

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

AMÍLCAR JARDIM MATOS

**ANÁLISE DA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS (BAL) VAGINAIS
EM RESPOSTA À PROGESTERONA E AO ESTRÓGENO EM OVELHAS PRÉ-
PÚBERES**

Uruguiana

2020

AMÍLCAR JARDIM MATOS

**ANÁLISE DA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁCTICAS (BAL) VAGINAIS
EM RESPOSTA À PROGESTERONA E AO ESTRÓGENO EM OVELHAS PRÉ-
PÚBERES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Fernando Silveira Mesquita

Coorientadora: Irina Lübeck

Uruguaiana

2020

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

M532a Matos, Amilcar Jardim

Análise da população de bactérias ácido-láticas (bal) vaginais em resposta à progesterona e ao estrógeno em ovelhas pré-púberes / Amilcar Jardim Matos.

67 p.

Dissertação (Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa, MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL, 2020.

"Orientação: Fernando Silveira Mesquita".

1. Antioxidante. 2. Benzoato de estradiol. 3. Espécies reativas ao oxigênio. 4. Lactobacillus. 5. Ovinos. I. Título.

AMÍLCAR JARDIM MATOS

**ANÁLISE DA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS (BAL)
VAGINAIS EM RESPOSTA À PROGESTERONA E AO ESTRÓGENO EM
OVELHAS PRÉ-PÚBERES**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação Stricto sensu em Ciência Animal da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

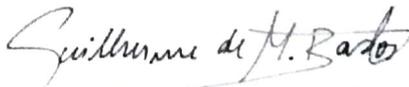
Área de concentração:
Reprodução e Produção Animal.

Dissertação defendida e aprovada em: 21 de agosto de 2020.

Banca examinadora:



Prof. Dr. Fernando Silveira Mesquita
Orientador
UNIPAMPA Uruguaiana



Prof. Dr. Guilherme de Medeiros Bastos
UNIPAMPA Uruguaiana



Dra. Anelise Afonso Martins
UNIPAMPA Dom Pedrito

Dedico este trabalho a minha família que, de uma forma ou de outra, me deu suporte para que conseguisse cumprir esta jornada.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por me dar fé nos momentos difíceis desta caminhada.

Agradeço, principalmente, a meus pais Nilton e Tereza Marlene, minha esposa Juliana e a meu filho Santiago, pela paciência nos dias longe de casa, pela compreensão nas horas difíceis, pelo amor a mim destinado. Agradeço também a meus irmãos Rosana, Suzana e Márcio por fazerem parte desse esteio forte que é a família.

Ao Prof. Dr. Fernando Mesquita, por acreditar no meu potencial e me dar oportunidade de me tornar mestre em Ciência Animal.

A Prof. Dr^a Irina Lübeck por me acolher no seu laboratório, onde a maior parte do trabalho foi realizada, não medindo esforços para que este lograsse sucesso. Pelos ensinamentos, orientações e, porque não, pelos mates tomados nas horas de folga.

Aos colegas que me ajudaram nas coletas e nas análises feitas durante o experimento, em especial Camila, Maria Eduarda, Andressa, Ariane, Lívia e Luísa. Sou muito grato a todos.

Aos Amigos que Uruguaiana me deu: Augusto, Alexandre, Matheus e Mauber. Jamais me esquecerei da acolhida nos seus lares, pela confiança, pelos vinhos tomados e pelas boias feitas.

Ao amigo Matheus Padilha, que foi meu braço direito, esquerdo e olhos no desenvolvimento do trabalho.

Enfim agradeço a todos que, de uma forma ou outra, se fizeram fundamentais nesta jornada. Não existem palavras para descrever a gratidão que sinto.

“Escolha um trabalho que ame e não precisará trabalhar um dia se quer na vida.”

Confúcio

RESUMO

A microbiota compreende os microrganismos que habitam um determinado compartimento de um organismo vivo e pode estar relacionada ao estado de saúde do hospedeiro. O ambiente vaginal, incluindo a microbiota local e o equilíbrio redox, parece estar sob a regulação das flutuações hormonais, em especial a dos esteroides ovarianos. Este trabalho teve por objetivo investigar o efeito da suplementação exógena com progesterona apenas ou progesterona seguida de benzoato de estradiol na população de bactérias ácido lácticas, espécies reativas ao oxigênio e potencial antioxidante no ambiente vaginal de ovelhas pré-púberes. Dez ovelhas pré-púberes foram aleatoriamente divididas para receber ou não progesterona (P4) de longa ação via injeção intramuscular no dia zero (D0), seguido de suplementação com benzoato de estradiol (BE) no D5 para todas as fêmeas. O grupo de fêmeas que receberam ambos, P4 e BE, foi denominado Grupo PE, enquanto o grupo de fêmeas que receberam apenas estradiol foi chamado de Grupo E. No D0, D2 e D7, amostras vaginais de todos os animais foram coletadas via suabe, colocadas em solução salina, diluídas 1:10, 10^{-3} e 10^{-5} e semeadas em ágar sangue, em triplicatas. Alternativamente, amostras em solução salina estéril foram diluídas 1:10 e 10^{-4} e semeadas em ágar MRS (De Man e Rogosa e Sharpe) pelo método *pour plate*, em triplicatas. Três meses depois, o mesmo experimento foi repetido nos mesmos animais para a coleta de lavado vaginal. No D0, D2 e D7 todos os animais foram coletados via lavado vaginal, por meio de infusão de 5 ml de solução salina estéril no fórnix vaginal, seguida de recuperação em tubo estéril, e armazenamento a -20°C . O lavado vaginal foi avaliado para a produção de ROS e potencial antioxidante. Os dados foram analisados por análise de variância de amostras repetidas no tempo, considerando os efeitos de tratamento (Grupos E e PE), dia (D0, D2, D7) e sua interação. Não foi detectado efeito de tratamento para nenhuma das variáveis analisadas. O dia, altamente influenciado pelo efeito do tratamento com BE no D5, induziu um aumento das UFCs de BAL e potencial antioxidante das células vaginais e a uma redução na produção de ROS pelas células e lavado vaginal. Observou-se também um enriquecimento de colônias de *lactobacillus* ao longo do tempo. Conclui-se que o estrógeno favorece o crescimento da população vaginal das bactérias ácido lácticas e o estabelecimento de um ambiente vaginal mais antioxidante que parece estar correlacionado a uma mudança qualitativa da microbiota vaginal favorecendo o estabelecimento de *lactobacillus*.

Palavras-Chave: antioxidante, benzoato de estradiol, espécies reativas ao oxigênio, *lactobacillus*, microbiota vaginal, ovinos.

ABSTRACT

The microbiota comprehends the microorganisms that inhabit a given body compartment of a live organism and may be related to the state of health of the host. The vaginal environment, including the local microbiota and the redox equilibrium, seems to be under the regulation of hormonal fluctuations, particularly that of ovarian steroids. This study aimed to investigate the effect of progesterone alone or progesterone followed by estradiol benzoate exogenous supplementation on the lactic acid population, reactive oxygen species production and antioxidant potential in the vaginal environment of prepubertal ewe lambs. Ten prepubertal ewe lambs were randomly divided to receive or not an intramuscular injection of a long-acting progesterone on day zero (D0), followed by an injection of estradiol benzoate (EB) on D5 to all ten females. The female group receiving both P4 and EB was called PE group, whereas the female group receiving only EB was called E group. On D0, D2 and D7 vaginal samples from all animals were collected by swab into a sterile saline solution, diluted 1:10, 10^{-3} e 10^{-5} and seeded on blood agar, in triplicates; alternatively, samples in saline were diluted 1:10 and 10^{-4} and seeded on MRS agar (De Man, Rogosa and Sharpe) by the pour plate method, in triplicates. Three months later, the experiment was repeated with the same animals aiming to collect vaginal washings. ON D0, D2 and D7 all the animals were sampled by infusing 5 ml of sterile saline in to the vagina fornix, followed by solution recovery into a sterile tube and storage at -20°C . Vaginal washings were assessed for ROS production and antioxidant potential. The data were analyzed by repeated measures analysis of variance, considering the effects of treatment (E and PE), day (D0, D2, D7) and their interaction. No effect of treatment was detected for the assessed variables. The effect of day, highly influenced by the EB treatment effect on D5, induced an increase on the CFU of vaginal BALs and antioxidant potential of vaginal cells, and a reduction of ROS production in vaginal cells and vaginal washings. An enrichment of *lactobacillus* colonies over time was also observed. In conclusion, estrogen favors the growth of vaginal lactic acid bacteria and the establishment of a more antioxidant vaginal environment, which seems to be related to the observed shift of the microbiota favoring the establishment of *lactobacillus*.

Keywords: antioxidante, estadiol benzoate, *lactobacillus*, reactive oxygen species, sheep, vaginal microbiota.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Conjunto de eventos a cada ciclo estral em ovelhas	20
Figura 2. Fatores que levam a puberdade em ovinos	21
Figura 3. Flutuação hormonal durante o ciclo estral em ovelhas.	22

CAPÍTULO 1

Figura 1. Metodologia utilizada. (Representação esquemática da manipulação hormonal e coleta de suabes vaginais, onde D0, D2 e D7 forma feitas as coletas e D0 administração injetável de P4 e D5 injeção de E2).....	35
Figura 2. Crescimento de bactérias em meio ágar sangue (microrganismos totais, aeróbicos e anaeróbicos facultativos) em resposta à progesterona apenas ou progesterona seguida de benzoato de estradiol. Unidades formadoras de colônia (CFU) transformadas por Log2 (média± erro padrão da média) no D-0, D2 e D7. N = 10.....	50
Figura 3. Crescimento de bactérias em meio ágar MRS (bactérias ácido lácticas; BAL) em resposta à progesterona apenas ou progesterona seguida de benzoato de estradiol. Unidades formadoras de colônia (CFU) transformadas por Log2 (média± erro padrão da média) no D-0, D2 e D7. N = 10. Letras maiúscula diferentes indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).....	51
Figura 4. Capacidade antioxidante redutora férrico das células do epitélio vaginal de ovelhas expostas à progesterona apenas ou a progesterona seguida de benzoato de estradiol. Micrograma equivalente de ácido ascórbico (média± erro padrão da média) no D-0, D2 e D7. N = 10. Letras maiúscula diferentes indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).....	52
Figura 5. Produção de ROS das células do epitélio vaginal de ovelhas expostas à progesterona apenas ou a progesterona seguida de benzoato de estradiol. Unidades arbitrarias de fluorescência (média± erro padrão da média) no D-0, D2 e D7. N = 10. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).....	53

Figura 6. Produção de ROS do lavado vaginal de ovelhas expostas à progesterona apenas ou a progesterona seguida de benzoato de estradiol. Unidades arbitrárias de fluorescência (média± erro padrão da média) no D-0, D2 e D7. N = 10. Letras maiúscula diferentes indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).....54

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Identificação presuntiva de colônias por coloração de Gram em meio ágar sangue. Colônias obtidas por cultivo em ágar sangue do dia D0 (estado basal), D2 (48 horas após a injeção de P4) e D7 (48 horas após a injeção de BE). OXIDASE e CATALASE:.....48
- Tabela 2. Identificação presuntiva de colônias por coloração de Gram em meio ágar MRS (BALs). Colônias obtidas por cultivo em ágar sangue do dia D0 (estado basal), D2 (48 horas após a injeção de P4) e D7 (48 horas após a injeção de BE). OXIDASE e CATALASE.....49
- Tabela 3. Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em meio ágar MRS (*Lactobacillus* spp.). Análise quantitativa comparando amostras do dia D-0 (120 horas antes de 1 mg de benzoato de estradiol - EB - injeção; D5), D2 (48 horas após a injeção de P4) e D750

LISTA DE ABREVIATURAS

BAL – Bactérias Ácido Lácticas

BE – Benzoato de estradiol

CAT – Catalase

CIDR® - Controlled Internal Drug Release

CL – Corpo Lúteo

E2 – Estrógeno

eCG – Gonadotrofina Coriônica equina

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FGA – Acetato de Fluorogestone

GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofina

GPx – Glutathione Peroxidase

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IM – Intramuscular

LH – Hormônio Luteinizante

MAP – Acetato Medroxiprogesterona

mL – Mililitro

O₂ – Oxigênio

P4 – Progesterona

pH – Potencial de Hidrogênio

RL – Radical Livre

RNS – Espécies Reativas de Nitrogênio

ROS – Reactive Oxygen Species

SIV – Vírus da imunodeficiência símia

SOD – Superóxido Dismutase

UFC – Unidade formadora de colônias

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 OVINOCULTURA.....	18
2.2 FISIOLOGIA DA REPRODUÇÃO	19
2.3 PUBERDADE	21
2.4 SUPLEMENTAÇÃO HORMONAL EXÓGENA	22
2.5 MICROBIOTA VAGINAL	24
2.6 RADICAIS LIVRES, ESPÉCIES REATIVAS E ENZIMAS ANTIOXIDANTES	25
2.7 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS E NÃO ENZIMÁTICOS.....	27
3 OBJETIVOS	29
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4 CAPÍTULO 1 – ARTIGO.....	30
4.1 RESUMO.....	31
4.2 ABSTRACT	32
4.3 INTRODUÇÃO	33
4.4 MATERIAL E MÉTODOS	35
4.4.1 EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL E COLETA DE AMOSTRAS:	35
4.4.2 ANÁLISE QUALITATIVA DA POPULAÇÃO VAGINAL DE BACTÉRIAS.....	35
4.4.3 COLETA DE SUABE VAGINAL	36
4.4.4 SEMEADURA DE SUABE VAGINAL	36
4.4.5 POTENCIAL OXIDATIVO E ANTIOXIDANTE DO AMBIENTE VAGINAL.....	37
4.4.6 LAVAGEM VAGINAL	38
4.4.7 ENSAIO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO).....	38
4.4.8 ENSAIO DE POTENCIAL ANTIOXIDANTE REDUTOR FÉRRICO (FRAP).....	39
4.4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4.5 RESULTADOS	39
4.6 DISCUSSÃO	40
4.7 CONCLUSÃO.....	43
4.8 REFERÊNCIAS.....	43
4.9 TABELAS.....	47
4.10 FIGURAS.....	50
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
6 REFERÊNCIAS.....	57

1. INTRODUÇÃO

Condições que levam à infertilidade ou subfertilidade representam um dos maiores entraves à atividade pecuária; portanto, conhecer os possíveis processos e condições fisiológicas que potencialmente interferem na capacidade reprodutiva dos animais domésticos se faz necessário para que estratégias sejam desenvolvidas visando à produção de alimentos de forma constante, sustentável e dentro dos preceitos sanitários. A caracterização dos microrganismos que habitam o trato reprodutor, da flutuação de suas populações em resposta a eventos fisiológicos (e.g. ciclo estral), e de como estes microrganismos influenciam positiva ou negativamente a função reprodutiva tem potencial para subsidiar o incremento da produção pecuária. Tal incremento é considerado fundamental tendo em vista a necessidade de suprir as demandas da crescente população mundial, de acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) (2017).

A vagina é um segmento importante do trato reprodutor feminino, representando o primeiro local de contato íntimo com o órgão copulador do macho e, em algumas espécies domésticas, é também o local de deposição do sêmen após a copula. Além disso, a vagina representa o espaço de transição entre o meio externo e o ambiente uterino, e possui população característica de microrganismos, chamada microbiota vaginal. O equilíbrio da microbiota vaginal saudável é um dos fatores mais importantes deste ecossistema (Kovachev, 2019), e depende da convivência harmônica entre os microrganismos comensais, como por exemplo os *Lactobacillus*, que fazem parte do grupo de bactérias ácido-láticas (BAL) responsáveis pela saúde vaginal, e o hospedeiro.

Alterações da microbiota vaginal e seus potenciais fatores reguladores, como por exemplo os esteroides ovarianos, podem possibilitar abordagens de avaliação dos eventuais benefícios da manutenção de uma microbiota saudável à fêmea. Inúmeros estudos anteriores acerca dos microrganismos habitantes do ambiente vaginal têm relacionado a microbiota ao desenvolvimento de condição patológica do hospedeiro (Mendling, 2016). O advento de novas tecnologias possibilitou caracterizar a microbiota de forma mais ampla e complexa, e associar a microbiota a condições fisiológicas e patológicas. Diversas são as evidências de correlação causal entre a microbiota de diferentes compartimentos corporais do hospedeiro e quadros de hipertensão, doenças cardiovasculares, diabetes gestacional, obesidade

(Han et al., 2019; Ayyash et al., 2018; Ye et al., 2019; Smith et al., 2019; Cao et al., 2019).

Alternativamente, mais recentemente a microbiota tem sido investigada sob o ponto de vista de populações de microrganismos que induzem ou mantêm um estado saudável, ou que competem com aqueles que desencadeiam desordens da saúde. No contexto do ambiente vaginal, tem sido especulado que este pode ser regulado pelas flutuações hormonais de progesterona (P4) e estrógeno (E2) que impactam a população de células do sistema imunológico e a resposta imune local, a barreira estabelecida pelo epitélio vaginal, e a microbiota local (Dizzell et al., 2019). Estudar a composição da microbiota vaginal e o efeito dos hormônios esteroides ovarianos, por meio de suplementação exógena, em ovelhas pré-púberes, pode esclarecer o potencial envolvimento destes hormônios na modulação da funcionalidade do ambiente vaginal. Estabelecer um modelo animal para investigar a regulação acima citada pode possibilitar a identificação de microrganismos específicos associados a ambientes mais ou menos favoráveis à saúde do trato, e talvez, à fertilidade. A partir de tal caracterização, a inoculação de microrganismos no ambiente vaginal pode ser proposta visando à competição com patógenos e/ou melhorando as defesas locais do hospedeiro (Eschenbach et al., 2000; Sautter e Brown, 1980; Dizzell et al., 2019).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar as flutuações da população de bactérias ácido lácticas e dos potenciais oxidantes e antioxidantes do ambiente vaginal de ovelhas pré-púberes em resposta à suplementação exógena de progesterona (P4) e estrógeno (E2).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ovinocultura

Embora seja uma atividade explorada há bastante tempo no Brasil, a ovinocultura é considerada uma prática em expansão que apresenta largos horizontes para o incremento da produção pecuária. Entretanto, alguns entraves como problemas culturais associados a abordagens ultrapassadas (Maciel et al., 2019), falta de experiência e situação econômica do produtor são frequentemente encontrados. O rápido retorno do investimento em função do ciclo produtivo mais curto tem colocado a ovinocultura como uma atividade atraente no setor pecuário (Raineri et al., 2015).

Dentre os continentes maiores produtores de ovinos no mundo estão a Ásia, África e Oceania. O rebanho brasileiro de ovinos, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2017), é estimado em 13,7 milhões de cabeças. A região Nordeste é detentora da maior fração, com 9,03 milhões de cabeças, seguida pela região Sul com 3.30 milhões, sendo o Rio Grande do Sul detentor de 2.64 milhões. De acordo com estes dados, o mercado nacional mostrou uma alteração no interesse pela ovinocultura, havendo leve queda na região sul e um aumento da produção na região nordeste. Isso indica que, além da produção de lã, existe o interesse pela carne ovina, já que nos estados do nordeste são criadas raças deslanadas, adaptadas ao clima subtropical (Silva et al., 2013).

Um dos principais limitantes da ovinocultura é a estacionalidade reprodutiva, fenômeno que se intensifica na região sul do Brasil. O fotoperíodo mais curto, ou a diminuição das horas de luminosidade em um período de 24 horas, observada nos meses de inverno, determinam o momento em que os ovinos encontram-se reprodutivamente ativos. Ao longo dos anos, no intuito de reverter esta característica, certas raças vêm sofrendo pressão adaptativa aumentando seu período reprodutivo, e, buscando anular esta característica reprodutiva (Bicudo et al., 2009).

Conforme descrito acima, a produção de carne ovina vem se tornando atrativa aos produtores; no entanto, a sua rentabilidade necessita de escala de produção para que o produtor mantenha o mercado abastecido ao longo do ano. O desenvolvimento de biotecnologias voltadas a esta atividade é fundamental para que o seu potencial produtivo seja alcançado a fim de atender a demanda por carne de

qualidade, já que segundo a FAO (2017) a população mundial pode chegar a cerca de 10 bilhões de pessoas em 2050, e juntamente a este crescimento populacional, proporcionalmente cresce a exigência por proteína animal.

2.2 Fisiologia da reprodução

Considerada como poliéstrica estacional com fotoperíodo negativo, a espécie ovina (*Ovis aries*) tem acasalamentos restritos ao longo do ano, ou seja, estes animais apresentarão ciclos estrais férteis apenas em determinadas épocas do ano, limitando os acasalamentos à época. Conforme a raça e a latitude, a estação de acasalamento vai ocorrer durante os períodos do ano com dias mais curtos, ou seja, nas estações onde há um decréscimo de luminosidade ao longo de 24 horas (fotoperíodo negativo). Usualmente, este período ocorre desde o final do verão até meados do outono, e caracteriza a estacionalidade estral dos ovinos.

No mecanismo da estacionalidade reprodutiva, a luminosidade é captada pelos fotorreceptores da retina e atua de forma inibitória na glândula pineal, inibindo a secreção de melatonina. Nos períodos de menor luminosidade a inibição é reduzida, e a melatonina atinge concentrações mais elevadas, induzindo a liberação de GnRH pelo hipotálamo, que por sua vez induz a liberação de LH pela hipófise anterior, possibilitando a ocorrência de ovulação (Costa, 2007). O autor salienta que, o encurtamento do número de horas de luminosidade ao longo de 24 horas induz secreção de melatonina ao longo do período.

Com uma área geográfica bastante extensa, o Brasil se encontra entre as linhas do Equador (Regiões Nordeste e Norte) e o trópico de Capricórnio, com uma grande variação de latitudes ao Sul (Região Central, Sudeste e Sul). Considerando essa variabilidade geográfica, a duração da estação reprodutiva de ovinos varia consideravelmente de acordo com a região (Martins et al., 2008). Nos estados ao Norte, mais próximos à linha do Equador, onde há menor variação de luminosidade, há uma tendência de raças mais sensíveis ao fotoperíodo manifestarem sua ciclicidade por períodos mais curtos de tempo. Já no Sul, que está próximo do trópico de capricórnio, em que existe maior variação de luminosidade, raças mais sensíveis ao fotoperíodo estarão mais expostas aos efeitos da luminosidade e apresentarão períodos de ciclicidade mais longos. Os ovinos deslanados ou semi-deslanados, bem como algumas raças oriundas de regiões com pouca variação de luminosidade diária ao longo do ano, apresentam ciclos férteis o ano todo, embora

possam apresentar períodos de anestro em determinadas épocas do ano. Estas raças podem ser classificadas como poliéstricas contínuas (Machado, 2007; Talebkhan et al., 2012).

O ciclo estral em ovelhas caracteriza-se por uma sequência de eventos que se repetem de maneira cíclica e são divididos em proestro, estro, metaestro e diestro, como mostra a figura 1. O estro, que dura cerca de 30h, caracteriza o início do ciclo e é o momento em que a fêmea aceita o macho para acasalamento, período no qual ocorre a ovulação. O metaestro é a etapa subsequente, que dura em torno de três dias; período no qual ocorre a formação do corpo lúteo (CL). O metaestro é seguido pelo diestro, momento em que o CL atinge o pico de sua funcionalidade; tendo duração em torno de 14 dias. Em uma classificação simplificada, metaestro e diestro podem ser colocados em uma mesma fase do ciclo, chamada de luteal, por alguns autores. Por fim, em caso de ausência de sinalização por um conceito viável, o endométrio sinaliza o início da luteólise, ou regressão do CL, diminuindo as concentrações circulantes de progesterona. Este período que contempla a queda nas concentrações de progesterona, a finalização do crescimento folicular, e a ovulação subsequente é chamado de proestro. A classificação simplificada usada por alguns autores une as fases de proestro e estro recebe o nome de fase folicular. Esta fase tem duração em torno de 4 dias, quando as concentrações de estrógeno se elevam gradualmente culminando com a manifestação do comportamento estral e ovulação. A ovulação, que ocorre ao final do estro, é seguida pela formação do corpo lúteo, resultando na secreção de progesterona que é responsável pela manutenção da gestação. O corpo lúteo é formado por dois tipos celulares esteroidogênicos, que contribuem com a quantidade de progesterona total secretada durante a fase luteal do ciclo estral (Hafez, Hafez, 2004), as células luteais grandes e pequenas.

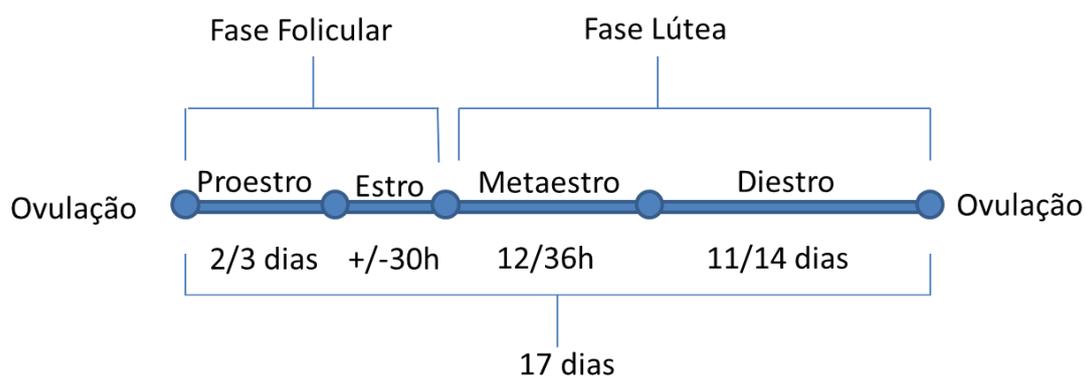


Figura 1. Conjunto de eventos a cada ciclo estral em ovelhas. Fonte: Adaptado de Hafez (2004).

2.3 Puberdade

A puberdade é caracterizada como a fase em que o indivíduo desenvolve sua capacidade e competência reprodutiva. A fase pré-púbere das fêmeas consiste em flutuações mínimas de estradiol em resposta à liberação tônica de GnRH e insuficiente liberação de gonadotrofinas. Apesar desse crescimento folicular basal, a principal limitação é a incapacidade hipotalâmica de gerar o pico de GnRH, bem como o insuficiente crescimento folicular e produção de estradiol necessário para estimular o pico de GnRH.

Frisch e Revelle, (1971) comentam que o peso corporal determina que a puberdade está correlacionada com maior peso no primeiro estro e associada a aumentos no acúmulo muscular, nas concentrações de insulina, GH (hormônio do crescimento), acúmulo de gordura e por sua vez acúmulo de energia no tecido adiposo como demonstra na figura 2. Nesse sentido, a puberdade pode ser atrasada pela desnutrição, enquanto um manejo alimentar adequado pode desencadear fatores que levam a uma função hormonal favorável ao amadurecimento sexual (López et al., 2019; Nieto, 2019; Frisch, 1984; Armstrong et al., 2001). Já Ferreira et al., (2019) comentam que o ganho de peso não afetou na puberdade e sim a idade em que os animais se encontravam.

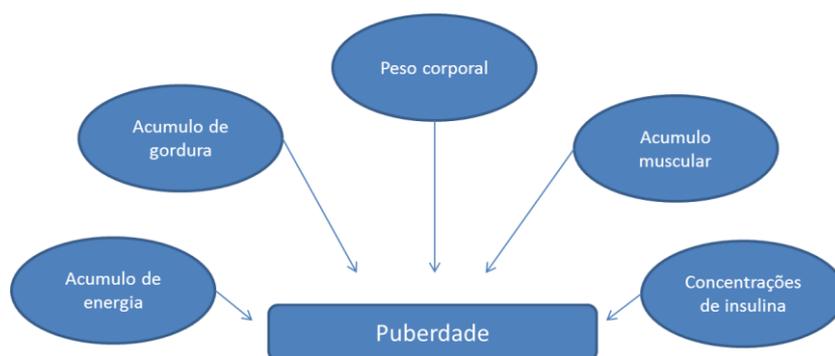


Figura 2. Fatores que levam a puberdade em ovinos. Fonte: Adaptado de Frisch e Revelle (1971).

Apesar da consistente determinação do impacto nutricional, ambiental e social no início da puberdade em diferentes espécies, cabe ressaltar que algumas moléculas tem sido identificadas como importantes nesse processo. Em estudo com ovelhas, Goodman et al., (2019) constataram que a kisspeptina endógena pode atuar como estimulante na frequência de pulso de GnRH. Também estudando ovelhas e ratos, Uenoyama et al., (2019) constataram que a kisspeptina é reguladora do início puberal, porém esta é controlada por esteroides em ovelhas, e que as alterações puberais podem ser alteradas por sinais nutricionais ou metabólicos em relação a biossíntese e secreção de kisspeptina.

No contexto do presente trabalho fêmeas pré-púberes foram utilizados como modelo animal em função da estabilidade do seu ambiente endócrino esteroidal, que permite manter fixas as concentrações de estrógeno e progesterona endógenas, enquanto as mesmas são manipuladas na forma de suplementação exógena.

2.4 Suplementação hormonal exógena

A suplementação exógena de hormônios do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal ou seus análogos visando à manipulação de etapas do ciclo estral é uma realidade na ovinocultura. A possibilidade de se manipular a reprodução de ovinos abre oportunidades interessantes para a maximização da exploração destes animais e uso de biotecnologias mais avançadas. Fora da estação reprodutiva há necessidade de se induzir ciclos férteis, ou seja, que culminem em ovulação, e a manipulação hormonal do ciclo estral representa ferramenta eficiente. Em ovinos, a indução de estro pode ser eficientemente obtida por meio da utilização de progestágenos em associação com gonadotrofinas e prostaglandinas (Abecia et al., 2012).

A respeito da suplementação com progestágenos discute-se, por exemplo, a o tempo de exposição. Tem sido observado que após seis dias de tratamento com dispositivos intravaginais de liberação lenta (CIDR®), a concentração de progesterona sérica diminui a níveis subluteais (2 ng/mL), permanecendo baixa até os 12 dias de suplementação intravaginal. O mesmo acontece quando são utilizadas esponjas contendo acetato de medroxiprogesterona (MAP) ou fluoroacetato de progesterona (FGA) (Menchaca; Rubianes, 2004). Os níveis subluteais de progesterona aumentam a frequência de pulsos de LH, mas não o suficiente para estimular a liberação do pico pré-ovulatório, com isso, o folículo cresce excessivamente, persiste por um longo período e inicia seu processo de envelhecimento (Menchaca; Rubianes, 2004). Uma alternativa para suplementação de P4 é a sua formulação injetável, que reduz o número de manejos, problemas com descarte de dispositivos intravaginais e higiene, além de eliminar o problema de perda de dispositivos (Cerezetti et al., 2016).

As flutuações dos esteroides ovarianos, estrógeno e progesterona, ao longo do ciclo reprodutivo dos animais domésticos precedem eventos fisiológicos e induzem respostas celulares importantes no organismo animal. Independente da origem das flutuações, se naturais ou induzidas, tanto o tempo de exposição quanto às concentrações circulantes atingidas após suplementação exógena impactam a resposta sistêmica do indivíduo. As respostas fisiológicas observadas no contexto reprodutivo tem sido restritas às funções reprodutivas mais óbvias; entretanto, de acordo com a literatura científica, os efeitos dos esteroides ovarianos no ambiente do trato reprodutor podem influenciar, por exemplo, a população de microrganismos que o habitam.

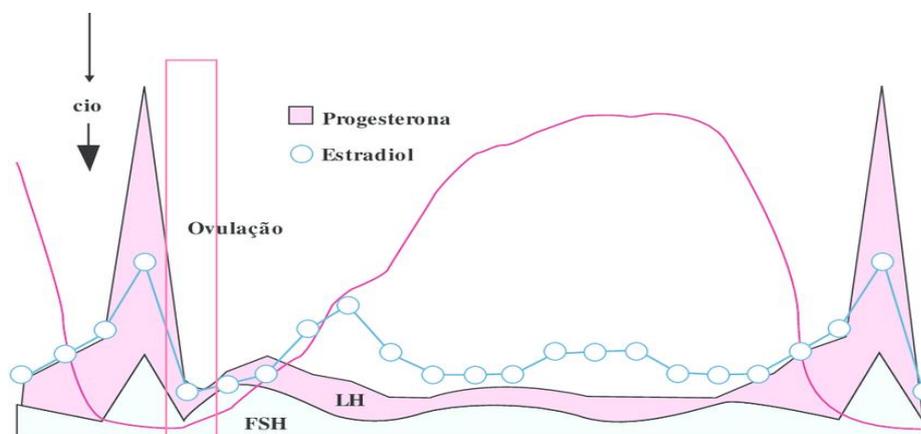


Figura 3. Flutuação hormonal durante o ciclo estral em ovelhas. Fonte: Moraes et al. (2002).

2.5 Microbiota vaginal

A microbiota é caracterizada pelo conjunto ou população de microrganismos que habitam um determinado ambiente. Em praticamente todos os vertebrados, os diferentes órgãos e compartimentos corpóreos possuem sua microbiota específica; dentre eles estão a pele, a boca, o sistema respiratório e a vagina (Hooper et al., 2012; Sender et al., 2016).

Tradicionalmente e por muitos anos os microrganismos e sua interação com os seus hospedeiros foram considerados sob o ponto de vista de uma relação de exploração e com benefícios apenas aos hóspedes. Embora estudos anteriores correlacionassem a presença de microrganismos ao estado enfermo do hospedeiro (Mendling, 2016), o advento de novas tecnologias levou a novos estudos e evidências que passaram a identificar microrganismos associados a situações benéficas para o hospedeiro em quadros de hipertensão, doenças cardiovasculares, diabetes gestacional e obesidade (Han et al., 2019; Ayyash et al., 2018; Ye et al., 2019; Smith et al., 2019; Cao et al., 2019). A ampliação da capacidade de identificar microrganismos habitantes dos distintos compartimentos corporais possibilitou a ampliação também dos horizontes de interpretação desta complexa relação.

No contexto reprodutivo, por exemplo, ao estudar fêmeas antes e após a cópula, Mandar et al., (2015) relataram que o sêmen tem um microbiota com maior diversidade, porém, com concentrações bacterianas totais mais baixas, o que não acontece no microbiota vaginal, já que esse é mais homogêneo. Porém, algumas mudanças podem acontecer após a cópula, já que a vagina é um sítio aberto e há uma troca de fluidos. Tais estudos demonstram a especificidade da microbiota vaginal e a suscetibilidade a variações desta composição. Ainda assim, padrões de populações de microrganismos têm sido estabelecidos e caracterizados como mais ou menos favoráveis à um status saudável, especialmente em humanos.

Segundo Swartz et al. (2014) a microbiota vaginal de bovinos e ovinos são únicas. Embora semelhantes entre si, a microbiota de bovinos tem uma maior diversidade do que a de ovinos, e ambas diferem da microbiota humana e de primatas não humanos. Embora predominantes os *Lactobacillus*, em contraste com a microbiota humana, os mesmos não são abundantes, e essa correlação é devido ao pH quase neutro em vacas e ovelhas. Há relatos, por exemplo, que a quantidade de microrganismos na microbiota vaginal pode alterar a atratividade sexual das

ovelhas (Ungerfeld e Silva, 2005). Chama a atenção a predominância de *Lactobacillus* em função da sua constante associação a ambientes saudáveis e competição com microrganismos patogênicos.

Com base nesses estudos, para que haja uma harmonia entre hospedeiro e microrganismos, havendo simbiose e assim ambiente favorável para os processos reprodutivos, é de extrema importância que o ambiente vaginal seja saudável, e que esteja em eubiose. Uma alternativa é fazer a modulação do ambiente vaginal com o uso de probióticos que são microrganismos que proporcionam uma interação vantajosa também ao hospedeiro, competindo com patógenos e influenciando positivamente o sistema imunológico (Kovachev, 2019; Van de Wijgert et al., 2020, Eschenbach et al., 2000; Sautter e Brown 1980; Dizzell et al., 2019). Assim, com a caracterização da relação entre alguns microrganismos e a função de órgãos específicos, fica evidente que estes microrganismos têm um importante papel na saúde do hospedeiro (Relman, 2012).

Ao considerarmos os fatores fisiológicos que podem influenciar a composição da microbiota, há evidência de que as flutuações cíclicas de progesterona (P4) e estrógeno (E2) representam fatores relevantes. Sabe-se que o estrógeno, por exemplo, impacta positivamente a defesa do ambiente vaginal por meio do aumento da espessura do epitélio vaginal, e influencia a população de *Lactobacillus* através do aumento da produção de seu substrato, o glicogênio, no epitélio suprabasal e células epiteliais apicais (Dizzel et al., 2019; Ayehunie et al., 2015). Este glicogênio vaginal é degradado pela α -amilase do hospedeiro em maltose, maltotriose e α -dextrinas, que são então convertidas em ácido láctico por *Lactobacillus* (Mirmonsef et al., 2014; Spear et al., 2014). Neste sentido, a caracterização da microbiota vaginal e de condições fisiológicas que a influenciam surge como aspecto fundamental para o estabelecimento de definições acerca da relação entre a população de microrganismos que habitam este compartimento e o seu impacto na saúde e fertilidade de animais domésticos.

2.6 Radicais livres, espécies reativas e enzimas antioxidantes

Mudanças na composição da microbiota local têm sido descritas como importantes na condição funcional do órgão e no estado de saúde do indivíduo. Especificamente, as bactérias ácido lácticas, alvo deste estudo, possuem potencial para alterar a regulação do balanço REDOX, ou seja, o equilíbrio entre os agentes

oxidantes e antioxidantes presentes localmente. Tanto efeitos positivos quanto negativos podem resultar de flutuações marcantes na população de bactérias ácido lácticas. Sua presença em equilíbrio demonstrou papel antioxidante importante, enquanto que sua representação excessiva na microbiota local pode levar ao estresse oxidativo em função do excesso de produção de ácido láctico (Lin et al. 2018; Iatsenko et al. 2018).

Os radicais livres (RL) são moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados em seus orbitais, ou seja, eles contêm um número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (Halliwell e Gutteridge., 1990; Halliwell., 1992). Os exemplos mais conhecidos de RL são o radical superóxido, radical hidroxil, e o óxido nítrico, sendo este último um RL centrado no nitrogênio, enquanto que os dois primeiros são centrados no oxigênio. Essa configuração eletrônica faz dos RL moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente reativas (Mello et al., 1984; Halliwell, 1994).

Quando os RL são provenientes de oxigênio, alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada, assim não podendo ser classificados como agentes reativos patogênicos (Ferreira e L.S, 1997). Estes autores ainda comentam que, o peróxido de hidrogênio apesar de não ser considerado um radical livre pela ausência de elétrons desemparelhados na última camada, tem potencial para efeitos deletérios, porque participa da reação que produz o radical hidroxil.

O excesso de produção dessas moléculas reativas pode induzir ao estresse oxidativo, danificar proteínas e DNA e induzir a peroxidação lipídica, com as correspondentes estruturas mitocondriais como os primeiros alvos de toxicidade (Kowaltowski e Vercesi, 1999). Apesar de usualmente associados a condições que levam ao dano celular, caracterizadas como estresse oxidativo, em condições fisiológicas, as espécies reativas de oxigênio (EROs) estão envolvidas em processos de defesa do organismo como, resposta imune, inflamação, plasticidade sináptica, aprendizado e memória, e até mesmo a sinalização intracelular.

Como toda a molécula reativa que desencadeia respostas celulares intensas que têm potencial para mudar a função ou o destino da célula, a produção de EROs possui um sistema de controle. Os compostos antioxidantes, que podem ser enzimáticos e não enzimáticos, caracterizam-se como um contraponto às concentrações elevadas de EROs, controlando num primeiro momento a resposta

induzida, e em situações mais intensas, o potencial dano oriundo da reatividade excessiva e oxidação descontrolada. Os antioxidantes podem ser provenientes de fontes exógenas ou endógenas, e têm como função bloquear e reduzir danos decorrentes dos RL, aceitando ou doando elétrons para eliminar a condição não emparelhada do radical (Kadiiska et al., 2013; Lu et al., 2010).

2.7 Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos

Dentre os antioxidantes enzimáticos existem a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Por ter uma capacidade de decompor a ERO, os antioxidantes enzimáticos são mais eficazes na proteção contra o ataque oxidativo.

Dentre os antioxidantes enzimáticos, a SOD, juntamente com a CAT, representam a primeira linha de defesa contra os EROS. A SOD pode ser subdividida em CuZn-SOD citosólico, Mn-SOD mitocondrial e SOD extracelular. A SOD catalisa a dismutação do superóxido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2), e esse produto da reação da dismutação é um oxidante fraco e é relativamente estável, enquanto a CAT, catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio a oxigênio e água (H_2O) (Glantzounis et al., 2005).

Outro sistema capaz de controlar os níveis de H_2O_2 consiste nas glutathione peroxidases (GPxs). As diferentes isoformas, mais importantes são: a celular (GPX1), que se situa no citosol e matriz mitocondrial, a gastrointestinal (GPX2), extracelular (GPX3) e a que atua em hidroperóxidos de fosfolípidos (GPX4) (Glantzounis et al., 2005). As GPxs catalisam a redução do H_2O_2 , e hidroperóxidos de lípidos (ROOH) a H_2O (e ROH) por oxidação da glutathione reduzida GSH à sua forma oxidada (GSSG) ou seja, podem converter peróxidos em água e álcool (Agarwal et al., 2005; Glantzounis et al., 2005).

Uma gama de substâncias presentes na dieta representa outro segmento importante da defesa antioxidante, e são chamadas de antioxidantes não enzimáticos. Os mais conhecidos são as vitaminas A, C e E, e carotenoides como o betacaroteno (Karki et al., 2016).

A vitamina A é ingerida de duas formas, como retinol que seria na forma de fonte animal, como peixes, ovos carnes e leites, ou na forma de carotenos provenientes de plantas, vegetais, frutos e óleos vegetais (Smith e Steinemann, 2000). A vitamina A atua junto com as vitaminas C e E na proteção de células contra

danos oxidativos. Já a vitamina C, ou ácido ascórbico, encontrada em frutas cítricas tais como laranja e limão e em outras frutas como a goiaba, kiwi, morango, caju e em vegetais como o pimentão, o brócolis é um antioxidante que quebra a cadeia solúvel em água (Lykkesfeldt et al., 2014).

A vitamina E, ao contrário da vitamina C, é um antioxidante solúvel em gordura que pode proteger os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) de membrana da oxidação, regular a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) e modular a transdução de sinal desta forma ela melhora as respostas imunes em modelos animais e humanos e confere proteção contra várias doenças infecciosas (Lee e Han, 2018).

1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar a microbiota vaginal em ovelhas pré-púberes quanto à população de bactérias ácido lácticas e atividade oxidante e antioxidante em resposta à suplementação exógena com estrógeno e progesterona.

3.1 Objetivos específicos

- Usar a suplementação exógena para simular a exposição do compartimento vaginal de ovelhas pré-púberes ao estrógeno na presença ou ausência de exposição prévia à progesterona;
- Mensurar quantitativa e qualitativamente a variação na população de bactérias ácido lácticas em resposta à suplementação exógena com esteroides ovarianos;
- Mensurar quantitativa e qualitativamente a variação na população de bactérias que crescem em ágar sangue em resposta à suplementação exógena com esteroides ovarianos;
- Mensurar a atividade oxidante em resposta à suplementação exógena com esteroides ovarianos;
- Mensurar a atividade antioxidante em resposta à suplementação exógena com esteroides ovarianos.

2. CAPÍTULO 1

Caracterização da população de bactérias ácido-láticas (BAL) vaginais em resposta a progesterona e ao estrógeno em ovelhas pré-púberes

Amílcar Jardim Matos¹; Matheus Beltrame Padilha², Maria Eduarda Rodrigues Costa², Jessica Ferreira Rodrigues¹, Andressa Minozzo Oliveira², Camila Cupper Vieira³, Ana Carolina da Rosa², Tiago Gallina Correa², Francielli Weber Santos Cibin^{1,2}, Paulo Bayard Dias Goncalves^{2,3}, Thamiris Vieira Marsico⁴; Irina Lübeck²; Fernando Silveira Mesquita^{1,5};

¹ Universidade Federal do Pampa; Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Uruguaiiana, RS, Brasil.

² Universidade Federal do Pampa; Curso de Medicina Veterinária, Uruguaiiana, RS, Brasil.

³ Universidade Federal de Santa Maria; Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Santa Maria, RS, Brasil.

⁴ Universidade Federal do ABC; Programa de Pós-Graduação em Biotecnociência, Santo André, SP, Brasil.

⁵ Autor para correspondência.

RESUMO

A microbiota compreende os microrganismos que habitam um determinado compartimento de um organismo vivo e pode estar relacionada ao estado de saúde do hospedeiro. O ambiente vaginal, incluindo a microbiota local e o equilíbrio redox, parece estar sob a regulação das flutuações hormonais, em especial a dos esteroides ovarianos. Este trabalho teve por objetivo investigar o efeito da suplementação exógena com progesterona apenas ou progesterona seguida de benzoato de estradiol na população de bactérias ácido lácticas, espécies reativas ao oxigênio e potencial antioxidante no ambiente vaginal de ovelhas pré-púberes. Dez ovelhas pré-púberes foram aleatoriamente divididas para receber ou não progesterona (P4) de longa ação via injeção intramuscular no dia zero (D0), seguido de suplementação com benzoato de estradiol (BE) no D5 para todas as fêmeas. O grupo de fêmeas que receberam ambos, P4 e BE, foi denominado Grupo PE, enquanto o grupo de fêmeas que receberam apenas estradiol foi chamado de Grupo E. No D0, D2 e D7, amostras vaginais de todos os animais foram coletadas via suabe, colocadas em solução salina, diluídas 1:10, 10^{-3} e 10^{-5} e semeadas em ágar sangue, em triplicatas. Alternativamente, amostras em solução salina estéril foram diluídas 1:10 e 10^{-4} e semeadas em ágar MRS (De Man e Rogosa e Sharpe) pelo método *pour plate*, em triplicatas. Três meses depois, o mesmo experimento foi repetido nos mesmos animais para a coleta de lavado vaginal. No D0, D2 e D7 todos os animais foram coletados via lavado vaginal, por meio de infusão de 5 ml de solução salina estéril no fórnix vaginal, seguida de recuperação em tubo estéril, e armazenamento a -20°C . O lavado vaginal foi avaliado para a produção de ROS e potencial antioxidante. Os dados foram analisados por análise de variância de amostras repetidas no tempo, considerando os efeitos de tratamento (Grupos E e PE), dia (D0, D2, D7) e sua interação. Não foi detectado efeito de tratamento para nenhuma das variáveis analisadas. O dia, altamente influenciado pelo efeito do tratamento com BE no D5, induziu um aumento das UFCs de BAL e potencial antioxidante das células vaginais e a uma redução na produção de ROS pelas células e lavado vaginal. Observou-se também um enriquecimento de colônias de *lactobacillus* ao longo do tempo. Conclui-se que o estrógeno favorece o crescimento da população vaginal das bactérias ácido lácticas e o estabelecimento de um ambiente vaginal mais antioxidante que parece estar correlacionado a uma mudança qualitativa da microbiota vaginal favorecendo o estabelecimento de *lactobacillus*.

Palavras-Chave: antioxidante, benzoato de estradiol, espécies reativas ao oxigênio, *lactobacillus*, microbiota vaginal, ovinos.

ABSTRACT

The microbiota comprehends the microorganisms that inhabit a given body compartment of a live organism and may be related to the state of health of the host. The vaginal environment, including the local microbiota and the redox equilibrium, seems to be under the regulation of hormonal fluctuations, particularly that of ovarian steroids. This study aimed to investigate the effect of progesterone alone or progesterone followed by estradiol benzoate exogenous supplementation on the lactic acid population, reactive oxygen species production and antioxidant potential in the vaginal environment of prepubertal ewe lambs. Ten prepubertal ewe lambs were randomly divided to receive or not an intramuscular injection of a long-acting progesterone on day zero (D0), followed by an injection of estradiol benzoate (EB) on D5 to all ten females. The female group receiving both P4 and EB was called PE group, whereas the female group receiving only EB was called E group. On D0, D2 and D7 vaginal samples from all animals were collected by swab into a sterile saline solution, diluted 1:10, 10^{-3} e 10^{-5} and seeded on blood agar, in triplicates; alternatively, samples in saline were diluted 1:10 and 10^{-4} and seeded on MRS agar (De Man, Rogosa and Sharpe) by the pour plate method, in triplicates. Three months later, the experiment was repeated with the same animals aiming to collect vaginal washings. ON D0, D2 and D7 all the animals were sampled by infusing 5 ml of sterile saline in to the vagina fornix, followed by solution recovery into a sterile tube and storage at -20°C . Vaginal washings were assessed for ROS production and antioxidant potential. The data were analyzed by repeated measures analysis of variance, considering the effects of treatment (E and PE), day (D0, D2, D7) and their interaction. No effect of treatment was detected for the assessed variables. The effect of day, highly influenced by the EB treatment effect on D5, induced an increase on the CFU of vaginal BALs and antioxidant potential of vaginal cells, and a reduction of ROS production in vaginal cells and vaginal washings. An enrichment of *lactobacillus* colonies over time was also observed. In conclusion, estrogen favors the growth of vaginal lactic acid bacteria and the establishment of a more antioxidant vaginal environment, which seems to be related to the observed shift of the

microbiota favoring the establishment of *Lactobacillus*.

Keywords: antioxidante, estadiol benzoate, *Lactobacillus*, reactive oxygen species, sheep, vaginal microbiota.

INTRODUÇÃO

A utilização do sequenciamento de última geração possibilitou a ampla caracterização da comunidade de microrganismos que habitam compartimentos biológicos de organismos multicelulares, chamada microbiota. A composição da microbiota e mudanças na sua composição em diferentes compartimentos orgânicos têm sido associadas ao desenvolvimento de inúmeras condições metabólicas, cardiovasculares, renais, hepáticas, respiratórias, autoimunes, mentais, psicológicas e neoplasias (Brown and Hazen, 2017; Daliri et al., 2017; Hou et al., 2017; Leung and Yimlamai, 2017; Pelzer et al., 2017; Wypych and Marsland, 2017). Tais associações não são definidas exclusivamente pela presença ou ausência de determinados microrganismos, mas pelo equilíbrio entre as espécies que compõem a microbiota local, ou pela sobreposição de uma espécie ou grupo sobre outros.

No trato reprodutor feminino a microbiota vaginal tem sido alvo de investigações acerca do seu envolvimento em condições patológicas e de fertilidade. A vagina representa o primeiro local de contato íntimo com o órgão copulador do macho, bem como o espaço de transição entre o meio externo e o ambiente uterino. Este compartimento possui população característica de microrganismos, chamada microbiota vaginal. O equilíbrio da microbiota vaginal saudável é um dos fatores mais importantes deste ecossistema (Kovachev, 2019), e depende da convivência harmônica entre os microrganismos comensais, como por exemplo os *Lactobacillus*, que fazem parte do grupo de bactérias ácido lácticas (BAL) responsáveis pela saúde vaginal, e o hospedeiro. A vaginose bacteriana em mulheres é uma condição amplamente investigada e classes de microbiota foram estabelecidas identificando classes associadas com mulheres mais ou menos suscetíveis. Ainda, a utilização terapêutica de bactérias probióticas tem sido capaz de reverter o quadro de vaginose bacteriana (Anukam et al., 2006; Sirota et al., 2014; Recine et al., 2016). Há relatos de associação positiva entre a presença de bactérias específicas no trato reprodutor feminino e fertilidade. A confirmação desta relação tem levado à investigação acerca da suplementação estratégica de microrganismos em conjunto a

técnicas de reprodução assistida, a fim de incrementar as taxas de fertilidade e reduzir as perdas gestacionais em humanos (Moore et al., 2000; Sirota et al., 2014; Fox and Eichelberger, 2015; Franasiak and Scott, 2015; Mor et al., 2015).

Apesar da associação comum entre agentes microbiológicos e atividade patogênica, existem microrganismos que convivem em simbiose com o hospedeiro e desempenham papel biológico fundamental na manutenção da saúde local e sistêmica do hospedeiro. A partir deste conceito foram desenvolvidos, por exemplo, os probióticos, que consistem em microrganismos vivos que quando administrados favorecem a saúde do hospedeiro (Reid, 2017). O grupo de BAL, em maioria consideradas comensais ou simbióticas, a exceção de algumas poucas espécies patogênicas como *Streptococcus pneumoniae*, possui capacidade de produção fermentativa do ácido láctico, além de ácido acético, etanol, acetona, proteases e bacteriocinas. Tais características levaram à sua ampla utilização pela indústria farmacêutica e alimentícia (Bosma et al., 2017; Porto et al., 2017).

Dentre os inúmeros fatores que podem influenciar composição da microbiota vaginal pode-se citar os hormônios esteroides ovarianos, progesterona (P4) e estrógeno (E2), os quais também influenciam a resposta imune local e na atividade de barreira desenvolvida pelo epitélio vaginal (Doerflinger et al., 2014; Sirota et al., 2014). As flutuações hormonais, especialmente de estrógeno, têm relação direta com a população de *Lactobacillus*, gênero bacteriano componente do grupo de BAL, e influenciam o ambiente vaginal. Em mulheres na menopausa, a população de BAL é reduzida em comparação a mulheres na puberdade ou grávidas. Neste contexto, a insuficiência na produção de estrógeno falha em induzir a maturação das células epiteliais vaginais e o acúmulo de glicogênio, que é o maior substrato utilizado pelas BAL. Adicionalmente, os *Lactobacillus* são responsáveis também pela produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e biosurfactantes, além de evitar a conexão física de patógenos com o epitélio vaginal e degradação via processos de autofagia (Amabebe and Anumba, 2018).

Estudar a composição da microbiota vaginal e o efeito dos hormônios esteroides ovarianos, por meio de suplementação exógena, em ovelhas pré-púberes, pode esclarecer o potencial envolvimento destes hormônios na modulação da funcionalidade do ambiente vaginal. Estabelecer um modelo animal para investigar a regulação acima citada pode possibilitar a identificação de microrganismos específicos associados a ambientes mais ou menos favoráveis à

saúde do trato, e talvez, à fertilidade. A partir de tal caracterização, a inoculação de microrganismos no ambiente vaginal pode ser proposta visando à competição com patógenos e/ou melhorando as defesas locais do hospedeiro (Eschenbach et al., 2000; Sautter e Brown, 1980; Dizzell et al., 2019). O objetivo deste trabalho foi caracterizar as flutuações da população de bactérias ácido lácticas e dos potenciais oxidantes e antioxidantes do ambiente vaginal de ovelhas pré-púberes em resposta à suplementação exógena de progesterona (P4) e estrógeno (E2).

MATERIAL E MÉTODOS

Experimentação animal

O experimento foi realizado na Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA) campus Uruguaiana, latitude 29.832935 longitude 57.100747 no período de julho a novembro. Foram selecionadas dez ovelhas da raça Ile de France com idade de doze meses, escore de condição corporal entre 1 e 2 com média de 1,5. Os animais encontravam-se estabulados, recebendo ração balanceada, volumoso e água *ad libitum*.

Delineamento experimental e coleta de amostras

As fêmeas foram pesadas no primeiro dia do experimento e divididas aleatoriamente em dois grupos de cinco animais, onde um dos grupos recebeu 30mg de progesterona injetável de ação prolongada (im; Sincrogest, Ouro Fino, Brasil) no dia zero, e 500 µg benzoato de estradiol (im; Sincrodiol, Ouro Fino, Brasil) no dia 5 (Grupo P4 + BE; Grupo PE). O outro grupo, que foi denominado Grupo E, recebeu somente benzoato de estradiol (500 µg; im; Sincrodiol, Ouro Fino, Brasil). Esse procedimento foi realizado duas vezes, sendo a primeira chamada de Experimento 1, para coleta de suabes vaginais e cultivo *in vitro*, e a segunda de Experimento 2 para coleta de lavados vaginais e determinação de EROs e atividade antioxidante. Os mesmos animais foram utilizados em ambos os experimentos, com um intervalo de 3 meses entre experimentos (Figura 1). Durante o período experimental, as fêmeas foram expostas diariamente a um macho adulto hígido para verificar a manifestação do comportamento de cio, e foram submetidas diariamente à venopunção para coleta de sangue e posterior mensuração das concentrações de progesterona (dados não gerados até a submissão da dissertação).

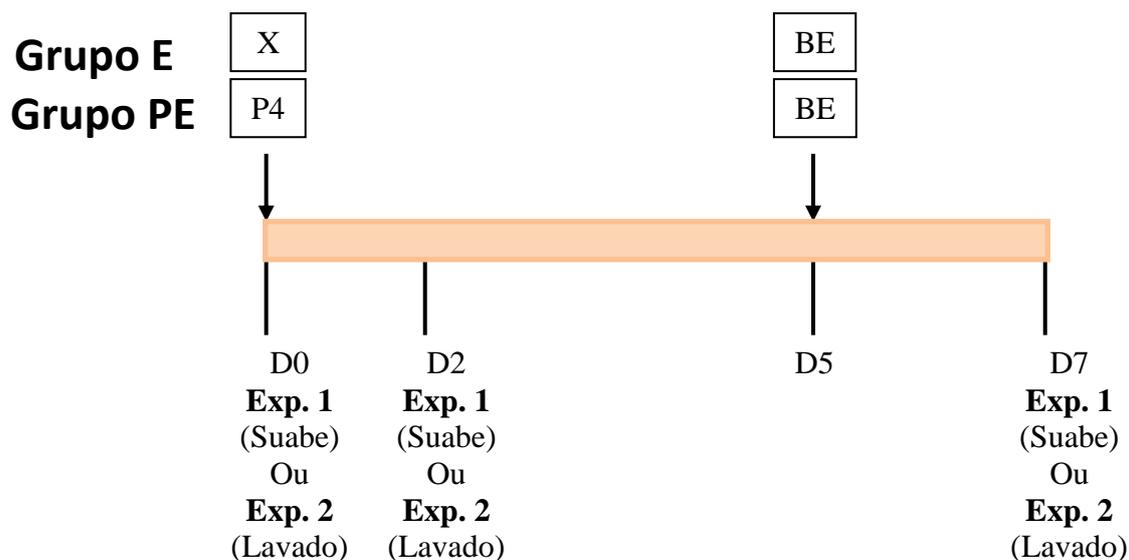


Figura 1. Metodologia utilizada. Representação esquemática da manipulação hormonal e coleta de suabes vaginais, onde D0, D2 e D7 foram feitas as coletas e D0 administração injetável de P4 e D5 injeção de E2.

Coleta de suabe vaginal

Para obtenção de amostras para análise microbiológica do ambiente vaginal a genitália externa foi higienizada com papel toalha embebida em etanol a 70%. A vulva foi suavemente aberta com mãos enluvasadas e um suabe estéril foi retirado de sua embalagem e introduzido na extremidade mais cranial da vagina, sem contato com o meio externo. A haste de coleta foi então girada no sentido horário e friccionada contra a parede vaginal por aproximadamente 15 segundos, removida e armazenada em tubo de ensaio contendo 1 mL de solução salina estéril. As amostras foram transportadas à temperatura ambiente imediatamente para o laboratório de microbiologia para a semeadura.

Semeadura de suabe vaginal

Os tubos contendo suabes em solução (considerado a diluição zero) foram agitados em vórtex por 30 seg. Adicionalmente, diluições de 10^{-1} foram realizadas com a transferência de 1 mL do tubo anterior para frascos contendo 9 mL de solução salina. Para a análise de bactérias ácido lácticas (BAL) as amostras foram semeadas em ágar De Man e Rogosa e Sharpe (MRS), em triplicata, 1 mL das soluções 10^{-1} e 10^{-4} ; Um mL de cada suspensão foi semeado em ágar MRS pelo método *pour plate*,

para o crescimento de BAL. As placas foram incubadas a 37° C durante 72 horas, em compartimentos para cultivo anaeróbio contendo pastilhas geradoras de anaerobiose. Após as 72 horas de cultivo em ágar MRS, as colônias sugestivas de BAL foram transferidas para o caldo MRS e cultivadas por mais 24 horas a 37° C para realização dos testes de catalase, oxidase e coloração de Gram (Koneman, 2008; Quinn et al., 2005) seguido pela adição de glicerol a 10% e armazenamento a -80°C. As colônias cultivadas em Agar MRS também foram submetidas à análise quantitativa, pela contagem das mesmas e determinação das unidades formadoras de colônias (UFC).

Adicionalmente, após agitação em vórtex por 30 segundos e diluição 1:10, esta solução foi novamente diluída a 10^{-3} e 10^{-5} e inoculada em ágar sangue, em triplicata, utilizando 100uL das soluções 1:10, 10^{-3} e 10^{-5} , com auxílio de alça de Drigalski, distribuindo de forma homogênea na placa de Petri. As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas em estufa. Posteriormente, nas colônias isoladas foram realizados os testes de catalase, oxidase e coloração de Gram (Koneman, 2008; Quinn et al., 2005) seguido pela adição de glicerol a 10% e armazenamento a -80°C. As colônias cultivadas em Agar Sangue também foram submetidas a análise quantitativa, pela contagem das mesmas e determinação das unidades formadoras de colônias (UFC).

Análise qualitativa da população vaginal de bactérias

A análise qualitativa foi realizada a partir do isolamento de microrganismos totais aeróbicos e/ou anaeróbicos facultativos, cultivados em ágar sangue contendo 5% de sangue desfibrinado de ovino (cultivo em ágar sangue), bem como de microrganismos ácido lácticos que foram cultivados em ágar MRS em anaerobiose. As colônias selecionadas e cultivadas foram identificadas de maneira presuntiva pela presença ou ausência de atividade de catalase, oxidase além de análise morfotintorial pelo método de coloração de gram (Koneman, 2008; Quinn et al., 2005).

Potencial oxidativo e antioxidante do ambiente vaginal

Após três meses, as mesmas dez ovelhas foram submetidas ao mesmo protocolo de exposição à suplementação exógena, conforme descrito acima, exceto pelas amostras coletadas que consistiram em lavagem vaginal (Figura 1). No D0, as

dez ovelhas foram submetidas à lavagem vaginal por meio de infusão de 5 mL de solução salina estéril no fornix vaginal, seguido de recuperação em tubo estéril, e armazenamento a -20°C para posterior análise do potencial oxidativo e antioxidante do ambiente vaginal. Imediatamente após a coleta, 5 ovelhas foram escolhidas aleatoriamente para receber 30 mg de progesterona (P4) injetável de ação prolongada (im; Sincrogest, Ouro Fino, Brasil) no D0. No D2 (48h), todas as ovelhas foram novamente coletadas por lavagem vaginal. No dia cinco todos os animais receberam 500 µg Benzoato de estradiol (im; Sincrodiol, Ouro Fino, Brasil), e após 48h (D7), os lavados vaginais foram novamente coletados.

Coleta de lavado vaginal

Para obtenção das amostras a genitália externa foi higienizada com papel toalha embebido em etanol a 70%. A vulva foi suavemente aberta com as mãos enluvadas e um tubo de silicone estéril com mandril metálico foi introduzido na vagina até o fórnix vaginal. Cinco mL de solução salina estéril foram injetados através do tubo de silicone, seguido por inversão imediata do tubo em um tubo de coleta estéril. Os tubos foram imediatamente transportados para o laboratório, divididos em alíquotas e armazenados a -20°C para processamento posterior. As amostras de lavado vaginal foram submetidas à determinação da concentração proteica pelo método de Bradford, como forma indireta de normalizar os dados de EROs e FRAP para a quantidade de células presentes no lavado.

Ensaio de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Os níveis de espécies reativas de oxigênio foram determinados por um método espectrofluorimétrico usando diacetato de 2', 7' -diclorofluoresceína (DCF-D) (Loetchutinat et al., 2005). As amostras foram incubadas no escuro com 5 µL de DCF-C (1 mM). A oxidação do DCF-D foi monitorada quanto à diclorofluoresceína fluorescente (DCF) pelas espécies reativas. A quantificação da intensidade da fluorescência foi realizada a 520 nm (excitação a 488 nm) minutos após a adição de DCF-D no espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF-5301PC. Os resultados são expressos como UF (unidades de fluorescência) divididos pela concentração de proteína total do lavado (UF/µg de proteína), para corrigir por eventuais diferenças na quantidade de células presentes no lavado.

Ensaio de potencial antioxidante redutor férrico (FRAP)

O potencial antioxidante da lavagem vaginal foi determinado por redução férrica ensaio de potencial antioxidante. Neste ensaio, os antioxidantes presentes na amostra foram avaliados como redutores de Fe + 3 a Fe + 2, que é quelatado por 2,4,6-Tri (2-piridil) -s-triazina (TPTZ) para formar o Fe + 2-TPTZ com absorção máxima a 593 nm (Benzie e Strain, 1996). divididos pela concentração de proteína total do lavado (UF/ μ g de proteína), para corrigir por eventuais diferenças na quantidade de células presentes no lavado.

Análise Estatística

Os dados quantitativos de crescimento bacteriano (Unidades Formadoras de Colônia; UFC) e FRAP foram transformados por Log₂, e os dados de ROS demonstraram distribuição normal. O efeito de grupo foi analisado como medidas repetidas no tempo por meio do comando MIXED no software SAS. Os efeitos principais de grupo, dia e interação grupo por dia foram determinados por teste t de Student como uma análise posthoc. A estrutura de covariância com o Critério de Informação Akaike mais baixo foi usado neste modelo. O efeito de grupo no peso dos animais foi avaliado por teste t de Student. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

RESULTADOS

O peso não variou entre os grupos ($26,4 \pm 3,61$ Kg e $28,78 \pm 3,61$ Kg para E e PE, respectivamente; $p=0,65$), bem como não variaram as concentrações de proteína do lavado vaginal ($p > 0,05$).

Não foi observado efeito de grupo (E x PE) nem da interação grupo por dia para nenhuma das variáveis dependentes testadas ($p \geq 0,05$); entretanto, foi observado efeito de dia nas UFC de BAL e potencial oxidativo (ROS) e antioxidante (FRAP) ($p=0,01$; $p=0,0002$; $p=0,0004$, respectivamente).

O efeito de dia observado na população de BALs foi caracterizado pela menor quantidade de UFC no D0 do que no D7 e D2, sendo que D2 e D7 não foram diferentes entre si (Figura 3). Adicionalmente, enquanto a produção de EROs foi maior no D0 em relação ao D2 e D7, sem diferença observada entre o D2 e o D7 (Figura 5), o potencial antioxidante medido por FRAP reduziu do D0 ao D2 e

aumentou do D2 ao D7, enquanto D0 foi igual ao D7, conforme demonstrado na Figura 4.

A análise qualitativa das colônias obtidas após cultivo em ágar sangue identificou a predominância de bactérias Gram positivas nas amostras coletadas no D0 (8/10 vs. 1/10; Gram + e Gram -, respectivamente), D2 (5/10 vs. 3/10; Gram + e Gram -, respectivamente) e D7 (6/10 vs. 4/10; Gram + e Gram -, respectivamente), com um leve aumento de Gram negativas no D7 (Tabela 1). De maneira semelhante, após análise qualitativa das colônias obtidas após cultivo em ágar MRS, em condição de anaerobiose, observou-se a predominância de bactérias Gram positivas nos cultivos de amostras do D0 (6/10 vs. 3/10; Gram + e Gram -, respectivamente), D2 (7/10 vs. 2/10; Gram + e Gram -, respectivamente) e D7 (8/10 vs. 1/10; Gram + e Gram -, respectivamente; Tabela 2).

A identificação presuntiva dos microrganismos a partir de avaliação da coloração de Gram e atividade de catalase e oxidase é sugestiva de um enriquecimento de *lactobacillus* entre as colônias identificadas no D0 em relação ao D2 e D7.

DISCUSSÃO

A vagina representa um ambiente de transição no trato reprodutor feminino, entre o meio externo e o útero. Este ambiente de transição possui uma microbiota própria, com microrganismos específicos que podem flutuar de acordo com o ambiente endócrino e seu estado de saúde, bem como influenciar as condições do ambiente vaginal como, por exemplo, o equilíbrio redox. O presente trabalho demonstrou que enquanto a exposição prévia à P4 não teve efeito nas variáveis testadas, o efeito do momento da coleta, que tem significativa influência da exposição ao BE, induziu a um aumento no número de UFC de BAL, ao enriquecimento de colônias identificadas como *lactobacillus*, aumento do potencial antioxidante em células vaginais, e redução do potencial oxidante em células e lavado vaginal.

De acordo com os nossos resultados, as BAL e o potencial antioxidante e oxidante em ovelhas pré-púberes foram influenciados pela exposição ao BE, mas não à P4. De acordo com Miller et al., (2017) em seu estudo da microbiota vaginal de babuínos, houve uma predominância de *lactobacillus* entre na fase peri-ovulatória em relação à fase de anestro. Outros já relataram os efeitos do estrógeno no

espessamento e o aumento de células que acumulam glicogênio (Nyachieo et al. 2009). Em estudo de Bo (1970), a P4 sozinha ou em combinação com o BE aumentou a concentração de glicogênio no epitélio vaginal em macacos-esquilo. Nasioudis et al., (2015) sugerem a relação entre a atividade de α -amilase, que converte glicogênio em ácido láctico, D-ácido láctico e *Lactobacillus* no ambiente vaginal. Considerando que o aumento do acúmulo de glicogênio e da sua biodisponibilidade favorece a proliferação de *Lactobacillus*, os quais são representantes relevantes das BAL, os resultados estão em acordo com a literatura. Wagner e Johnson, (2012) sugerem que a maior influência dos *Lactobacillus* sobre as células epiteliais vaginais seja direcionar o recrutamento de uma melhor resposta do hospedeiro, e os classificam como a causa da saúde vaginal. Ao passo que Mitchell et al. (2017) acreditam que a colonização vaginal por *Lactobacillus* é uma consequência de um ambiente saudável. Em ambos os casos, os *Lactobacillus* podem ser considerados marcadores da saúde vulvovaginal. Em assincronia com nossos dados indicando aumento da população de BAL 48 horas após a administração de BE, Marsico (2019), estudando ovelhas adultas em anestro estacional, observou um declínio na contagem de UFCs de BAL 12 e 60 horas após a administração de BE. Deve-se considerar que fêmeas adultas que já foram expostas à cópula são influenciadas pela microbiota do pênis e prepúcio do macho, bem como das demais fêmeas com que estes machos copularam (Zozaya et al., 2016). Adicionalmente, a maturação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal ao atingir a maturidade sexual leva às flutuações endócrinas associadas à atividade reprodutiva aumentando, por exemplo, as concentrações circulantes de estrógeno, e as condições basais de espessura do epitélio vaginal e de acúmulo de glicogênio (Farage e Maibach, 2006). Sendo assim, a pré-exposição aos esteroides ovarianos nos animais adultos e à cópula, fatores que representam significativa distinção entre fêmeas pré-púberes e púberes, devem ser levados em consideração conjuntamente antes do estabelecimento de qualquer comparação simplificada e precipitada da microbiota vaginal.

No início da puberdade, o trato genital inferior feminino geralmente se coloniza com as espécies de *Lactobacillus* e o pH vaginal diminui. Essas alterações são concomitantes ao aumento do estrógeno circulante e são acompanhadas pelo aumento dos depósitos de glicogênio nas células epiteliais vaginais (Cruickshank e Sharman, 1934). No presente estudo, a suplementação exógena com BE pode ter

simulado este início da exposição gradual ao estrógeno que ocorre na puberdade, já que as fêmeas utilizadas eram pré-pubescentes e foram induzidas a um protocolo de indução com BE. Essas variações no ciclo estral são importantes por levarem a flutuações no glicogênio disponível, podendo assim afetar profundamente a colonização das espécies de *Lactobacillus*, e que este glicogênio livre no fluido genital está associado a uma microbiota genital dominada por *Lactobacillus* (Mirmonsef et al., 2014).

Em relação à ausência de efeitos observados após a exposição à P4, Kindinger et al., (2017) comentam que a P4 não influenciou a microbiota vaginal durante a gestação de mulheres que receberam progesterona via dispositivos vaginais e que esta não modula a os microrganismos presentes na vagina. Da mesma forma, Brown et al., (2019) estudando a microbiota vaginal, em especial os *Lactobacillus*, de mulheres grávidas com risco de nascimento pré-maturos também não observaram uma alteração da microbiota vaginal em resposta à P4. Os estudos citados reforçam os achados indicando que a P4 não tem um efeito na população de BAL. Por outro lado, a P4 parece ter efeito anti-inflamatório através da sinalização dominante no receptor B em células miométriais (Tan et al., 2012), além de resultar em um afinamento do epitélio vaginal constatado (Marx et al., 1996).

Os resultados demonstraram que 48 horas após a administração de BE houve uma queda na produção de ROS e um aumento no potencial antioxidante. Entretanto, Marsico (2019), utilizando ovelhas adultas em anestro estacional, observou um potencial antioxidante reduzido na resposta aguda e tardia a BE e sem efeito observável na produção de ROS. O metabolismo de O₂ pelas BAL também pode levar à produção de ROS, e algumas cepas podem produzir grandes quantidades de H₂O₂ (Papadimitriou et al., 2016). Esta situação pode ser modulada pelas flutuações hormonais decorrente do ciclo estral. O E2 e a P4 também são estudados quanto sua capacidade oxidativa e antioxidante. Estudos como o de Irwin et al.,(2008) em células cerebrais, demonstram que P4 e E2 aumentam a capacidade oxidativa das mitocôndrias no tecido cerebral. Serviddio et al.,(2002) estudando o endométrio de mulheres comentam que as alterações do ciclo menstrual estão relacionadas ao metabolismo da GSH e no estímulo da atividade da enzima antioxidante e que este ciclo está envolvido na manutenção do equilíbrio oxidativo ideal no endométrio. Já Cornelli et al., (2013) estudando o ciclo menstrual de mulheres em relação às suas fases e ao tempo verificaram que, os valores

máximos de estresse oxidativo foram observados próximos ao pico de estrógeno, mantendo-se acima dos níveis basais e diminuindo durante a fase de P4 até retornar ao normal no final do ciclo menstrual.

CONCLUSÃO

Propõe-se que a suplementação com BE explica o efeito de dia observado neste estudo e, portanto, que a exposição a uma fonte de estrógeno favorece o crescimento da população vaginal de BAL e influencia o equilíbrio redox desequilibrando este ambiente na direção a um cenário antioxidante. Ainda, a elevada atividade antioxidante do ambiente vaginal pode explicar a redução observada na quantidade de ROS produzido pós-estrógeno. Por outro lado, a P4 não influencia a população de BAL e o potencial redox do ambiente vaginal.

Este estudo confirma o uso de ovelhas pré-pubescentes como modelo experimental *in vivo* apropriado para o estudo das flutuações da microbiota vaginal e ambiente oxidante/antioxidante em resposta à suplementação exógena de hormônios esteroides ovarianos.

REFERÊNCIAS

AMABEBE, Emmanuel; ANUMBA, Dilly OC. The vaginal microenvironment: the physiologic role of lactobacilli. **Frontiers in medicine**, v. 5, p. 181, 2018.

ANUKAM, Kingsley C. et al. Clinical study comparing probiotic Lactobacillus GR-1 and RC-14 with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 12-13, p. 2772-2776, 2006.

BENZIE, Iris FF; STRAIN, John J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BO, Walter J. The effect of progesterone and progesterone-estrogen on the glycogen deposition in the vagina of the squirrel monkey. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 107, n. 4, p. 524-530, 1970.

BOSMA, Elleke F.; FORSTER, Jochen; NIELSEN, Alex Toftgaard. Lactobacilli and pediococci as versatile cell factories—Evaluation of strain properties and genetic tools. **Biotechnology advances**, v. 35, n. 4, p. 419-442, 2017.

BROWN, Richard G. et al. Establishment of vaginal microbiota composition in early pregnancy and its association with subsequent preterm prelabor rupture of the fetal membranes. **Translational Research**, v. 207, p. 30-43, 2019.

BROWN, J. Mark; HAZEN, Stanley L. Targeting of microbe-derived metabolites to improve human health: The next frontier for drug discovery. **Journal of biological chemistry**, v. 292, n. 21, p. 8560-8568, 2017.

CORNELLI, Umberto et al. Analysis of oxidative stress during the menstrual cycle. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 11, n. 1, p. 74, 2013.

CRUICKSHANK, R.; SHARMAN, A. The biology of the vagina in the human subject. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 41, n. 2, p. 208-226, 1934.

DALIRI, Eric Banan-Mwine; LEE, Byong H.; OH, Deog H. Current perspectives on antihypertensive probiotics. **Probiotics and antimicrobial proteins**, v. 9, n. 2, p. 91-101, 2017.

DIZZELL, Sara et al. Protective Effect of Probiotic Bacteria and Estrogen in Preventing HIV-1-Mediated Impairment of Epithelial Barrier Integrity in Female Genital Tract. **Cells**, v. 8, n. 10, p. 1120, 2019.

DOERFLINGER, Sylvie Y.; THROOP, Andrea L.; HERBST-KRALOVETZ, Melissa M. Bacteria in the vaginal microbiome alter the innate immune response and barrier properties of the human vaginal epithelia in a species-specific manner. **The Journal of infectious diseases**, v. 209, n. 12, p. 1989-1999, 2014.

FARAGE, Miranda; MAIBACH, Howard. Lifetime changes in the vulva and vagina. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 273, n. 4, p. 195-202, 2006.

FOX, Chelsea; EICHELBERGER, Kacey. Maternal microbiome and pregnancy outcomes. **Fertility and sterility**, v. 104, n. 6, p. 1358-1363, 2015.

FRANASIAK, Jason M.; SCOTT JR, Richard T. Reproductive tract microbiome in assisted reproductive technologies. **Fertility and sterility**, v. 104, n. 6, p. 1364-1371, 2015.

LEUNG, Daniel H.; YIMLAMAI, Dean. The intestinal microbiome and paediatric liver disease. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 2, n. 6, p. 446-455, 2017..

MOORE, Donald E. et al. Bacteria in the transfer catheter tip influence the live-birth rate after in vitro fertilization. **Fertility and sterility**, v. 74, n. 6, p. 1118-1124, 2000.

Mor, A., Driggers, P.H., Segars, J.H., 2015. Molecular characterization of the human microbiome from a reproductive perspective. *Fertil Steril* 104, 1344-1350.

HOU, Qihang et al. The research progress on intestinal stem cells and its relationship with intestinal microbiota. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 599, 2017.

IRWIN, Ronald W. et al. Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. **Endocrinology**, v. 149, n. 6, p. 3167-3175, 2008.

KINDINGER, Lindsay M. et al. The interaction between vaginal microbiota, cervical length, and vaginal progesterone treatment for preterm birth risk. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 6, 2017.

Koneman, E. W. Diagnóstico Microbiológico, texto e atlas colorido. 6ª Ed. Guanabara Koogan. 1760p, 2008.

KOVACHEV, Stefan Miladinov. Cervical cancer and vaginal microbiota changes. **Archives of microbiology**, p. 1-5, 2019.

MARX, PRESTON A. et al. Progesterone implants enhance SIV vaginal transmission and early virus load. **Nature medicine**, v. 2, n. 10, p. 1084-1089, 1996.

MARSICO, T. V. **Análise da população de bactérias ácido-láticas (bal) vaginais cultiváveis em resposta ao estrógeno e sua influência no potencial oxidante e antioxidante do ambiente vaginal em ovis aries**. Dissertação. Uruguaiana, RS. 2019.

MILLER, E. A. et al. Ovarian cycling and reproductive state shape the vaginal microbiota in wild baboons. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 8, 2017.

MIRMONSEF, P. et al. Free glycogen in vaginal fluids is associated with Lactobacillus colonization and low vaginal pH. **PloS one**, v. 9, n. 7, 2014.

MITCHELL, Caroline M. et al. Vaginal microbiota and genitourinary menopausal symptoms: a cross sectional analysis. **Menopause** (New York, NY), v. 24, n. 10, p. 1160, 2017

NASIOUDIS, Dimitrios et al. α -Amylase in vaginal fluid: association with conditions favorable to dominance of Lactobacillus. **Reproductive Sciences**, v. 22, n. 11, p. 1393-1398, 2015.

NYACHIEO, A. et al. Vaginal histological changes of the baboon during the normal menstrual cycle and pregnancy. **East African medical journal**, v. 86, n. 4, 2009.

WAGNER, R. Doug; JOHNSON, Shemedi J. Probiotic lactobacillus and estrogen effects on vaginal epithelial gene expression responses to *Candida albicans*. **Journal of biomedical science**, v. 19, n. 1, p. 58, 2012.

.

PAPADIMITRIOU, Konstantinos et al. "**Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria.**" **Microbiology and molecular biology reviews** : MMBR vol. 80,3 837-90. 27 Jul. 2016, doi:10.1128/MMBR.00076-15.

Pelzer, E., Gomez-Arango, L.F., Barrett, H.L., Nitert, M.D., 2017. Review: Maternal health and the placental microbiome. *Placenta* 54, 30-37.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Artmed Editora, 2005.

PORTO, Maria Carolina W. et al. *Pediococcus* spp.: an important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 3, p. 361-374, 2017.

RECINE, Nadia et al. Restoring vaginal microbiota: biological control of bacterial vaginosis. A prospective case–control study using *Lactobacillus rhamnosus* BMX 54 as adjuvant treatment against bacterial vaginosis. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 293, n. 1, p. 101-107, 2016.

REID, Gregor. The development of probiotics for women's health. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 269-277, 2017.

SAUTTER, R. L., and WILLIAM J. Brown. "Sequential vaginal cultures from normal young women." **Journal of clinical microbiology** 11.5 (1980): 479-484.

SERVIDDIO, Gaetano et al. Modulation of endometrial redox balance during the menstrual cycle: relation with sex hormones. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 6, p. 2843-2848, 2002.

SIROTA, Ido; ZAREK, Shvetha M.; SEGARS, James H. Potential influence of the microbiome on infertility and assisted reproductive technology. In: **Seminars in reproductive medicine**. NIH Public Access, 2014. p. 35.

TAN, Huiqing et al. Progesterone receptor-A and-B have opposite effects on proinflammatory gene expression in human myometrial cells: implications for progesterone actions in human pregnancy and parturition. **The Journal of Clinical Endocrinology**, v. 97, n. 5, p. E719-E730, 2012.

ZOZAYA, Marcela et al. Bacterial communities in penile skin, male urethra, and vaginas of heterosexual couples with and without bacterial vaginosis. **Microbiome**, v. 4, n. 1, p. 16, 2016.

WYPYCH, Tomasz P.; MARSLAND, Benjamin J. Diet hypotheses in light of the microbiota revolution: new perspectives. **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 537, 2017.

4.9 TABELAS

Tabela 1. Identificação presuntiva de bactérias através da análise morfotintorial, oxidase e catalase. Bactérias por cultivo em agar sangue. Colônias obtidas por cultivo em ágar sangue do dia D0 (estado basal), D2 (48 horas após a injeção de P4) e D7 (48 horas após a injeção de BE).

DIA	ANIMAL	GRUPO	MORFOLOGIA	GRAM	OXIDASE	CATALASE	ID
D0	1	E	BACILO	+	+	-	Indeterminado
	2	E	COCO	+	-	-	<i>Streptococcus</i>
	3	E	COCOBACILO	+	-	-	Indeterminado
	4	E	COCO	+	-	+	<i>Staphylococcus</i>
	5	E	NI	NI	+	-	NI*
	6	PE	COCO	+	+	-	<i>Micrococcus</i>
	7	PE	BACILO	+	+	+	Indeterminado
	8	PE	COCO	+	-	-	<i>Streptococcus</i>
	9	PE	COCO	+	-	-	<i>Streptococcus</i>
	10	PE	COCO	-	-	-	<i>Neisseria spp.</i>
D2	1	E	NI	NI	NI	NI	Indeterminado
	2	E	BACILO	-	+	+	Indeterminado
	3	E	BACILO	-	-	-	<i>Neisseria spp.</i>
	4	E	COCO	+	-	+	<i>Staphylococcus</i>
	5	E	COCO BACILO	-	+	+	Indeterminado
	6	PE	COCO BACILO	+	-	-	Indeterminado
	7	PE	COCO	+	-	-	<i>Streptococcus</i>
	8	PE	COCO	+	-	-	<i>Streptococcus</i>
	9	PE	NI	NI	NI	NI	Indeterminado
	10	PE	COCO	+	-	-	<i>Streptococcus</i>
D7	1	E	COCO	+	-	+	<i>Staphylococcus</i>
	2	E	BACILO	+	-	+	Indeterminado
	3	E	COCO BACILO	+	-	+	Indeterminado
	4	E	COCO	-	-	+	Indeterminado
	5	E	COCO BACILO	-	+	+	Indeterminado
	6	PE	COCO	-	-	+	Indeterminado
	7	PE	COCO	-	+	-	<i>Neisseria spp.</i>
	8	PE	COCO	+	-	-	<i>Streptococcus</i>
	9	PE	COCO	+	-	-	<i>Streptococcus</i>
	10	PE	COCO	+	-	+	<i>Staphylococcus</i>

*Ni Não foi possível identificar esta característica

Tabela 2. Identificação presuntiva de bactérias através da análise morfotintorial, oxidase e catalase. Bactérias obtidas por cultivo em agar MRS D0 (estado basal), D2 (48 horas após a injeção de P4) e D7 (48 horas após a injeção de BE).

DIA	ANIMAL	GRUPO	MORFOLOGIA	GRAM	OXIDASE	CATALASE	ID
D0	1	E	NI	NI	NI	NI	NI*
	2	E	COCO	-	+	-	<i>Neisseria spp.</i>
	3	E	COCO	+	-	-	<i>Streptococcus</i>
	4	E	COCO	+	-	-	<i>Streptococcus</i>
	5	E	COCO	+	-	-	<i>Streptococcus</i>
	6	PE	COCO	+	-	-	<i>Streptococcus</i>
	7	PE	COCO	-	-	-	<i>Neisseria spp.</i>
	8	PE	COCO	+	-	-	<i>Streptococcus</i>
	9	PE	COCO BACILO	-	+	-	<i>Neisseria spp.</i>
	10	PE	COCO BACILO	+	-	-	<i>Lactobacillus</i>
D2	1	E	COCO	+	+	-	<i>Micrococcus</i>
	2	E	COCO	-	-	-	<i>Neisseria spp.</i>
	3	E	COCO BACILO	+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
	4	E	COCO	+	-	-	<i>Streptococcus</i>
	5	E	COCO	+	-	-	<i>Streptococcus</i>
	6	PE	COCO BACILO	+	-	-	<i>Lactobacillus</i>
	7	PE	COCO BACILO	-	-	-	<i>Gardnerella spp.</i>
	8	PE	NI	NI	NI	NI	Indeterminado
	9	PE	COCO BACILO	+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
	10	PE	COCO BACILO	+	+	-	<i>Lactobacillus</i>
D7	1	E	COCOBACILO	+	-	-	<i>Lactobacillus</i>
	2	E	COCO	-	+	NI	Indeterminado
	3	E	COCO	+	-	-	<i>Streptococcus</i>
	4	E	COCO	+	-	NI	Indeterminado
	5	E	COCO	+	+	-	<i>Micrococcus</i>
	6	PE	COCO	+	-	-	<i>Streptococcus</i>
	7	PE	COCO BACILO	+	-	-	<i>Lactobacillus</i>
	8	PE	NI	NI	NI	NI	Indeterminado
	9	PE	COCO BACILO	+	-	-	<i>Lactobacillus</i>
	10	E	COCO BACILO	+	-	-	<i>Lactobacillus</i>

*NI Não foi possível identificar esta característica

Tabela 3. Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) em meio ágar sangue e ágar MRS (*Lactobacillus* spp.). Análise quantitativa comparando amostras do dia D-0 (120 horas antes de 1 mg de benzoato de estradiol - EB - injeção; D5), D2 (48 horas após a injeção de P4) e D7

Dia	ANIMAL	Grupo	SANGUE	MRS
D0	1	E	53,00	2,33
	2	E	38,67	5,00
	3	E	0,67	1,00
	4	E	0,67	0,67
	5	E	282,33	0,33
	6	PE	2,33	1,67
	7	PE	3333,33	4,33
	8	PE	.	4,00
	9	PE	1,33	0,67
	10	PE	0,67	4,00
D2	1	E	.	6,00
	2	E	.	0,67
	3	E	1333,33	1837,33
	4	E	333,33	11,33
	5	E	40,67	21,33
	6	PE	129,50	3333,33
	7	PE	3000,00	3,00
	8	PE	28,67	0,67
	9	PE	1,00	6,00
	10	PE	36,00	176,00
D7	1	E	133333,33	1989,00
	2	E	0,67	0,33
	3	E	4000,00	93333,33
	4	E	.	166,67
	5	E	44,33	582,00
	6	PE	326666,67	123333,33
	7	PE	166666,67	3,33
	8	PE	1,00	0,00
	9	PE	2,33	3,33
	10	PE	27,33	185,67

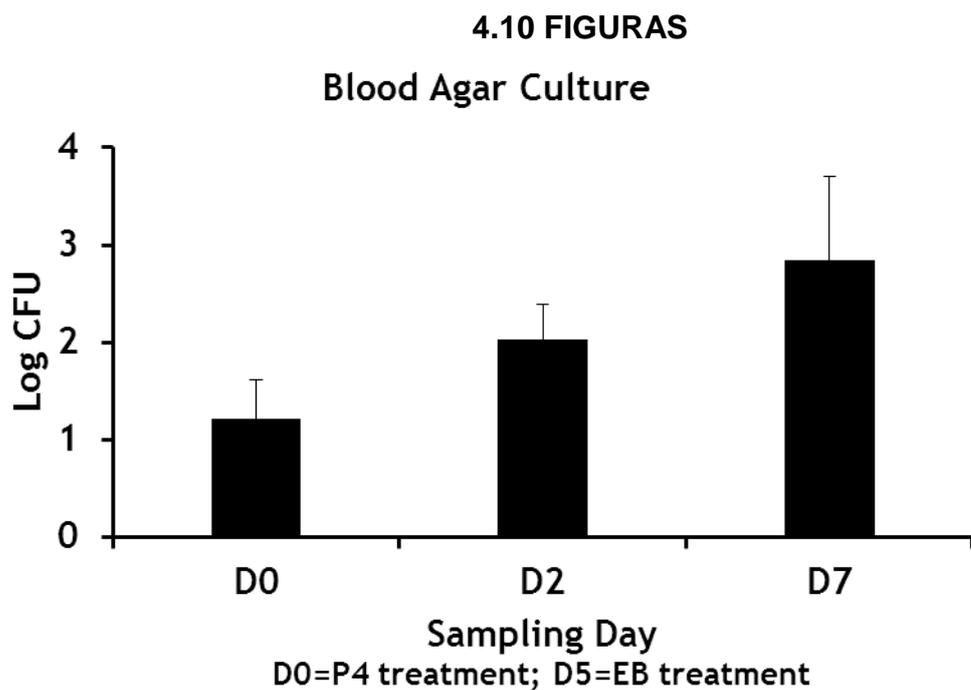


Figura 2. Crescimento de bactérias em meio ágar sangue (microrganismos totais, aeróbicos e anaeróbicos facultativos) em resposta à progesterona apenas ou progesterona seguida de benzoato de estradiol. Unidades formadoras de colônia (CFU) transformadas por Log₂ (média ± erro padrão da média) no D-0, D2 e D7. N = 10

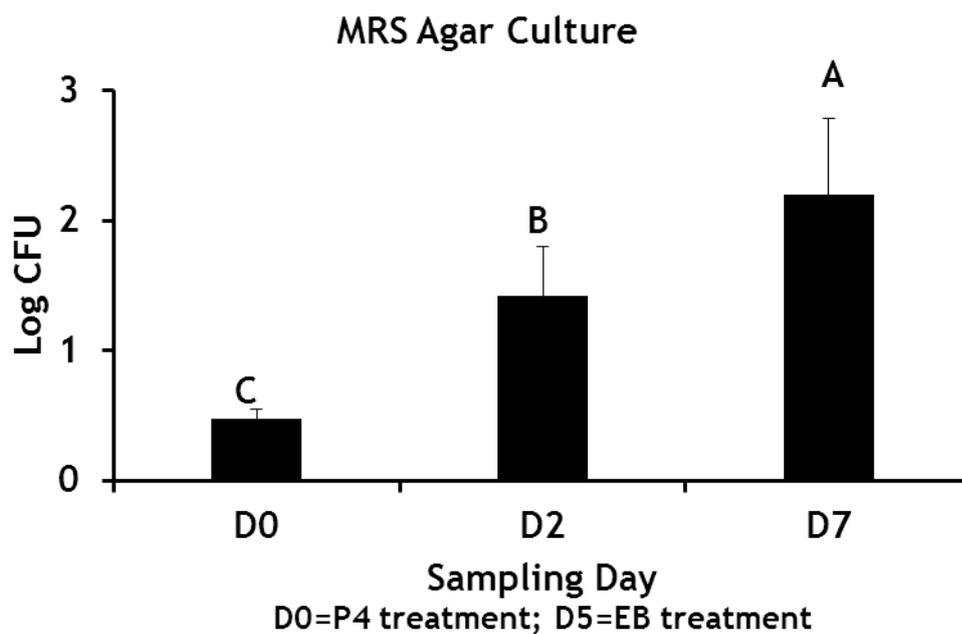


Figura 3. Crescimento de bactérias em meio ágar MRS (bactérias ácido lácticas; BAL) em resposta à progesterona apenas ou progesterona seguida de benzoato de estradiol. Unidades formadoras de colônia (CFU) transformadas por Log₂ (média ± erro padrão da média) no D-0, D2 e D7. N = 10. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

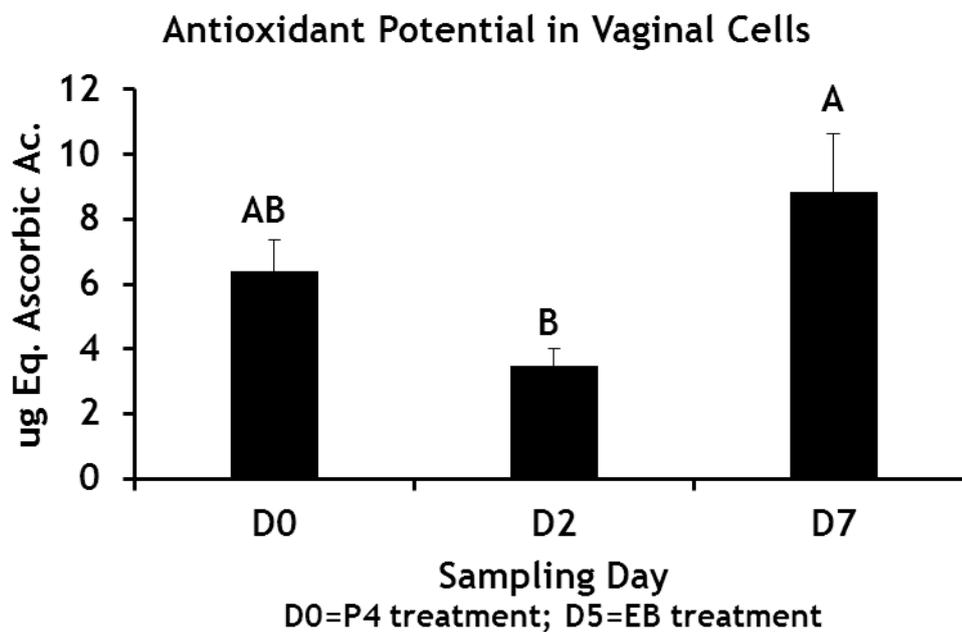


Figura 4. Capacidade antioxidante redutora férrico das células do epitélio vaginal de ovelhas expostas à progesterona apenas ou a progesterona seguida de benzoato de estradiol. Micrograma equivalente de ácido ascórbico/ μ g de proteína do lavado (média \pm erro padrão da média) no D-0, D2 e D7. N = 10. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

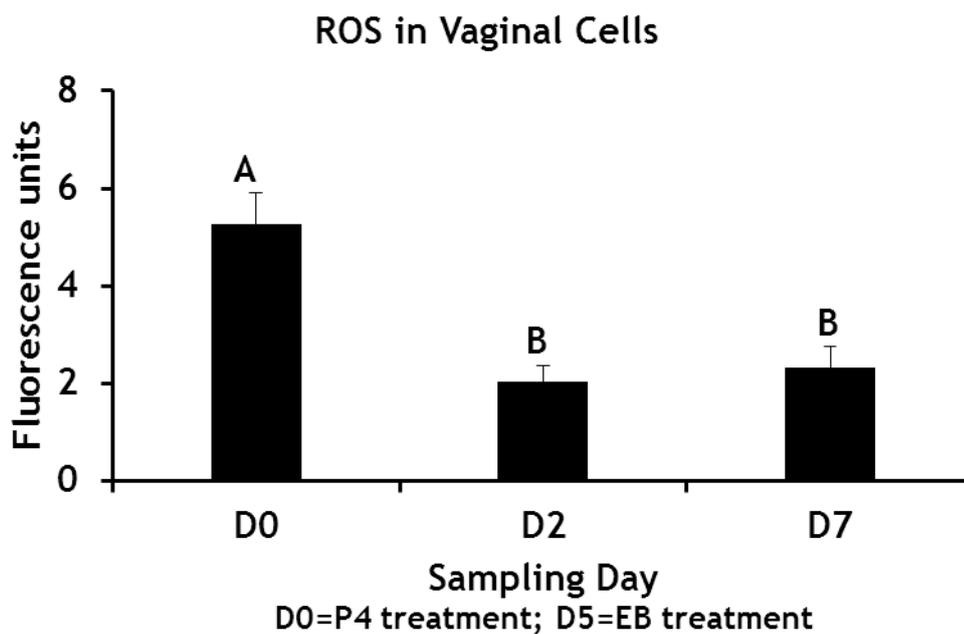


Figura 5. Produção de ROS das células do epitélio vaginal de ovelhas expostas à progesterona apenas ou a progesterona seguida de benzoato de estradiol. Unidades arbitrárias de fluorescência/ μ g de proteína do lavado (média \pm erro padrão da média) no D-0, D2 e D7. N = 10. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

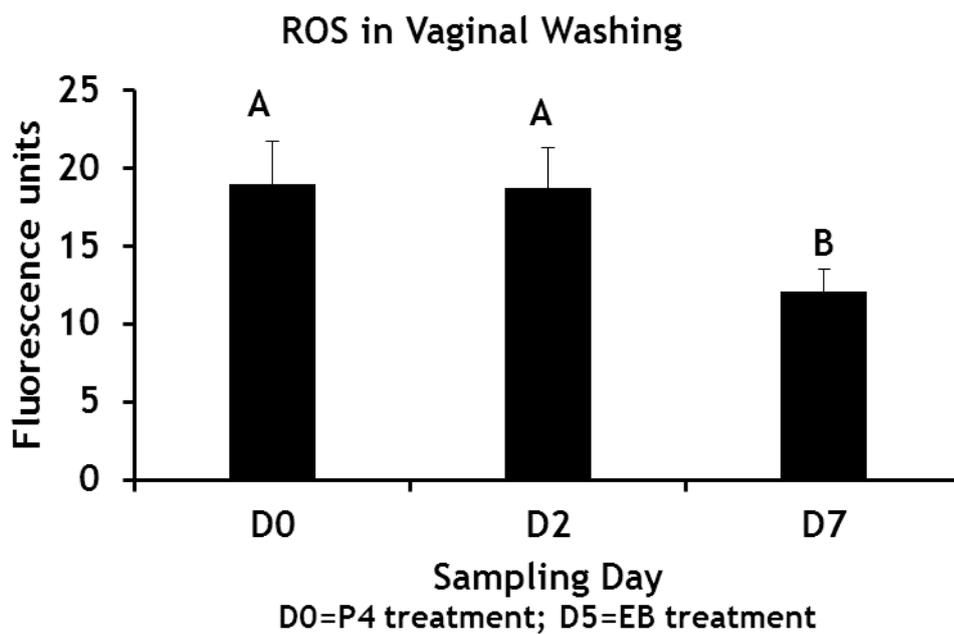


Figura 6. Produção de ROS do lavado vaginal de ovelhas expostas à progesterona apenas ou a progesterona seguida de benzoato de estradiol. Unidades arbitrárias de fluorescência/ μg de proteína do lavado (média \pm erro padrão da média) no D-0, D2 e D7. N = 10. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença estatística ($p \leq 0,05$).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção de alimentos necessita ser ampliada no mundo, e para sermos mais eficientes neste quesito é de fundamental importância conhecer a microbiota que habita e influencia diferentes compartimentos orgânicos. Neste contexto, os *Lactobacillus* são bactérias que interagem em simbiose com o hospedeiro, e sua presença ou ausência na microbiota local pode influenciar o estado de saúde do mesmo, e seu crescimento pode ser modulado pelas flutuações hormonais derivadas de diferentes processos fisiológicos, como por exemplo, aqueles associados à ciclicidade reprodutiva. Mais especificamente, relatamos a capacidade do estrógeno em modular este ambiente, tanto no controle das populações de BAL, como na regulação do potencial REDOX. Este estudo pode servir não só para pesquisa em animais domésticos, mas também para estudos em humanos, estudos voltados à saúde pública, já que a ovelha é um modelo animal de estudo que pode ser extrapolado a outras espécies.

5. REFERÊNCIAS

AGARWAL, Ashok; GUPTA, Sajal; SHARMA, Rakesh K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 3, n. 1, p. 28, 2005.

AMABEBE, Emmanuel; ANUMBA, Dilly OC. The vaginal microenvironment: the physiologic role of lactobacilli. **Frontiers in medicine**, v. 5, p. 181, 2018.

AMOSS, Max et al. Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 44, n. 1, p. 205-210, 1971.

Anukam, K.C., Osazuwa, E., Osemene, G.I., Ehigiagbe, F., Bruce, A.W., Reid, G., 2006. Clinical study comparing probiotic Lactobacillus GR-1 and RC-14 with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis. **Microbes Infect** 8, 2772-2776..

ARMSTRONG, D. G., et al. "Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system." **Biology of reproduction** 64.6: 1624-1632. (2001).

AYEHUNIE, Seyoum et al. Characterization of a hormone-responsive organotypic human vaginal tissue model: morphologic and immunologic effects. **Reproductive sciences**, v. 22, n. 8, p. 980-990, 2015.

AYYASH, M., Al-Dhaheri, A. S., Al Mahadin, S., Kizhakkayil, J., & Abushelaibi, A. In vitro investigation of anticancer, antihypertensive, antidiabetic, and antioxidant activities of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. **Journal of dairy science**, 101(2), 900-911. 2018.

BENZIE, Iris FF; STRAIN, John J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BICUDO, S. D. et al. Gargalos tecnológicos na reprodução assistida em ovinos: o estado da arte. **Rev. bras. reprod. anim**, p. 167-181, 2009.

BO, Walter J. The effect of progesterone and progesterone-estrogen on the glycogen deposition in the vagina of the squirrel monkey. **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 107, n. 4, p. 524-530, 1970.

Bosma, E.F., Forster, J., Nielsen, A.T., 2017. Lactobacilli and pediococci as versatile cell factories - Evaluation of strain properties and genetic tools. **Biotechnol Adv** 35, 419-442.

Brown, J.M., Hazen, S.L., 2017. Targeting of microbe-derived metabolites to improve human health: The next frontier for drug discovery. **J Biol Chem** 292, 8560-8568.

BROWN, Richard G. et al. Establishment of vaginal microbiota composition in early pregnancy and its association with subsequent preterm prelabor rupture of the fetal membranes. **Translational Research**, v. 207, p. 30-43, 2019.

CAO, W., Chin, Y., Chen, X., Mi, Y., Xue, C., Wang, Y., & Tang, Q. The role of gut microbiota in the resistance to obesity in mice fed a high fat diet. **International journal of food sciences and nutrition**, 1-11. 2019.

CEREZETTI, Marcela Bortoletto et al. ALTERNATIVAS PARA SUBSTITUIÇÃO DO USO DE IMPLANTES VAGINAIS DE PROGESTERONA NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM BOVINOS. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 6, n. 2, p. 416-433, 2019.

CORNELLI, Umberto et al. Analysis of oxidative stress during the menstrual cycle. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 11, n. 1, p. 74, 2013.

COSTA, R. L. D. da. Aspectos Reprodutivos das Ovelhas. **Revista Pesquisa e Tecnologia**. v.4, n.1, 2007.

CRUICKSHANK, R.; SHARMAN, A. The biology of the vagina in the human subject. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 41, n. 2, p. 208-226, 1934.

Daliri, E.B., Lee, B.H., Oh, D.H., 2017. Current Perspectives on Antihypertensive Probiotics. **Probiotics Antimicrob Proteins** 9, 91-101.

DIZZELL, S., et al. "Protective Effect of Probiotic Bacteria and Estrogen in Preventing HIV-1-Mediated Impairment of Epithelial Barrier Integrity in Female Genital Tract." **Cells** 8.10: 1120. (2019)

DOERFLINGER, Sylvie Y.; THROOP, Andrea L.; HERBST-KRALOVETZ, Melissa M. Bacteria in the vaginal microbiome alter the innate immune response and barrier properties of the human vaginal epithelia in a species-specific manner. **The Journal of infectious diseases**, v. 209, n. 12, p. 1989-1999, 2014.

EDWARDS, S.J., Juengel, J.L., O'Connell, A.R., Johnstone, P.D., Farquhar, P.A., DAVIS, G.H. Attainment of puberty by ewes in the first years of live is associated with improved reproductive performance at 2 years of age. **Small Ruminant Research**, 123, 118–123. 2015.

ELIAS, Carol F. Leptin action in pubertal development: recent advances and unanswered questions. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 1, p. 9-15, 2012.

ESCHENBACH, David A., et al. "Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora." **Clinical Infectious Diseases** 30.6: 901-907.2000.

FAO. **The future of food and agriculture** – Trends and challenges. Rome. 2017.

FARAGE, Miranda; MAIBACH, Howard. Lifetime changes in the vulva and vagina. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 273, n. 4, p. 195-202, 2006.

FERREIRA, A.L.A., L.S, M. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira** 43, 61- 68. 1997.

FERREIRA, E. M. et al. "Implicações de fontes de carboidratos e taxa de ganho de peso corporal na puberdade em ovelhas em condições climáticas tropicais". **Saúde e produção de animais tropicais**: 1-6. 2019.

FOSTER, DOUGLAS L.; RYAN, KATHLEEN D. Endocrine mechanisms governing transition into adulthood: a marked decrease in inhibitory feedback action of estradiol on tonic secretion of luteinizing hormone in the lamb during puberty. **Endocrinology**, v. 105, n. 4, p. 896-904, 1979.

FOX, Chelsea; EICHELBERGER, Kacey. Maternal microbiome and pregnancy outcomes. **Fertility and sterility**, v. 104, n. 6, p. 1358-1363, 2015.

FRANASIAK, Jason M.; SCOTT JR, Richard T. Reproductive tract microbiome in assisted reproductive technologies. **Fertility and sterility**, v. 104, n. 6, p. 1364-1371, 2015.

FRISCH, Rose E. Body fat, puberty and fertility. **Biological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 161-188, 1984.

FRISCH, Rose E.; REVELLE, Roger. Height and weight at menarche and a hypothesis of menarche. **Archives of Disease in Childhood**, v. 46, n. 249, p. 695-701, 1971.

GLANTZOUNIS, Georgios K. et al. The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia-reperfusion injury: A review. **Liver Transplantation**, v. 11, n. 9, p. 1031-1047, 2005.

GOODMAN, Robert L. et al. Kisspeptin, neurokinin B, and dynorphin act in the arcuate nucleus to control activity of the GnRH pulse generator in ewes. **Endocrinology**, v. 154, n. 11, p. 4259-4269, 2013.

HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M. R.; WAHID, H. Ovinos e caprinos. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. (Ed.). **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole. p. 173-192. 2004.

HALLIWELL, Barry. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?. **Lancet (British edition)**, v. 344, n. 8924, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, Barry. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of neurochemistry**, v. 59, n. 5, p. 1609-1623, 1992.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. [1] Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1990. p. 1-85.

HAN, Cong et al. Study on the antihypertensive mechanism of *Astragalus membranaceus* and *Salvia miltiorrhiza* based on intestinal Flora-host metabolism. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, 2019.

HARMAN, D. Envelhecimento: uma teoria baseada em radicais livres e química de radiação. **Journal of Gerontology**, 11 (3), 298-300. 1956.

HOOPER, Lora V., Dan R. Littman, and Andrew J. Macpherson. "Interactions between the microbiota and the immune system." **Science** 336.6086: 1268-1273. 2012.

HOU, Qihang et al. The research progress on intestinal stem cells and its relationship with intestinal microbiota. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 599, 2017.

IATSENKO, Igor; BOQUETE, Jean-Philippe; LEMAITRE, Bruno. Microbiota-derived lactate activates production of reactive oxygen species by the intestinal NADPH oxidase Nox and shortens Drosophila lifespan. **Immunity**, v. 49, n. 5, p. 929-942. e5, 2018.

IRWIN, Ronald W. et al. Progesterone and estrogen regulate oxidative metabolism in brain mitochondria. **Endocrinology**, v. 149, n. 6, p. 3167-3175, 2008.

KADIISKA MB, et. al. Biomarkers of oxidative stress study V: ozone exposure of rats and its effect on lipids, proteins, and DNA in plasma and urine. **Free Radic Biol Med** 61:408–415.2013.

KARKI, Kanchan et al. An assessment of oxidative damage and non-enzymatic antioxidants status alteration in relation to disease progression in breast diseases. **Medical Sciences**, v. 4, n. 4, p. 17, 2016.

KINDINGER, Lindsay M. et al. The interaction between vaginal microbiota, cervical length, and vaginal progesterone treatment for preterm birth risk. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 6, 2017.

Koneman, E. W. Diagnóstico Microbiológico, texto e atlas colorido. 6ª Ed. Guanabara Koogan. 1760p, 2008.

KOVACHEV, Stefan Miladinov. Cervical cancer and vaginal microbiota changes. **Archives of microbiology**, p. 1-5, 2019.

KOWALTOWSKI AJ, Vercesi AE. Dano mitocondrial induzido por condições de estresse oxidativo. **Radic livre Biol Med**. 1999; 26 (3-4): 463–471.

LEE, Ga Young; HAN, Sung Nim. The role of vitamin E in immunity. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1614, 2018.

LEUNG, Daniel H.; YIMLAMAI, Dean. The intestinal microbiome and paediatric liver disease. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, v. 2, n. 6, p. 446-455, 2017.

LIN, Xiangna et al. Lactic acid bacteria with antioxidant activities alleviating oxidized oil induced hepatic injury in mice. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2684, 2018.

LOETCHUTINAT, Chatchanok et al. Spectrofluorometric determination of intracellular

levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate assay. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 72, n. 2-3, p. 323-331, 2005.

LÓPEZ-MAZZ, C., et al. "Effect of early shearing during gestation on the productive and reproductive behavior of female sheep offspring in their first 18 months of age." **Animal** (2019): 1-7.

LU, JIAN-MING et al. "Mecanismos químicos e moleculares de antioxidantes: abordagens experimentais e sistemas modelo." **Jornal de medicina celular e molecular** vol. 14,4 (2010): 840-60.

LYKKESFELDT, Jens et al. "Vitamina C." **Avanços na nutrição (Bethesda, Maryland)** vol. 5,1 16-8. 1 de janeiro de 2014, doi: 10.3945 / an.113.005157

MACHADO, R. et al. Ovarian function in Nelore (*Bos taurus indicus*) cows after post-ovulation hormonal treatments. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 798-804, 2008.

MACHADO, R. **Ovinocultura: Controle da verminose, mineralização, reprodução e cruzamentos na Embrapa Pecuária Sudeste**. 1. ed. São Carlos: 2007. p.28-38.

MACIEL, R. G., Becker, C., & Neske, M. Z. Os mercados da ovinocultura na pecuária familiar: proposições analíticas da Nova Sociologia Econômica. **Revista de Economia e Sociologia Rural, (AHEAD)**. 2019.

MÄNDAR, Reet, et al. "Complementary seminovaginal microbiome in couples." **Research in microbiology** 166.5: 440-447.2015.

MARSICO, T. V. **Análise da população de bactérias ácido-láticas (bal) vaginais cultiváveis em resposta ao estrógeno e sua influência no potencial oxidante e antioxidante do ambiente vaginal em ovis aries**. Dissertação. Uruguaiana, RS. 2019.

MARTINS, C. F. et al. **Importância da libido na identificação de carneiros nativos de Mato Grosso do Sul, Brasil, de alta performance sexual (ABNS)**. In: 45° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. Lavras: UFLA. 2008.

MARX, PRESTON A. et al. Progesterone implants enhance SIV vaginal transmission and early virus load. **Nature medicine**, v. 2, n. 10, p. 1084-1089, 1996.

MATSUO, H. et al. Structure of the porcine LH-and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 43, n. 6, p. 1334-1339, 1971.

MELLO FILHO, A. C.; HOFFMANN, M. E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemical Journal**, v. 218, n. 1, p. 273, 1984.

MENDLING, Werner. Vaginal microbiota. In: **Microbiota of the human body**. Springer, Cham, 2016. p. 83-93.

MILLER, E. A. et al. Ovarian cycling and reproductive state shape the vaginal microbiota in wild baboons. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 8, 2017.

MIRMONSEF, P. et al. Free glycogen in vaginal fluids is associated with Lactobacillus colonization and low vaginal pH. **PLoS one**, v. 9, n. 7, 2014.

MITCHELL, Caroline M. et al. Vaginal microbiota and genitourinary menopausal symptoms: a cross sectional analysis. **Menopause** (New York, NY), v. 24, n. 10, p. 1160, 2017

MOORE, Donald E. et al. Bacteria in the transfer catheter tip influence the live-birth rate after in vitro fertilization. **Fertility and sterility**, v. 74, n. 6, p. 1118-1124, 2000.

MOR, Amir; DRIGGERS, Paul H.; SEGARS, James H. Molecular characterization of the human microbiome from a reproductive perspective. **Fertility and sterility**, v. 104, n. 6, p. 1344-1350, 2015.

MORAES, J. C. F. et al. Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda, p. 25-55.2002.

NAKANO, Fabiana Y.; LEÃO, Rogério de Barros F.; ESTEVES, Sandro C. Insights into the role of cervical mucus and vaginal pH in unexplained infertility. **MedicalExpress**, v. 2, n. 2, 2015.

NASIOUDIS, Dimitrios et al. α -Amylase in vaginal fluid: association with conditions favorable to dominance of Lactobacillus. **Reproductive Sciences**, v. 22, n. 11, p. 1393-1398, 2015.

NIETO, CR, Ferguson, MB, Briegel, JR, Hedger, MP, Martin, GB e Thompson, AN. Crescimento pré-puberal, acúmulo de músculo e gordura em ovinos machos e fêmeas - relações com concentrações de hormônios metabólicos, época da puberdade e resultados reprodutivos. **Reprodução em Animais Domésticos**.2019.

NYACHIEO, A. et al. Vaginal histological changes of the baboon during the normal menstrual cycle and pregnancy. **East African medical journal**, v. 86, n. 4, 2009.

PAPADIMITRIOU, Konstantinos et al. "Stress Physiology of Lactic Acid Bacteria." **Microbiology and molecular biology reviews** : MMBR vol. 80,3 837-90. 27 Jul. 2016, doi:10.1128/MMBR.00076-15.

PELZER, Elise et al. Maternal health and the placental microbiome. **Placenta**, v. 54, p. 30-37, 2017.

.

PORTO, Maria Carolina W. et al. *Pediococcus* spp.: an important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. **Biotechnology Advances**, v. 35, n. 3, p. 361-374, 2017.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Artmed Editora, 2005.

RAINERI, C., Nunes, B.C., Gameiro, A.H., 2015. Technological characterization of sheep production systems in Brazil. **Anim Sci J** 86, 476-485.

RAMIREZ DV, McCann SM, 1963: Comparison of the regulation of luteinizing hormone (LH) secretion in immature and adult rats. **Endocrinology** 72, 452-464.

RECINE, Nadia et al. Restoring vaginal microbiota: biological control of bacterial vaginosis. A prospective case-control study using *Lactobacillus rhamnosus* BMX 54 as adjuvant treatment against bacterial vaginosis. **Archives of gynecology and obstetrics**, v. 293, n. 1, p. 101-107, 2016.

REID, Gregor. The development of probiotics for women's health. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 269-277, 2017.

RELMAN, David A. "Microbiologia: aprendendo sobre quem somos". **Nature** 486.7402: 194.2012.

ROSA, H. J. D., & BRYANT, M. J. (2003). **Seasonality of reproduction in sheep**. Small Ruminant Research. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(03\)00038-5](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(03)00038-5)

SAUTTER, R. L., and WILLIAM J. Brown. "Sequential vaginal cultures from normal young women." **Journal of clinical microbiology** 11.5 (1980): 479-484.

SENDER, Ron, Shai Fuchs, and Ron Milo. "Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body." **PLoS biology** 14.8 (2016): e1002533.

SERVIDDIO, Gaetano et al. Modulation of endometrial redox balance during the menstrual cycle: relation with sex hormones. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 6, p. 2843-2848, 2002.

SILVA, APSP, et al. Indústria de ovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil: descrição do sistema de produção e os principais aspectos sanitários e reprodutivos. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 33, 6.

SIROTA, Ido; ZAREK, Shvetha M.; SEGARS, James H. Potential influence of the microbiome on infertility and assisted reproductive technology. In: **Seminars in reproductive medicine**. NIH Public Access, 2014. p. 35.

SMITH, C. D. M., Gong, M., Andrew, A. K., Russ, B. N., Ge, Y., Zadeh, M., ... & Moore, J. M. Composition of the gut microbiota transcends genetic determinants of malaria infection severity and influences pregnancy outcome. **EbioMedicine**. 2019.

SMITH, Janine; STEINEMANN, Thomas L. Vitamin A deficiency and the eye. **International ophthalmology clinics**, v. 40, n. 4, p. 83-91, 2000.

SPEAR, Gregory T. et al. Human α -amylase present in lower-genital-tract mucosal fluid processes glycogen to support vaginal colonization by *Lactobacillus*. **The Journal of infectious diseases**, v. 210, n. 7, p. 1019-1028, 2014.

SWARTZ, J. D., et al. "Characterization of the vaginal microbiota of ewes and cows reveals a unique microbiota with low levels of lactobacilli and near-neutral pH." **Frontiers in veterinary science** 1 (2014): 19.

GAROUSI, Massoud Talebkhan et al. Reproductive performance in out-of-breeding season of fatty ewes using implant norgestomet with or without PMSG. **Tropical animal health and production**, v. 44, n. 5, p. 965-968, 2012.

TAN, Huiqing et al. Progesterone receptor-A and-B have opposite effects on proinflammatory gene expression in human myometrial cells: implications for

progesterone actions in human pregnancy and parturition. **The Journal of Clinical Endocrinology**, v. 97, n. 5, p. E719-E730, 2012.

TEIXEIRA, K. R. **Efeito das proteínas do soro do leite no estresse oxidativo em animais submetidos ao exercício físico de alta intensidade**. Dissertação, Uruguaiana. 2013.

UENOYAMA, Yoshihisa et al. Central mechanism controlling pubertal onset in mammals: a triggering role of kisspeptin. **Frontiers in endocrinology**, v. 10, p. 312, 2019.

UNGERFELD, R.; Silva, L. "The presence of normal vaginal flora is necessary for normal sexual attractiveness of estrous ewes." **Applied Animal Behaviour Science** 93.3-4 (2005): 245-250.

VAN DE WIJGERT JANNEKE, H. H. M. et al. Intermittent Lactobacilli-containing Vaginal Probiotic or Metronidazole Use to Prevent Bacterial Vaginosis Recurrence: A Pilot Study Incorporating Microscopy and Sequencing. **Scientific Reports (Nature Publisher Group)**, v. 10, n. 1, 2020.

WAGNER, R. Doug; JOHNSON, Shemia J. Probiotic lactobacillus and estrogen effects on vaginal epithelial gene expression responses to *Candida albicans*. **Journal of biomedical science**, v. 19, n. 1, p. 58, 2012.

WYPYCH, Tomasz P.; MARSLAND, Benjamin J. Diet hypotheses in light of the microbiota revolution: new perspectives. **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 537, 2017.

YE, G., et. al (2019). The Gut Microbiota in Women Suffering from Gestational Diabetes Mellitus with the Failure of Glycemic Control by Lifestyle Modification. **Journal of diabetes research**, 2019.

ZOZAYA, Marcela et al. Bacterial communities in penile skin, male urethra, and vaginas of heterosexual couples with and without bacterial vaginosis. **Microbiome**, v. 4, n. 1, p. 16, 2016.