

NOVOS CONHECIMENTOS SOBRE A FLORA BACTERIANA VAGINAL

IARA MORENO LINHARES^{1*}, PAULO CESAR GIRALDO², EDMUND CHADA BARACAT³

Trabalho realizado na Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, São Paulo, SP

RESUMO

O objetivo desta revisão foi apresentar os novos conhecimentos sobre o ecossistema vaginal, enfatizando os métodos não cultiváveis de identificação microbiana (amplificação de genes), as várias espécies de *Lactobacillus* que podem compor a flora vaginal e a interação desta com os mecanismos locais de imunidade inata e adquirida, dependentes dos constituintes genéticos. Foram pesquisados no Medline (Pubmed) os artigos relacionados ao tema publicados entre 1997 e 2009, selecionando-se apenas os considerados relevantes. A utilização de técnicas não cultiváveis (técnicas de amplificação de genes) tem possibilitado o melhor conhecimento sobre a composição do ecossistema vaginal. Na maioria das mulheres no menacme predominam na vagina uma ou mais espécies de *Lactobacillus*: *L. crispatus*, *L. inners* e *L. gasseri*. Entretanto, em outras mulheres aparentemente saudáveis pode haver deficiência ou mesmo ausência de *Lactobacillus*, que são substituídos por outras bactérias produtoras de ácido láctico: espécies de *Atopobium*, *Megasphaera* e/ou *Leptotrichia*. A infecção e/ou a proliferação de bactérias patogênicas na vagina são suprimidas pela produção de ácido láctico, por produtos gerados pelas bactérias e pela atividade local das imunidades inata e adquirida. As células epiteliais vaginais produzem diversos componentes com atividade antimicrobiana. Tais células ainda possuem receptores de membrana ("Toll-like receptors") que reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos. O reconhecimento leva à produção de citocinas pró-inflamatórias e à estimulação da imunidade antígeno-específica. A produção de anticorpos IgG e IgA também pode ser iniciada na endocérvice e na vagina em resposta à infecção. Conclui-se que a composição da flora vaginal e os mecanismos de imunidade representam importantes mecanismos de defesa. Os critérios de "flora normal" e "flora anormal" devem ser revistos; os polimorfismos genéticos podem explicar variações na composição da flora. Ressalta-se a necessidade de que tais conhecimentos sejam incorporados à prática clínica do ginecologista e obstetra para o aprimoramento do cuidado às pacientes.

*Correspondência:

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 - 10º andar - sala 10.166 - Disciplina de Ginecologia
CEP: 05403-900
São Paulo - SP

UNITERMOS: Amplificação de genes. *Lactobacillus*. *Gardnerella vaginalis*. Candidíase vulvovaginal. Imunidade inata. Polimorfismo genético.

INTRODUÇÃO

Anatomicamente o trato genital feminino é constituído por uma sucessão de cavidades (tubas de Falópio, cavidade uterina, endocérvice, vagina) que se comunicam com o exterior através da fenda vulvar. Tal estrutura permite a exteriorização do fluxo menstrual e a passagem do feto no momento do parto; inversamente, possibilita o coito e também a entrada de micro-organismos patogênicos, que podem potencialmente prejudicar o processo de reprodução. A microflora vaginal representa sem dúvida um dos mais importantes mecanismos de defesa da função reprodutora, mantendo o meio saudável e impedindo a proliferação de micro-organismos estranhos à mesma.

Os primeiros estudos sobre a flora foram realizados por Doderlein, que identificou *Lactobacillus* como constituintes da flora

saudável. Desde então os diversos componentes do ecossistema vaginal têm sido observados ao microscópio e, posteriormente, identificados através de técnicas específicas de cultura¹. Entretanto, mais recentemente, técnicas de identificação de bactérias independentes dos meios de cultura têm revolucionado o estudo dos micro-organismos. A aplicação de técnicas de amplificação, clonagem e subsequente análise de sequências dos genes bacterianos (genes que codificam para o rRNA 16 S bacteriano) em amostras de fluido vaginal tem possibilitado a identificação da maioria das espécies comuns de *Lactobacillus* e de outros micro-organismos. Assim, tais técnicas têm demonstrado que os *Lactobacillus sp* não correspondem sempre à espécie bacteriana dominante na vagina de mulheres saudáveis. Além disso, habitantes do meio vaginal até então desconhecidos tem sido identificados^{2,4}.

1. Pós-doutorado - Coordenadora do Setor de Imunologia Genética e Infecções do Trato Reprodutivo da Disciplina de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, São Paulo, SP

2. Livre-docente - Professor Associado do Departamento de Tocoginecologia da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas, SP

3. Livre-docente - Professor Titular da Disciplina de Ginecologia do Departamento de Obstetria e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP, São Paulo, SP

Bactérias produtoras de ácido láctico

Embora as espécies bacterianas vaginais de mulheres saudáveis no menarca tenham sido inicialmente identificadas como *Lactobacillus acidophilus*, tal conhecimento representa uma simplificação, já que em mulheres cuja flora é dominada por *Lactobacillus*, as espécies mais frequentemente detectadas através de amplificação gênica são *L. crispatus* e *L. inners*^{2,4} ou *L. crispatus* e *L. gasseri*³. Outras espécies como *L. jensinii*, *L. gallinarum* e *L. vaginalis* também têm sido identificadas em algumas mulheres. Um estudo sobre a flora vaginal realizado em três continentes e utilizando métodos de análise de genes bacterianos demonstrou que as espécies dominantes eram as mesmas em cada uma das regiões: *L. crispatus*, *L. gasseri* e *L. jensinii*⁵. Além disso, o mesmo estudo verificou que, em algumas mulheres, o ecossistema normal era mantido na ausência de *Lactobacillus*; em uma mulher identificou-se o *Atopobium vaginae* como o micro-organismo dominante na flora e, em duas outras mulheres, as bactérias *Atopobium*, *Megasphaera* e *Leptotrichia* eram todas produtoras de ácido láctico, de maneira semelhante aos *Lactobacillus*^{2,6}. Portanto, o ambiente ácido da vagina, reconhecido como importante mecanismo de defesa contra a proliferação de patógenos, pode ser mantido por outras bactérias, não apenas pelos *Lactobacillus*. É possível que quando os *Lactobacillus* não sejam capazes de predominar no meio vaginal por qualquer razão outras bactérias produtoras de ácido láctico passem a ocupar o seu nicho. Deve-se ressaltar que as bactérias *Megasphaera* e *Leptotrichia* são também capazes de produzir metabólitos com odor desagradável. Assim, a detecção de odor vaginal em mulheres que não possuam flora vaginal dominada por *Lactobacillus* não é conclusiva para fazer o diagnóstico de entidades patológicas como, por exemplo, a vaginose bacteriana, especialmente em mulheres assintomáticas. De maneira semelhante, a morfologia variável do *Atopobium*, variando de cocos elípticos a organismos em forma de bacilos curvos, ocorrendo aos pares ou em cadeias³, torna sua detecção pela bacterioscopia pelo método de Gram ou pelo exame a fresco problemático, pois tal micro-organismo pode ser facilmente confundível com outras bactérias associadas ao quadro de vaginose bacteriana.

Biofilmes

Uma das dificuldades encontradas para a caracterização mais abrangente da flora microbiana vaginal é a presença de biofilmes. Biofilmes são formados por colônias de micro-organismos que aderem entre si e recobrem uma superfície sólida. Os biofilmes já foram identificados nas superfícies das células vaginais, sendo mais conhecidos em mulheres com vaginose bacteriana, onde espécies de *Gardnerella vaginalis* e *Atopobium* predominam⁷. Entretanto, aspecto a ser interessante a ser considerado é o estudo dos biofilmes em mulheres assintomáticas, que ainda não foram caracterizados.

Raça/Etnicidade

As possíveis diferenças na composição da flora vaginal "normal" ainda necessitam ser mais bem estudadas. A ocorrência de espécies de *Lactobacillus* produtoras de peróxido de hidrogênio, que possui atividade de defesa contra patógenos parece ser menos frequente em mulheres de raça negra⁸. Estudos sugerem, para mulheres sem vaginose bacteriana, que

o pH vaginal é mais elevado na raça negra⁹; sugerem ainda que tais diferenças são válidas apenas para mulheres que tenham a microflora vaginal não dominada por *Lactobacillus*^{10,11}. A maior prevalência de vaginose bacteriana detectada pelo Gram em mulheres de raça negra talvez possa meramente refletir a presença de bactérias outras, que não *Lactobacillus*, como predominantes na população negra, o que não significa que tais mulheres sejam portadoras de vaginose bacteriana.

Flutuações na flora vaginal

A composição da flora vaginal não é constante, sofrendo variações em resposta a fatores exógenos e endógenos^{12,15}. Tais fatores incluem as diferentes fases do ciclo menstrual, gestação, uso de contraceptivos, frequência de intercursos sexuais, uso de duchas ou produtos desodorantes, utilização de antibióticos ou outras medicações com propriedades imunossupressivas. As alterações que ocorrem no meio vaginal podem aumentar ou diminuir as vantagens seletivas para micro-organismos específicos. Por exemplo, estudos têm relacionado a perda de *Lactobacillus* ao intercursos sexuais ou ao uso de antibióticos¹⁴. Entretanto outro estudo demonstrou que o coito sem o uso de condon não teve efeito sobre os *Lactobacillus*, mas elevou os níveis de *Escherichia coli* e bacilos gram- negativos facultativos¹⁵. Durante o ciclo menstrual ocorrem variações hormonais que interferem no substrato de diferentes microorganismos; tais variações, assim como o sangue menstrual, levam a mudanças no pH vaginal. Mas mesmo assim os níveis de *Lactobacillus* permanecem constantes através do ciclo, as espécies não-*Lactobacillus* aumentam durante a fase proliferativa e as concentrações de *Candida albicans* se tornam mais elevadas no período pré-menstrual¹³.

Os antibióticos podem alterar a ecologia vaginal, portanto o tratamento de mulheres assintomáticas, mas cujo exame a fresco mostra ausência de *Lactobacillus*, é bastante discutível. Induzir uma perturbação na microflora endógena com base apenas nos achados microscópicos pode desencadear a proliferação seletiva de micro-organismos que estavam sendo inibidos e que possam ser prejudiciais à saúde da vagina.

A *Candida albicans* é tolerante ao meio ácido, sendo encontrada em aproximadamente 10% a 20% das mulheres em idade reprodutiva. A concentração do micro-organismo é baixa, portanto a mulher portadora é assintomática. Entretanto, eventos que levam a um estado de imunossupressão local, como o intercursos sexuais ou a indução local de resposta alérgica, criam condições adequadas para a proliferação do micro-organismo e também facilitam a transformação para a forma de hifas, mais invasivas¹⁶. Tais situações resultam no aparecimento de vaginite sintomática.

A produção de ácido láctico parece ser essencial para a manutenção de um ecossistema saudável, independentemente das espécies bacterianas que possam estar presentes na vagina. O pH ácido resultante previne a proliferação excessiva de micro-organismos potencialmente patogênicos. Lembrar ainda que a predominância de *Lactobacillus* é benéfica para o hospedeiro, já que algumas espécies produzem peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, fatores que dificultam a proliferação de outros micro-organismos.

Polimorfismos genéticos

Polimorfismos genéticos são pequenas mudanças na sequência de DNA de um gene, que ocorre em indivíduos saudáveis. Geralmente envolvem tanto uma alteração em um único par de bases ou uma variação no comprimento de uma sequência repetitiva de DNA. O polimorfismo pode ocorrer na região promotora do gene, ou seja, na parte do gene que não é transcrito em proteína mas que influencia a taxa de transcrição. Outra possibilidade é a ocorrência na região codificadora do gene, ou seja, na região que influencia a composição final da proteína, determinando a substituição de um aminoácido por outro. Tais mudanças podem resultar em alterações na conformação da composição e atividade da proteína.

Estudos têm demonstrado que a capacidade genética individual de produzir níveis baixos ou elevados de fatores anti ou pró-microbianos representa importante variável que influencia a composição da flora microbiana vaginal e a resposta aos patógenos. Polimorfismos em genes tais como o antagonista do receptor da interleucina 1 ou o receptor de superfície celular “Tool-like receptor 4” que atua no reconhecimento inato de bactérias gram-negativas podem influenciar a composição quantitativa de bactérias na vagina^{17,18}. As frequências de diferentes polimorfismos genéticos variam entre os diferentes grupos étnico-raciais; tal fato pode estar relacionado a diferenças na composição do ecossistema entre populações diferentes.

Imunidade vaginal

Além dos efeitos protetores da flora vaginal endógena, a proteção contra os micro-organismos potencialmente patogênicos é feita também pelos componentes locais da imunidade inata e da imunidade adquirida.

O sistema imune inato é o mais primitivo braço do sistema imune, tendo sido conservado através da evolução. Uma de suas características é reconhecer padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPS) nos micróbios invasores, ao invés de reconhecer antígenos específicos. Os fatores da imunidade inata que atuam na vagina são representados por fatores solúveis (tais como lecitina ligadora de manose [MBL], componentes do complemento, defensinas, inibidor da protease secretória dos leucócitos (SLPI), óxido nítrico), componentes associados a membranas (“*Toll-like receptors*”) e células fagocitárias. O reconhecimento de um PAMP por um componente da imunidade inata desencadeia uma sequência de eventos que leva à liberação de citocinas pro-inflamatórias e, conseqüentemente, à ativação do sistema imune adquirido, ou seja, ativação de linfócitos T e B. Uma vez ativados esses linfócitos iniciam a imunidade mediada por células e a imunidade humoral. Importante ressaltar que, enquanto a ativação do sistema imune inato ocorre imediatamente após o reconhecimento do patógeno, são necessários vários dias para que a imunidade adquirida se torne funcional.

A camada de células epiteliais da vagina constitui o ponto inicial de contato entre os micro-organismos e o trato genital do hospedeiro. Tais células epiteliais possuem “*Toll-like receptors*” (TLR) em sua superfície e, portanto são importantes componentes da imunidade vaginal inata¹⁹. Já foram identificados 11 TLRs, cada um com diferente especificidade²⁰. Complexos de TLR1 e TLR2 reconhecem lipoproteínas e peptídeoglican presentes nas superfícies de bactérias gram-positivas. TLR3 é

específico para a dupla cadeia de DNA, que é um intermediário no ciclo de replicação de muitos vírus. TLR4 reconhece o liposacarídeo componente da parede de bactérias gram-negativas. TLR5 reage com as flagelinas, componentes dos flagelos bacterianos. TLR9 tem a capacidade de distinguir as sequências de DNA que contém o dinucleotídeo CpG no estado não metilado (em humanos a sequência de DNA é altamente metilada, mas o TLR9 reage apenas com o CpG de bactérias, que é não-metilado, sendo portanto específico para as mesmas).

As células vaginais também liberam moléculas com potente atividade antimicrobiana não específica. Uma classe dessas moléculas, chamadas de defensinas, incluem peptídeos carregados positivamente, que se ligam com rapidez a superfícies bacterianas com cargas negativas. Tal ligação resulta na ruptura da membrana do micro-organismo e lise celular²¹. As defensinas humanas HBD-1 e HBD-2 são produzidas pelas células epiteliais vaginais. Em mulheres com infecções, a produção de HBD-2, mas não de HBD-1, é estimulada pelos estrogênios e inibida pela progesterona²². Isto sugere que o uso de contraceptivos orais pode diminuir a liberação de HBD-2, aumentando assim a susceptibilidade às infecções. Outra classe de moléculas é representada pelo SLPI, que possui a capacidade de inibir enzimas que degradam proteínas (proteases), destruindo bactérias gram-positivas e gram-negativas e bloqueando a ação do vírus da imunodeficiência humana²³. A produção de SLPI também ocorre na tuba uterina²⁴. Os níveis vaginais dessa proteína encontram-se diminuídos em mulheres com vaginose bacteriana²⁵, sugerindo que o SLPI, como componente do sistema imune inato, teria papel importante na manutenção da homeostase vaginal.

Lecitina ligadora de manose (MBL) é uma proteína antimicrobiana presente na circulação e na secreção vaginal. É sintetizada primariamente pelo fígado, sendo ainda incerta a produção vaginal. A MBL reconhece e liga-se a resíduos de manose, N-acetilglicosamina e fucose presentes nas superfícies dos micro-organismos. Tal ligação induz a ativação do sistema de complemento e depósito dos componentes do mesmo na membrana microbiana. Tal fato induz a lise direta das bactérias sensíveis ou a sua opsonização²⁶. Estudos têm demonstrado que mulheres com deficiência na MBL devido a um polimorfismo na região codificadora do gene que regula a produção dessa proteína são mais susceptíveis a infecções recorrentes por *Candida albicans*²⁷.

Proteínas de choque térmico (“heat shock proteins”) estão entre as proteínas mais altamente conservadas na evolução dos seres vivos. São essenciais para a conservação da vida em cada organismo conhecido e ajudam a célula a sobreviver em condições ambientais diversas, tais como a exposição a temperaturas elevadas, tóxicos químicos, inflamação ou agressão por patógenos microbianos. A proteína de choque térmico HSP-70kDa (hsp70) foi recentemente reconhecida como uma das proteínas antimicrobianas presentes na vagina^{28,29}. A síntese da hsp70 é intensamente estimulada em resposta à inflamação e infecção, podendo localizar-se extra e/ou intracelularmente. A hsp70 intracelular liga-se a outras proteínas (que estão sob condições adversas) e evita a degradação das mesmas³⁰. A hsp70 extracelular liga-se aos “*toll like receptors*” estimulando a resposta imune aos patógenos³¹. Estudos sugerem que a hsp70 que é produzida

em resposta à microflora vaginal anormal induz a liberação de ácido nítrico na vagina³². O ácido nítrico tem atividade antimicrobiana contra uma ampla variedade de micro-organismos³³.

Além do SLPI²³, outros componentes do sistema imune inato que protegem contra as infecções por retrovírus, particularmente o HIV, têm sido caracterizados no trato genital feminino. A quemoquina CCL20/MIP3 alfa é produzida pelas células uterinas e tubárias; estudos *in vitro* com culturas de células demonstraram aumento da produção dessa proteína após estimulação com cadeia dupla de DNA sintético homólogo à cadeia de RNA viral³⁴.

Anticorpos com capacidade de reconhecer e ligar-se a antígenos microbianos específicos encontram-se na vagina por meio de transdução da circulação sistêmica; após a ligação ocorre a morte microbiana, por mecanismo complemento-dependente ou por opsonização. Além disso, um componente do sistema imune das mucosas localiza-se no trato reprodutivo. Assim, linfócitos B produtores de anticorpos estão presentes na endocérvice e também na vagina, produzindo localmente ambas as classes de anticorpos, IgG e IgA³⁵. A elaboração local de anticorpos representa um rápido mecanismo para o combate aos micro-organismos patogênicos, sem a necessidade de aguardar pelo início da resposta imune sistêmica. Os anticorpos formados localmente e presentes na vagina provavelmente diferem dos sistêmicos; além disso, é possível identificar anticorpos na secreção cérvicovaginal que não são detectáveis no sangue periférico.

CONCLUSÕES

1) A flora bacteriana vaginal, associada à presença de diversos componentes da imunidade inata e adquirida, constituem importante mecanismo de defesa para evitar a invasão/proliferação de patógenos microbianos nos locais expostos ao meio ambiente externo.

2) Os avanços nos métodos não cultiváveis de amplificação de genes para a identificação de bactérias têm possibilitado tentativas de caracterizar um quadro mais definitivo da composição do ecossistema vaginal. Até o início de tais estudos, a flora vaginal era classificada em duas categorias: “flora normal”, dominada por *Lactobacillus* e “flora anormal”, com predomínio de outras espécies bacterianas. Entretanto, as novas técnicas de identificação de micro-organismos têm possibilitado a compreensão de que, em algumas mulheres, uma flora vaginal não dominada por *Lactobacillus* pode ser “normal” e não necessariamente patogênica.

3) Os avanços no estudo dos polimorfismos genéticos explicam variações no funcionamento individual na produção, concentração ou efetividade dos componentes do sistema imune inato. Portanto, se as características genéticas da mulher estudada não forem levadas em consideração, os estudos observacionais e ensaios clínicos realizados considerando-se uma flora vaginal específica serão de utilidade bastante limitada, especialmente aqueles baseados nos esfregaços com coloração pelo método de Gram ou outras características morfológicas.

4) As sequências de eventos que culminam com o desenvolvimento da vaginose bacteriana, entidade caracterizada por profunda alteração na flora vaginal fisiológica, ainda necessitam ser determinadas. Frente aos novos estudos de genética bacteriana, questiona-se se todas as mulheres com diagnóstico de

“vaginose bacteriana assintomática”, realizado apenas com base nas características morfológicas dos micro-organismos, são realmente portadoras de um distúrbio de flora ou se simplesmente possuem um ecossistema vaginal normal que não é dominado por *Lactobacillus*. Tal fato deve ser cuidadosamente determinado com base em características individuais, ao invés de meramente submeter tais mulheres a tratamentos desnecessários e provavelmente prejudiciais ao particular equilíbrio de sua flora vaginal.

5) É fundamental que os ginecologistas e obstetras ampliem seus conhecimentos sobre a microbiota vaginal e os estudos imunológicos recentes, trazendo os resultados das pesquisas atuais para a sua prática. Além disso, é importante que técnicas laboratoriais mais avançadas ultrapassem os limites dos laboratórios de pesquisa e se tornem rapidamente disponíveis na prática clínica, podendo assim ser utilizadas na melhoria do atendimento. A utilização dos novos conhecimentos e possibilidades diagnósticas mais avançadas contribuirão certamente para aprimorar as práticas em saúde reprodutiva, evitando tratamentos desnecessários e melhorando a qualidade de vida das mulheres.

Conflito de interesse: não há

SUMMARY

VAGINAL BACTERIAL FLORA: UP TO DATE

The aim of this review is to update knowledge about the vaginal ecosystem, non-cultivation methods for bacterial identification (gene amplification), the Lactobacillus species that comprise normal vaginal flora and influence of host genetics on bacterial interactions with local innate and acquired immune defenses. A Medline (Pubmed) search from 1997-2009 for relevant articles was performed and the most informative articles were selected. Non-culture techniques (gene amplification) allow a comprehensive analysis of the vaginal ecosystem's composition. In the majority of women in the reproductive age there is a predominance of one or more species of Lactobacillus: L. crispatus, L. inners and L. gasseri. However, in other apparently healthy women there is a deficiency or complete absence of Lactobacilli. Instead, there is a substitution by other lactic acid-producing bacteria: Atobium, Megaspheera and/or Leptotrichia species. The infectivity and/or proliferation of pathogenic bacteria in the vagina is suppressed by lactic acid production, by products of endogenous bacteria and by activation of local innate and acquired immunity. Vaginal epithelial cells produce several compounds with anti-microbial activity. These cells have Toll-like receptors on their membrane that recognize molecular patterns associated with pathogens. Recognition leads to production of pro-inflammatory cytokines and stimulation of antigen-specific immunity. The production of IgG and IgA antibodies is also triggered in the endocervix and vagina in response to infection. Vaginal flora composition and the immune mechanisms constitute important defenses. Criteria of normal and abnormal flora have to be reviewed and genetic polymorphism can explain variations in flora composition. This new knowledge should be included in the clinical practice of gynecologists and obstetricians to improve patients care. [Rev Assoc Med Bras 2010; 56(3): 370-4]

KEY WORDS: Gene amplification. *Lactobacillus. gardnerella vaginalis*. Candidiasis vulvovaginal. Immunity innate. Polymorphism.Genetic.

REFERÊNCIAS

- Larsen B, Monif GRG. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. *Clin Infect Dis*. 2001;32: e69-77.
- Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology*. 2004;150: 2565-73.
- Verhelst R, Verstraelen H, Claeyss G, Verschraegen G, Delanghe J, Van Sinaey L, et al. Cloning of 16S rRNA genes amplified from normal and disturbed vaginal microflora suggests a strong association between *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis* and bacterial vaginosis. *BMC Microbiology*. 2004;4:16-26.
- Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. *N Engl J Med*. 2005;353:1899-911.
- Pavlova SI, Kilic SS, So JS, So JS, Nader-Macias ME, Simoes JA, et al. Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences. *J Appl Microbiol*. 2002;92:451-9.
- Rodriguez JM, Collins MD, Sjoden B, Falsen E. Characterization of a novel *Atopobium* isolate from the human vagina: description of *Atopobium vaginae* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1999;49:1573-6.
- Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, Ladhoff A, Swidsinski S, Hale LP, et al. Adherent biofilms in bacterial vaginosis. *Obstet Gynecol*. 2005;106:1013-23.
- Antonio MA, Hawes SE, Hillier SL. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. *J Infect Dis*. 1999;180:1950-6.
- Stevens-Simon C, Jamison J, McGregor JA, Douglas JM. Racial variation in vaginal pH among healthy sexually active adolescents. *Sex Transm Dis*. 1994;21:168-72.
- Royce RA, Jackson TP, Thorp JMJ, Hillier SL, Rabe LK, Pastore LM, et al. Race/ethnicity, vaginal flora patterns, and pH during pregnancy. *Sex Transm Dis*. 1999;26:96-102.
- Fiscella K, Klebanoff MA. Are racial differences in vaginal pH explained by vaginal flora? *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191:747-50.
- Priestley CFJ, Jones BM, Dhar J, Goodwin L. What is normal vaginal flora? *Genitourin Med*. 1997;73:23-8.
- Eschenbach DA, Thwinn SS, Patton DL, Hooton TM, Stapleton AE, Agnew K, et al. Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge and microflora. *Clin Infect Dis*. 2000;30:901-7.
- Schwabke JR, Richey CM, Weiss HL. Correlation of behaviors with microbiologic changes in vaginal flora. *J Infect Dis* 1999;180:1632-6.
- Eschenbach DA, Patton DL, Hooton TM, Meier AS, Stapleton A, Aura J, et al. Effects of vaginal intercourse with and without a condom on vaginal flora and vaginal epithelium. *J Infect Dis*. 2001;183:913-8.
- Witkin SS. Immunology of recurrent vaginitis. *Am J Reprod Immunol Microbiol*. 1987;15:34-7.
- Barton PT, Gerber S, Skupski DW, Witkin SS. Interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism, vaginal interleukin-1 receptor antagonist concentrations, and vaginal *Ureaplasma urealyticum* colonization in pregnant women. *Infect Immun*. 2003;71:271-4.
- Genc MR, Vardhana S, Delaney MI, Onderdonk A, Tuomala R, Norwitz E, et al. Relationship between a Toll-like receptor-4 gene polymorphism, bacterial vaginosis-related flora and vaginal cytokine responses in pregnant women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2004;116:152-6.
- Qualye AJ. The innate and early immune response to pathogen challenge in the female genital tract and the pivotal role of epithelial cells. *J Reprod Immunol*. 2002;57:61-79.
- Underhill DM, Ozinsky A. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr Opin Immunol*. 2002;14:103-10.
- Hancock REW. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis*. 2000;1:156-64.
- Han JH, Kim MS, Lee MY, Lee MK, Kim RH, Myung SC. Modulation of human b-defensin-e expression by 17b-estradiol and progesterone in vaginal epithelial cells. *Cytokine*. 2010;49:209-14.
- Pillay K, Coutoudis A, Agadzi-Naqvi AK, Kuhn L, Coovadia HM, Janoff EN, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor in vaginal fluids and perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission. *J Infect Dis*. 2001;183:653-6.
- King AE, Wheelhouse N, Cameron S, McDonald SE, Lee FK, Entrican G, et al. Expression of secretory leukocyte protease inhibitor and elafin in human fallopian tube and in an in-vitro model of *Chlamydia trachomatis* infection. *Hum Reprod*. 2009;24:679-86.
- Novak RM, Donoval BA, Graham PJ, Boksa LA, Spear G, Hershov RC, et al. Cervicovaginal levels of lactoferrin, secretory leukocyte protease inhibitor, and RANTES and the effects of coexisting vaginosis in human immunodeficiency virus (HIV)-seronegative women with a high risk of heterosexual acquisition of HIV infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2007;14:1102-7.
- Klein NJ. Mannose-binding lectin: do we need it? *Mol Immunol*. 2005;42:919-24.
- Babula O, Lazdana G, Kroica J, Ledger WJ, Witkins SS. Relation between recurrent vulvovaginal candidiasis, vaginal concentrations of mannose-binding lectin, and a mannose-binding lectin gene polymorphism in Latvian women. *Clin Infect Dis*. 2003;37:733-7.
- Giraldo P, Neuer, Ribeiro-Filho A, Linhares I, Witkin SS. Detection of the human 70-kD and 60-kD heat shock proteins in the vagina: relation to microbial flora, vaginal pH, and method of contraception. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 1999;7:23-5.
- Giraldo P, Neuer A, Korneeva IL, Ribeiro-Filho A, Simões JA, Witkin SS. Vaginal heat shock protein expression in symptom-free women with a history of recurrent vulvovaginitis. *Am J Obstet Gynecol*. 1999;180:524-9.
- Voellmy R. The stress protein response: consequences of stress exposure-cytoprotection-potential diagnostic and therapeutic applications. *Methods*. 2005;35:115-6.
- Campisi J, Leem TH, Fleshner M. Stress-induced extracellular hsp72 is a functionally significant danger signal to the immune system. *Cell Stress Chaperones*. 2003;8:272-86.
- Genc MR, Delaney ML, Onderdonk AB, Witkin SS. Vaginal nitric oxide in pregnant women with bacterial vaginosis. *Am J Reprod Immunol*. 2006;56:86-90.
- Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunol*. 2001;2:907-16.
- Ghosh M, Shen Z, Schaefer TM, Fahay JV, Gupta P, Wira CR. CCL20/MIP3alpha is a novel anti-HIV-1 molecule of the human female reproductive tract. *Am J Reprod Immunol*. 2009;62:60-71.
- Mestecky J, Russell MW. Induction of mucosal immune responses in the human.

Artigo recebido: 15/06/09
Aceito para publicação: 20/01/10
