precisam ser mais bem estudados. Pesquisas envolvendo estes e outros mediadores de resposta imunológica podem auxiliar

nestes esclarecimentos. Elucidar o mecanismo de instalação e recorrência de cada doença poderá traçar novos rumos para o tratamento focando não somente no agente infeccioso, mas implementando a resposta imunológica, principalmente naquelas pacientes que sofrem com as recorrências.

Infelizmente, neste estudo, não foi realizada a avaliação concomitante do microbioma vaginal destas pacientes, o que permitiria uma avaliação direta da interferência de cada micro-organismo no estímulo ou inibição da produção das substâncias estudadas. Outra limitação da pesquisa foi o fato de ser um estudo corte transversal, o que nos permitiu fazer apenas associações, não sendo possível averiguar causa e efeito.

Como pontos fortes do estudo podemos destacar que as amostras vaginais foram todas coletadas pelo pesquisador principal que, também realizou as análises laboratoriais, o que minimizou as variações interpessoais. Além disso, esta linha de pesquisa é inovadora e, chama atenção para o estudo de outras substâncias, ainda não muito estudadas, na resposta imune do ambiente vaginal. Conforme demonstrado, o ácido láctico, EMMPRIN, MMP-8, HA, NGAL e hBD2 parecem ter um papel promissor na imunologia vaginal.

6. CONCLUSÕES

- Os níveis de ácidos lácticos D e L foram significativamente menores no grupo com vaginose bacteriana em comparação aos grupos com candidíase, vaginose citolítica e grupo controle.
- Os níveis de EMMPRIN e MMP-8 foram significativamente maiores no grupo candidíase em comparação aos grupos vaginose bacteriana, vaginose citolítica e grupo controle.
- Os níveis de EMMPRIN foram fortemente correlacionados ao ácido láctico L, à razão ácido láctico L/D e ao MMP-8 no grupo controle, mas não ao ácido láctico D.
- Os níveis de NGAL foram maiores na candidíase e menores na vaginose bacteriana em relação aos controles significativamente.
- Os níveis de ácido láctico-L se correlacionaram significativamente com NGAL no fluido vaginal.
- As concentrações vaginais de EMMPRIN, MMP-8, HA, NGAL e hBD2, exceto Hyal-1, foram significativamente maiores no grupo com inflamação comparado ao grupo sem inflamação vaginal, representado pelos leucócitos presentes no esfregaços vaginais.

7. REFERÊNCIAS

1. Tenkin O. Soranus'gynecology. Baltimore: Johns Hopkins Press, APUD Kent, HL. Epidemiology of vaginitis. Am J Obstet Gynecol. 1991;165:1168-76.
2. Duarte G, Landers DV. Vulvovaginites: aspectos epidemiológicos. J Bras Doenças Sexualm Transm. 1998;9:4-14.
3. Farage MA, Miller KW, Ledger WJ. Determining the cause of vulvovaginal symptoms. Obstet Gynecol Surv. 2008;63(7):445-64.
4. Hainer BL, Gibson MV. Vaginitis. Am Fam Physician. 2011;83(7):807-15.
5. Giraldo PC, Ribeiro Filho AD, Simões JA, Gomes FAM, Jarbas M. Vulvovaginites: aspectos habitualmente não considerados. J Bras Ginecol. 1997;107(4):89-93.
6. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. Lancet. 2007;369(9577):1961-71.
7. Ledger WJ, Monif GR. A growing concern: inability to diagnose vulvovaginal infections correctly. Obstet Gynecol. 2004;103(4):782-4.
8. Nyirjesy P. Vulvovaginal candidiasis and bacterial vaginosis. Infect Dis Clin North Am. 2008;22(4):637-52, vi.
9. Giraldo PC Gonçalves AKSG, Eleutério Jr J. Mecanismos de defesa da mucosa genital feminina. In: Peixoto S. Infecção genital na mulher. São Paulo: Roca; 2007. p. 37-41.

10. Witkin SS, Linhares I, Giraldo P, Jeremias J, Ledger WJ. Individual immunity and susceptibility to female genital tract infection. *Am J Obstet Gynecol*. 2000;183(1):252-6.
11. Spiegel CA, Davick P, Totten PA, Chen KC, Eschenbach DA, Amsel R, et al. *Gardnerella vaginalis* and anaerobic bacteria in the etiology of bacterial (nonspecific) vaginosis. *Scand J Infect Dis Suppl*. 1983;40:41-6.
12. Mirmonsef P, Krass L, Landay A, Spear GT. The role of bacterial vaginosis and trichomonas in HIV transmission across the female genital tract. *Curr HIV Res*. 2012;10(3):202-10.
13. Donders G. Diagnosis and management of bacterial vaginosis and other types of abnormal vaginal bacterial flora: a review. *Obstet Gynecol Surv*. 2010;65(7):462-73.
14. Marrazzo JM. Interpreting the epidemiology and natural history of bacterial vaginosis: are we still confused? *Anaerobe*. 2011;17(4):186-90.
15. Shoubnikova M, Hellberg D, Nilsson S, Mardh PA. Contraceptive use in women with bacterial vaginosis. *Contraception*. 1997;55(6):355-8.
16. Culhane JF, Rauh V, McCollum KF, Elo IT, Hogan V. Exposure to chronic stress and ethnic differences in rates of bacterial vaginosis among pregnant women. *Am J Obstet Gynecol*. 2002;187(5):1272-6.
17. Ness RB, Hillier S, Richter HE, Soper DE, Stamm C, Bass DC, et al. Can known risk factors explain racial differences in the occurrence of bacterial vaginosis? *J Natl Med Assoc*. 2003;95(3):201-12.

18. Smart S, Singal A, Mindel A. Social and sexual risk factors for bacterial vaginosis. *Sex Transm Infect.* 2004;80(1):58-62.
19. Schwebke JR, Desmond R. Risk factors for bacterial vaginosis in women at high risk for sexually transmitted diseases. *Sex Transm Dis.* 2005;32(11):654-8.
20. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med.* 1983;74(1):14-22.
21. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol.* 1991;29(2):297-301.
22. Giraldo PC, de Carvalho JB, do Amaral RL, da Silveira Goncalves AK, Eleuterio J, Jr., Guimaraes F. Identification of immune cells by flow cytometry in vaginal lavages from women with vulvovaginitis and normal microflora. *Am J Reprod Immunol.* 2012;67(3):198-205.
23. Mitchell C, Marrazzo J. Bacterial vaginosis and the cervicovaginal immune response. *Am J Reprod Immunol.* 2014;71(6):555-63.
24. Mirmonsef P, Zariffard MR, Gilbert D, Makinde H, Landay AL, Spear GT. Short-chain fatty acids induce pro-inflammatory cytokine production alone and in combination with toll-like receptor ligands. *Am J Reprod Immunol.* 2012;67(5):391-400.
25. Marconi C, Santos-Greatti MM, Parada CM, Pontes A, Pontes AG, Giraldo PC, et al. Cervicovaginal levels of proinflammatory cytokines are increased during chlamydial

infection in bacterial vaginosis but not in lactobacilli-dominated flora. J Low Genit Tract Dis. 2014;18(3):261-5.

26. Sadhu K, Domingue PA, Chow AW, Nelligan J, Cheng N, Costerton JW. *Gardnerella vaginalis* has a gram-positive cell-wall ultrastructure and lacks classical cell-wall lipopolysaccharide. J Med Microbiol. 1989;29(3):229-35.

27. Valore EV, Wiley DJ, Ganz T. Reversible deficiency of antimicrobial polypeptides in bacterial vaginosis. Infect Immun. 2006;74(10):5693-702.

28. Cauci S, Guaschino S, De Aloysio D, Driussi S, De Santo D, Penacchioni P, et al. Interrelationships of interleukin-8 with interleukin-1beta and neutrophils in vaginal fluid of healthy and bacterial vaginosis positive women. Mol Hum Reprod. 2003;9(1):53-8.

29. Mitchell CM, Balkus J, Agnew KJ, Cohn S, Luque A, Lawler R, et al. Bacterial vaginosis, not HIV, is primarily responsible for increased vaginal concentrations of proinflammatory cytokines. AIDS Res Hum Retroviruses. 2008;24(5):667-71.

30. Al-Mushrif S, Eley A, Jones BM. Inhibition of chemotaxis by organic acids from anaerobes may prevent a purulent response in bacterial vaginosis. J Med Microbiol. 2000;49(11):1023-30.

31. Draper DL, Landers DV, Krohn MA, Hillier SL, Wiesenfeld HC, Heine RP. Levels of vaginal secretory leukocyte protease inhibitor are decreased in women with lower reproductive tract infections. Am J Obstet Gynecol. 2000;183(5):1243-8.

32. Pivarcsi A, Nagy I, Koreck A, Kis K, Kenderessy-Szabo A, Szell M, et al. Microbial compounds induce the expression of pro-inflammatory cytokines, chemokines and human beta-defensin-2 in vaginal epithelial cells. *Microbes Infect.* 2005;7(9-10):1117-27.
33. Nikolaitchouk N, Andersch B, Falsen E, Strombeck L, Mattsby-Baltzer I. The lower genital tract microbiota in relation to cytokine-, SLPI- and endotoxin levels: application of checkerboard DNA-DNA hybridization (CDH). *APMIS.* 2008;116(4):263-77.
34. Stock SJ, Duthie L, Tremaine T, Calder AA, Kelly RW, Riley SC. Elafin (SKALP/Trappin-2/proteinase inhibitor-3) is produced by the cervix in pregnancy and cervicovaginal levels are diminished in bacterial vaginosis. *Reprod Sci.* 2009;16(12):1125-34.
35. Balkus J, Agnew K, Lawler R, Mitchell C, Hitti J. Effects of pregnancy and bacterial vaginosis on proinflammatory cytokine and secretory leukocyte protease inhibitor concentrations in vaginal secretions. *J Pregnancy.* 2010;2010:385981.
36. Rizzo A, Losacco A, Carratelli CR. *Lactobacillus crispatus* modulates epithelial cell defense against *Candida albicans* through Toll-like receptors 2 and 4, interleukin 8 and human beta-defensins 2 and 3. *Immunol Lett.* 2013;156(1-2):102-9.
37. Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108 Suppl 1:4680-7.

38. Petrova MI, Lievens E, Malik S, Imholz N, Lebeer S. Lactobacillus species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. *Front Physiol.* 2015;6:81.
39. Giraldo PC, Babula O, Goncalves AK, Linhares IM, Amaral RL, Ledger WJ, et al. Mannose-binding lectin gene polymorphism, vulvovaginal candidiasis, and bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol.* 2007;109(5):1123-8.
40. Genc MR, Vardhana S, Delaney ML, Onderdonk A, Tuomala R, Norwitz E, et al. Relationship between a toll-like receptor-4 gene polymorphism, bacterial vaginosis-related flora and vaginal cytokine responses in pregnant women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2004;116(2):152-6.
41. Mendling W, Brasch J, German Society for G, Obstetrics, Working Group for I, Infectimmunology in G, et al. Guideline vulvovaginal candidosis (2010) of the German Society for Gynecology and Obstetrics, the Working Group for Infections and Infectimmunology in Gynecology and Obstetrics, the German Society of Dermatology, the Board of German Dermatologists and the German Speaking Mycological Society. *Mycoses.* 2012;55 Suppl 3:1-13.
42. Barousse MM, Steele C, Dunlap K, Espinosa T, Boikov D, Sobel JD, et al. Growth inhibition of *Candida albicans* by human vaginal epithelial cells. *J Infect Dis.* 2001;184(11):1489-93.
43. Fidel PL, Jr. History and update on host defense against vaginal candidiasis. *Am J Reprod Immunol.* 2007;57(1):2-12.

44. Peters BM, Yano J, Noverr MC, Fidel PL, Jr. Candida vaginitis: when opportunism knocks, the host responds. *PLoS Pathog.* 2014;10(4):e1003965.
45. Jaeger M, Plantinga TS, Joosten LA, Kullberg BJ, Netea MG. Genetic basis for recurrent vulvo-vaginal candidiasis. *Curr Infect Dis Rep.* 2013;15(2):136-42.
46. van de Wijgert JH, Morrison CS, Cornelisse PG, Munjoma M, Moncada J, Awio P, et al. Bacterial vaginosis and vaginal yeast, but not vaginal cleansing, increase HIV-1 acquisition in African women. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2008;48(2):203-10.
47. Sangkomkarn US, Lumbiganon P, Prasertcharoensuk W, Laopaiboon M. Antenatal lower genital tract infection screening and treatment programs for preventing preterm delivery. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;2:CD006178.
48. Cibley LJ, Cibley LJ. Cytolytic vaginosis. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;165(4 Pt 2):1245-9.
49. Suresh A, Rajesh A, Bhat RM, Rai Y. Cytolytic vaginosis: A review. *Indian J Sex Transm Dis.* 2009;30(1):48-50.
50. Cerikcioglu N, Beksac MS. Cytolytic vaginosis: misdiagnosed as candidal vaginitis. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2004;12(1):13-6.
51. Donders G, Bellen G, Rezeberga D. Aerobic vaginitis in pregnancy. *BJOG.* 2011;118(10):1163-70.
52. Workowski KA, Berman S, Centers for Disease C, Prevention. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. *MMWR Recomm Rep.* 2010;59(RR-12):1-110.

53. Ghosh M. Secreted mucosal antimicrobials in the female reproductive tract that are important to consider for HIV prevention. *Am J Reprod Immunol.* 2014;71(6):575-88.
54. Mirmonsef P, Spear GT. The barrier to HIV transmission provided by genital tract *Lactobacillus* colonization. *Am J Reprod Immunol.* 2014;71(6):531-6.
55. Witkin SS, Ledger WJ. Complexities of the uniquely human vagina. *Sci Transl Med.* 2012;4(132):132fs11.
56. Shime H, Yabu M, Akazawa T, Kodama K, Matsumoto M, Seya T, et al. Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23/IL-17 proinflammatory pathway. *J Immunol.* 2008;180(11):7175-83.
57. O'Hanlon DE, Moench TR, Cone RA. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. *BMC Infect Dis.* 2011;11:200.
58. Mossop H, Linhares IM, Bongiovanni AM, Ledger WJ, Witkin SS. Influence of lactic acid on endogenous and viral RNA-induced immune mediator production by vaginal epithelial cells. *Obstet Gynecol.* 2011;118(4):840-6.
59. Witkin SS, Alvi S, Bongiovanni AM, Linhares IM, Ledger WJ. Lactic acid stimulates interleukin-23 production by peripheral blood mononuclear cells exposed to bacterial lipopolysaccharide. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2011;61(2):153-8.
60. Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Rev.* 2005;206:306-35.

61. Ledger WJ, Witkin SS. Vaginal immunity. In: Ledger WJ, Witkin SS. Vulvovaginal infections. Washington: ASM Press; 2007. p.12-5.
62. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(6):427-39.
63. Ganz T. Defensins and host defense. *Science*. 1999;286(5439):420-1.
64. Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science*. 1999;286(5439):525-8.
65. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(7):499-511.
66. Abbas A, Lichtman AH, Pober JS. *Imunologia celular e molecular*. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda; 2005. p.283-354.
67. LeBlanc DM, Barousse MM, Fidel PL, Jr. Role for dendritic cells in immunoregulation during experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun*. 2006;74(6):3213-21.
68. Weinstein L BM, Howard JH, Finkelstone BB. A survey of the vaginal flora at various ages with special reference to the Doderlein bacillus. *Am J Obstet Gynecol*. 1936;32:211-8.
69. Witkin SS, Mendes-Soares H, Linhares IM, Jayaram A, Ledger WJ, Forney LJ. Influence of vaginal bacteria and D- and L-lactic acid isomers on vaginal extracellular

matrix metalloproteinase inducer: implications for protection against upper genital tract infections. *MBio*. 2013;4(4).

70. Boskey ER, Cone RA, Whaley KJ, Moench TR. Origins of vaginal acidity: high D/L lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. *Hum Reprod*. 2001;16(9):1809-13.

71. Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology*. 2004;150(Pt 8):2565-73.

72. Gorodeski GI, Hopfer U, Liu CC, Margles E. Estrogen acidifies vaginal pH by up-regulation of proton secretion via the apical membrane of vaginal-ectocervical epithelial cells. *Endocrinology*. 2005;146(2):816-24.

73. Linhares IM, Summers PR, Larsen B, Giraldo PC, Witkin SS. Contemporary perspectives on vaginal pH and lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol*. 2011;204(2):120 e1-5.

74. Ness RB, Kip KE, Hillier SL, Soper DE, Stamm CA, Sweet RL, et al. A cluster analysis of bacterial vaginosis-associated microflora and pelvic inflammatory disease. *Am J Epidemiol*. 2005;162(6):585-90.

75. Iacono KT, Brown AL, Greene MI, Saouaf SJ. CD147 immunoglobulin superfamily receptor function and role in pathology. *Exp Mol Pathol*. 2007;83(3):283-95.

76. Yang H, Zou W, Chen B. Overexpression of CD147 in ovarian cancer is initiated by the hypoxic microenvironment. *Cell Biol Int*. 2013;37(10):1139-42.

77. Zhu X, Song Z, Zhang S, Nanda A, Li G. CD147: a novel modulator of inflammatory and immune disorders. *Curr Med Chem*. 2014;21(19):2138-45.
78. Parks WC, Wilson CL, Lopez-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(8):617-29.
79. Elkington PT, O'Kane CM, Friedland JS. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clin Exp Immunol*. 2005;142(1):12-20.
80. Van Lint P, Libert C. Matrix metalloproteinase-8: cleavage can be decisive. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006;17(4):217-23.
81. Diaz-Cueto L, Cuica-Flores A, Ziga-Cordero F, Ayala-Mendez JA, Tena-Alavez G, Dominguez-Lopez P, et al. Vaginal matrix metalloproteinase levels in pregnant women with bacterial vaginosis. *J Soc Gynecol Investig*. 2006;13(6):430-4.
82. Diaz-Cueto L, Dominguez-Lopez P, Tena-Alavez G, Cuica-Flores A, Rosales-Ortiz S, Arechavaleta-Velasco F. Effect of clindamycin treatment on vaginal inflammatory markers in pregnant women with bacterial vaginosis and a positive fetal fibronectin test. *Int J Gynaecol Obstet*. 2009;107(2):143-6.
83. Rahkonen L, Rutanen EM, Unkila-Kallio L, Nuutila M, Nieminen P, Sorsa T, et al. Factors affecting matrix metalloproteinase-8 levels in the vaginal and cervical fluids in the first and second trimester of pregnancy. *Hum Reprod*. 2009;24(11):2693-702.
84. Ling B, Peng F, Alcorn J, Lohmann K, Bandy B, Zello GA. D-Lactate altered mitochondrial energy production in rat brain and heart but not liver. *Nutr Metab (Lond)*. 2012;9(1):6.

85. Vigetti D, Karousou E, Viola M, Deleonibus S, De Luca G, Passi A. Hyaluronan: biosynthesis and signaling. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1840(8):2452-9.
86. Romagnoli M, Belmontesi M. Hyaluronic acid-based fillers: theory and practice. *Clin Dermatol*. 2008;26(2):123-59.
87. Choi SB, Lew LC, Hor KC, Liong MT. Fe²⁺ and Cu²⁺ increase the production of hyaluronic acid by lactobacilli via affecting different stages of the pentose phosphate pathway. *Appl Biochem Biotechnol*. 2014;173(1):129-42.
88. Marieb EA, Zoltan-Jones A, Li R, Misra S, Ghatak S, Cao J, et al. Emmprin promotes anchorage-independent growth in human mammary carcinoma cells by stimulating hyaluronan production. *Cancer Res*. 2004;64(4):1229-32.
89. Slomiany MG, Grass GD, Robertson AD, Yang XY, Maria BL, Beeson C, et al. Hyaluronan, CD44, and emmprin regulate lactate efflux and membrane localization of monocarboxylate transporters in human breast carcinoma cells. *Cancer Res*. 2009;69(4):1293-301.
90. Petrey AC, de la Motte CA. Hyaluronan, a crucial regulator of inflammation. *Front Immunol*. 2014;5:101.
91. Lev-Sagie A, Nyirjesy P, Tarangelo N, Bongiovanni AM, Bayer C, Linhares IM, et al. Hyaluronan in vaginal secretions: association with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Am J Obstet Gynecol*. 2009;201(2):206 e1-5.

92. Akgul Y, Word RA, Ensign LM, Yamaguchi Y, Lydon J, Hanes J, et al. Hyaluronan in cervical epithelia protects against infection-mediated preterm birth. *J Clin Invest.* 2014;124(12):5481-9.
93. Girish KS, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci.* 2007;80(21):1921-43.
94. Dusio GF, Cardani D, Zanobbio L, Mantovani M, Luchini P, Battini L, et al. Stimulation of TLRs by LMW-HA induces self-defense mechanisms in vaginal epithelium. *Immunol Cell Biol.* 2011;89(5):630-9.
95. Cobo ER, Chadee K. Antimicrobial Human beta-Defensins in the Colon and Their Role in Infectious and Non-Infectious Diseases. *Pathogens.* 2013;2(1):177-92.
96. Wang W, Di W, Liao QP, Liu ZH, Zhang N, Zhang HY, et al. [Study on vaginal production of human defensins and the correlated pathogenetic factors of vulvovaginal candidiasis]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi.* 2008;43(7):486-9.
97. Eade CR, Diaz C, Wood MP, Anastos K, Patterson BK, Gupta P, et al. Identification and characterization of bacterial vaginosis-associated pathogens using a comprehensive cervical-vaginal epithelial coculture assay. *PLoS One.* 2012;7(11):e50106.
98. Chakraborty S, Kaur S, Guha S, Batra SK. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1826(1):129-69.

99. Nasioudis D, Witkin SS. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin and innate immune responses to bacterial infections. *Med Microbiol Immunol*. 2015. [Epub ahead of print].
100. Cowland JB, Sorensen OE, Sehested M, Borregaard N. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is up-regulated in human epithelial cells by IL-1 beta, but not by TNF-alpha. *J Immunol*. 2003;171(12):6630-9.
101. Flo TH, Smith KD, Sato S, Rodriguez DJ, Holmes MA, Strong RK, et al. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*. 2004;432(7019):917-21.
102. Antonucci E, Lippi G, Ticinesi A, Pigna F, Guida L, Morelli I, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): a promising biomarker for the early diagnosis of acute kidney injury (AKI). *Acta Biomed*. 2014;85(3):289-94.
103. Haase-Fielitz A, Haase M, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of acute kidney injury: a critical evaluation of current status. *Ann Clin Biochem*. 2014;51(Pt 3):335-51.
104. Landro L, Damas JK, Flo TH, Heggelund L, Ueland T, Tjonnfjord GE, et al. Decreased serum lipocalin-2 levels in human immunodeficiency virus-infected patients: increase during highly active anti-retroviral therapy. *Clin Exp Immunol*. 2008;152(1):57-63.

105. Decavele AS, Dhondt L, De Buyzere ML, Delanghe JR. Increased urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin in urinary tract infections and leukocyturia. Clin Chem Lab Med. 2011;49(6):999-1003.
106. Lippi G, Avanzini P, Calzetti C, Caleffi A, Pipitone S, Musa R, et al. The role of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in cerebrospinal fluids for screening of acute bacterial meningitis. Clin Lab. 2014;60(3):377-81.
107. Jarosik GP, Land CB, Duhon P, Chandler R, Jr., Mercer T. Acquisition of iron by *Gardnerella vaginalis*. Infect Immun. 1998;66(10):5041-7.
108. Ferreira MC, Whibley N, Mamo AJ, Siebenlist U, Chan YR, Gaffen SL. Interleukin-17-induced protein lipocalin 2 is dispensable for immunity to oral candidiasis. Infect Immun. 2014;82(3):1030-5.
109. Zhou X, Westman R, Hickey R, Hansmann MA, Kennedy C, Osborn TW, et al. Vaginal microbiota of women with frequent vulvovaginal candidiasis. Infect Immun. 2009;77(9):4130-5.
110. Nasioudis D, Beghini J, Bongiovanni AM, Giraldo PC, Linhares IM, Witkin SS. alpha-Amylase in Vaginal Fluid: Association With Conditions Favorable to Dominance of *Lactobacillus*. Reprod Sci. 2015. [Epub ahead of print].

8. ANEXOS

ANEXO 1.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) pós-informação

ANEXO 2.

Parecer Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (CEP/FCM/Unicamp)

ANEXO 3.

Instrumentos para coleta de dados

8.1 Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES VAGINAIS DOS ISÔMEROS DO ÁCIDO LÁTICO, INDUTOR DE METALOPROTEINASE (EMMPRIN) E METALOPROTEINASES (MMPs) DA MATRIZ EXTRACELULAR EM MULHERES COM E SEM INFECÇÕES GENITAIS

Este termo é um convite para sua participação na pesquisa que está sendo realizada no Ambulatório de Infecções Genitais do Departamento de Tocoginecologia FCM/UNICAMP, pela Dra. Joziani Beghini Junqueira C. Ferreira e Dr. Paulo César Giraldo.

Estamos estudando pacientes com problemas de infecções no órgão genital e queremos descobrir como algumas substâncias presentes na vagina das mulheres podem interferir na saúde vaginal desencadeando infecção. Com os resultados da pesquisa, esperamos colaborar com os estudos que determinam as diversas causas das infecções nos órgãos genitais e, talvez no futuro, conseguir novas maneiras de tratar esse tipo de problema da mulher, ajudando principalmente aquelas que têm infecções várias vezes no ano.

Caso você aceite participar deverá estar ciente que:

- 1- Responderá a um questionário com seus dados epidemiológicos e antecedentes ginecológicos e obstétricos, o que dura em torno de 5 a 10 minutos.
- 2- Será examinada pelos médicos responsáveis pelo estudo e, durante o exame ginecológico de rotina, será colhido também material vaginal para análise das substâncias a serem estudadas. A coleta deste material é indolor e rápida, não modificando o tempo médio do exame ginecológico rotineiro.
- 3- Todas as informações obtidas sobre você na pesquisa não serão identificadas com o seu nome. A identificação será realizada apenas por um número;
- 4- Parte do material vaginal coletado será enviado para um laboratório nos Estados Unidos da América para que seja feita a medida das substâncias que vamos estudar. Este procedimento é permitido pelas normas de pesquisa e não envolve o seu nome, apenas o seu número de pesquisa.
- 5- Todo o material coletado será descartado após o término da pesquisa.

6- Você tem o direito de se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem nenhum prejuízo para você.

7- Você deve estar ciente que, segundo a Resolução do Conselho Nacional de Saúde CNS 466/12, toda pesquisa envolvendo seres humanos envolve riscos, ainda que mínimos. Na presente pesquisa, não existem riscos previsíveis e diretamente ligados aos participantes. Os possíveis desconfortos estão relacionados ao exame ginecológico, procedimento necessário para sua avaliação durante a consulta. O exame especular pode causar um desconforto leve dependendo da sensibilidade individual de cada paciente.

8- Você tem o direito de receber resposta sobre qualquer dúvida que tenha sobre esta pesquisa. Qualquer dúvida que venha a surgir, você poderá entrar em contato, em horário comercial, de segunda à sexta-feira, com Dra. Joziani ou Dr. Paulo César pelo telefone (0xx19) 3521 9306.

9- Qualquer outra dúvida que você tenha, poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, nos mesmos horários e períodos acima descritos, pelo telefone (0xx19) 3521 8936.

10- Este termo consiste em duas vias que vão assinadas por você e pelo pesquisador responsável. Uma será retida com o pesquisador e outra entregue à você.

Campinas, ____/____/____

Nome da paciente: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Assinatura da paciente: _____

Nome do pesquisador _____

Assinatura do pesquisador: _____

8.2 Anexo 2 – Parecer Comitê de Ética (CEP/FCM/Unicamp)

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES VAGINAIS DOS ISÔMEROS DO ÁCIDO LÁTICO, INDUTOR DE METALOPROTEINASE (EMMPRIN) E METALOPROTEINASE 8 (MMP-8) DA MATRIZ EXTRACELULAR EM MULHERES COM E SEM INFECÇÕES GENITAIS

Pesquisador: Joziani Beghini Junqueira de Carvalho Ferreira

Área Temática: Área 8. Pesquisa com cooperação estrangeira.

Versão: 2

CAAE: 07297312.6.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 155.315

Data da Relatoria: 16/11/2012

Apresentação do Projeto:

O EMMPRIN (indutor de metaloproteinase da matriz extracelular), molécula importante na degradação da matriz extracelular, quando ativada pela enzima metaloproteinase 8 (MMP-8), pode facilitar a ascensão bacteriana para o trato genital superior. Acredita-se que o ácido láctico seja capaz de inibir a ação do EMMPRIN nas células epiteliais vaginais. O objetivo da pesquisa é avaliar a presença destes compostos no fluido vaginal de mulheres com e sem infecção para verificar se existe uma correlação.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar as concentrações vaginais de ácido láctico, EMMPRIN e MMP-8 em mulheres com e sem infecções genitais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Para a avaliação, além do exame ginecológico de rotina, haverá coleta de material para cultura e bacterioscopia (a ser realizada na UNICAMP) visando a confirmação da presença ou ausência de infecções e coleta de material para quantificação dos compostos citados (quantificação a ser realizada no exterior). As coletas serão feitas através de swab. Não se antevê riscos relacionados a este procedimento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de pesquisa de doutorado sanduíche, com cooperação internacional com a

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Weill Cornell Medical College, NY, onde serão realizadas as quantificações dos compostos por ELISA. Os exames bacterioscópicos e de cultura, para avaliação da presença ou não de infecção (e conseqüente alocação dos sujeitos de pesquisa nos respectivos grupos) serão realizados na UNICAMP, infere-se, como parte da rotina ambulatorial. O projeto encontra-se em fase de submissão da FAPESP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta TCLE o qual é adequado aos objetivos e procedimentos do projeto. Segundo o autor, "não consta assinatura do patrocinador oficial (FAPESP) na folha de rosto do projeto devido ao fato do mesmo estar em fase de submissão nesta instituição de fomento."

Na documentação encaminhada em 08/11/2012 consta uma declaração informando que o material enviado para o exterior será utilizado exclusivamente para a finalidade do projeto e que, qualquer outro uso deverá ser previamente autorizado através de novo projeto submetido ao sistema CEP/CONEP. Também foi incluída declaração de comprometimento da Instituição Estrangeira em cumprir as normas da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP e Resoluções 196/96 e 292/99 do CNS.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foram atendidas as pendências mencionadas no Parecer anterior.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

Considerações Finais a critério do CEP:

CAMPINAS, 27 de Novembro de 2012

Assinador por:
Carlos Eduardo Steiner
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
MÉDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES VAGINAIS DOS ISÔMEROS DO ÁCIDO LÁTICO, INDUTOR DE METALOPROTEINASE (EMMPRIN) E METALOPROTEINASE 8 (MMP-8) DA MATRIZ EXTRACELULAR EM MULHERES COM E SEM INFECÇÕES GENITAIS

Pesquisador: Joziani Beghini Junqueira de Carvalho Ferreira

Área Temática: Área 8. Pesquisa com cooperação estrangeira.

Versão: 6

CAAE: 07297312.6.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - CAISM

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 386.044

Data da Relatoria: 06/09/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de resposta a recomendações emitidas pela CONEP, cuja avaliação foi delegada a este CEP.

Objetivo da Pesquisa:

Trata-se de resposta a recomendações emitidas pela CONEP, cuja avaliação foi delegada a este CEP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Na presente pesquisa, não existem riscos previsíveis e diretamente ligados aos participantes. Os possíveis desconfortos estão relacionados ao exame ginecológico, procedimento necessário para sua avaliação durante a consulta. O exame especular pode causar um desconforto leve dependendo da sensibilidade individual de cada paciente.

Os benefícios da pesquisa serão acadêmicos e sociais, colaborando com os estudos que determinam as diversas causas das infecções nos órgãos genitais e gerar conhecimento para possíveis tratamentos, futuramente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Este projeto recebeu parecer de aprovação deste CEP e parecer de aprovação com recomendação

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 386.044

pela CONEP.

Esta apresentação compreende a resposta às recomendações emitidas pela CONEP, cuja avaliação foi delegada a este CEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os pesquisadores responderam às seguintes recomendações:

1. Solicitado alteração no cronograma de execução o início da coleta de dados- atendida.
2. Foi solicitado detalhamento dos gastos previstos para a pesquisa- pesquisadores anexaram planilha de orçamento detalhado, incluindo os custos operacionais - atendida.

3- TCLE:

- O consentimento deve ser solicitado em forma de convite, esclarecendo em linguagem acessível todos os procedimentos e garantias- TCLE foi reformulado- atendida.

- Redefinir riscos, desconfortos e benefícios da pesquisa- atendida.

- Informar que TCLE será assinado em duas vias...- atendida.

- Informar a destinação das amostras após realização dos procedimentos- amostras serão descartadas - atendida.

- esclarecer se as amostras serão descartadas depois de sua análise ou se constituirá biorrepositório- amostras serão descartadas- atendida.

Recomendações:

Todas as recomendações da CONEP foram atendidas pelos pesquisadores, conforme relatado no quadro acima.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado sem restrições e liberado para coleta de dados.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS
MEDICAS - UNICAMP
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 386.044

CAMPINAS, 05 de Setembro de 2013

Assinador por:
Fátima Aparecida Bottcher Luiz
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Página 03 de 03

8.3 Anexo 3 – Instrumento para coleta de dados

**DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES VAGINAIS DOS ISÔMEROS DO ÁCIDO LÁTICO,
INDUTOR DE METALOPROTEINASE (EMMPRIN) E METALOPROTEINASES (MMPs) DA
MATRIZ EXTRACELULAR EM MULHERES COM E SEM INFECÇÕES GENITAIS**

SUJEITO Nº: _____ **INICIAIS:** _____ **Data:** ____/____/____

1) IDENTIFICAÇÃO:

1.1- Qual sua data de nascimento? ____/____/____ **IDADE:** _____

1.2- Cor da pele: [1] Branca [2] Parda [3] Negra [4] Amarela [5] Outra

1.3- Nos últimos 6 meses você está:

[1] com parceiro fixo [2] com parceiro(s) eventual(ais) [3] sem parceiro

1.4- A sra estudou até qual série na escola? _____.

Isto corresponde a quantos anos completos de estudo? _____.

2) ANTECEDENTES:

2.1- Data do início da sua última menstruação: ____/____/____

2.2- Qual método para evitar gravidez a sra usou nos últimos seis meses?

_____ (Se pílula ou injeção, escrever qual o nome)

2.3- Quantas vezes a sra ficou grávida? _____

2.4- Quantos partos a sra teve? _____

2.5- Quantos abortos a sra teve? _____

2.6- Quantos parceiros sexuais a sra teve nos últimos 6 meses? _____

2.7- Quantas relações sexuais vaginais a sra tem por mês? _____

2.8- A sra é fumante? [1] Sim [2] Não

2.9- A sra está com corrimento? [1] Sim [2] Não [3] Não sabe

Se resposta não ou não sabe, passe para item 2.14

2.10- Esse corrimento tem cheiro forte? [1] Sim [2] Não

2.12- Tem coceira? [1] Sim [2] Não

2.13- Qual é a quantidade? [1] Pouca [2] Moderada [3] Grande

2.14- A sra tem ou teve algum tipo de verruga genital ou alteração no seu exame de Papanicolaou sugestivo de HPV confirmada por médico nos últimos 6 meses? [1] Sim [2] Não [3] Não sabe

**DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES VAGINAIS DOS ISÔMEROS DO ÁCIDO LÁTICO,
INDUTOR DE METALOPROTEINASE (EMMPRIN) E METALOPROTEINASES (MMPs) DA
MATRIZ EXTRACELULAR EM MULHERES COM E SEM INFECÇÕES GENITAIS**

SUJEITO Nº: _____ **INICIAIS:** _____ **Data:** ____/____/____

3) EXAME GINECOLÓGICO:

3.1- VULVA:	[1] Normal	[2] Alterada
Hiperemia:	[1] Presente	[2] Ausente
Fissuras:	[1] Presente	[2] Ausente
Verrugas vulgar:	[1] Presente	[2] Ausente

Condiloma genital: [1] Presente [2] Ausente

Outras: _____

3.2- VAGINA [1] Normal [2] Alterada

Hiperemia: [1] Presente [2] Ausente

Condiloma: [1] Presente [2] Ausente

Conteúdo vaginal: [1] Presente [2] Ausente

Quantidade: [1] Pequena [2] Moderada [3] Grande

Coloração: [1] Branco [2] Amarelo [3] Verde [4] Marrom [5] Transparente

Aspecto: [1] Homogêneo [2] Pastoso [3] Mucóide [4] Bolhoso [5] Grumoso

pH: _____ [1] $\leq 3,5$ [2] 3,5 a 4,5 [3] $>4,5$

Teste Whiff: [1] Negativo [2] Positivo

3.3- COLO UTERINO: [1] Normal [2] Alterado

Colpite: [1] Presente [2] Ausente

Ectrópio: [1] Presente [2] Ausente

Endocervicite: [1] Presente [2] Ausente

Condiloma: [1] Presente [2] Ausente

Outras: _____