



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO DOS
LEUCÓCITOS PRESENTES NOS LAVADOS VAGINAIS DE MULHERES COM
VULVOVAGINITES E FLORA VAGINAL NORMAL**

JOZIANI BEGHINI JUNQUEIRA DE CARVALHO FERREIRA

**Campinas
2011**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO DOS
LEUCÓCITOS PRESENTES NOS LAVADOS VAGINAIS DE MULHERES COM
VULVOVAGINITES E FLORA VAGINAL NORMAL**

JOZIANI BEGHINI JUNQUEIRA DE CARVALHO FERREIRA

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas – UNICAMP para obtenção de título de Mestre em Ciências da Saúde, área de concentração em Fisiopatologia Ginecológica, sob orientação do Prof. Dr. Paulo César Giraldo e coorientação do Dr. Fernando Guimarães

**Campinas
2011**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

F413c Ferreira, Joziani Beghini Junqueira de Carvalho, 1980 -
Caracterização e quantificação por citometria de fluxo dos
leucócitos presentes nos lavados vaginais de mulheres com
vulvovaginites e flora vaginal normal. / Joziani Beghini Junqueira
de Carvalho Ferreira. – Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador: Paulo César Giraldo
Coorientador: Fernando Guimarães
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Leucócitos. 2. Imunidade. 3. Vaginose bacteriana.
4. Candidíase vulvovaginal. 5. Citometria de fluxo. I. Giraldo,
Paulo César. II. Guimarães, Fernando. II. Universidade Estadual
de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Characterization and quantification by flow cytometry of leukocytes present in vaginal lavages from women with vulvovaginitis and normal microflora

Palavra-chave em inglês:

Leukocytes
Immunity
Bacterial vaginosis
Vulvovaginal candidiasis
Flow cytometry

Área de concentração: Fisiopatologia Ginecológica

Titulação: Mestre em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Paulo César Giraldo [Orientador]
Iara Moreno Linhares
José Roberto Erbolato Gabiatti

Data da defesa: 25-08-2011

Programa de Pós-Graduação: Faculdade de Ciências Médicas

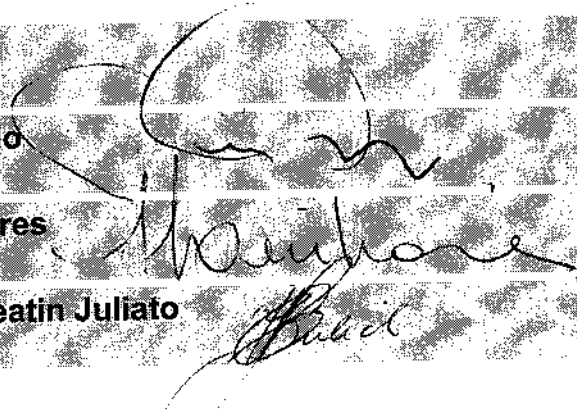
BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: JOZIANI BEGHINI JUNQUEIRA DE CARVALHO FERREIRA

Orientador: Prof. Dr. PAULO CÉSAR GIRALDO

Coorientador: Dr. FERNANDO GUIMARÃES

Membros:

- 1. Prof. Dr. Paulo César Giraldo**
 - 2. Profª Drª Iara Moreno Linhares**
 - 3. Profª. Drª. Cássia Raquel Teatin Juliato**
- 

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

Data: 25/08/2011

Dedico este trabalho...

Às pessoas mais importantes da minha vida...

... que com sua compreensão tornaram esta caminhada mais harmoniosa...

Meus pais Tereza e Aroldo

Que com amor, sempre se doaram para que eu pudesse dar meus próprios passos...

E, meu esposo Luiz

Meu amor, amigo e companheiro em todos os momentos...

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, essência de nossas vidas...

Ao Prof. Dr. Paulo César Giraldo pelos constantes ensinamentos, confiança e amizade. Obrigada por me fazer acreditar que mesmo quando todas as alternativas se esgotam, sempre é possível dar mais um passo...

Agradeço também ao Dr. Fernando Guimarães por me conduzir com sabedoria ao fascinante mundo da biologia. Obrigada por sua amizade e inigualável orientação...

As amigas Rose e Ruth pelo acolhimento, companheirismo e por colaborar com este trabalho.

As companheiras de mestrado, Nádia, Laura, Camila, Elisa e Samantha, e aos secretários, Márcia e Leandro, pelos agradáveis momentos.

Aos Professores, Dra. Anne Katherine e Dr. Eleutério, sempre tão gentis e prestativos.

À Sueli Chaves, pelo carinho e preciosa colaboração.

Às funcionárias do Ambulatório de Infecções Genitais, Creuza, Laine, Cris, Cidinha, Fabi, Carol, Bel e Nalda que muito contribuíram para realização deste trabalho.

À Eliane M. Brolazo pela colaboração desprendida.

*Ao Samyr (Departamento de Finanças), Sirlei (Estatística), Vanda (Bibliotecária),
Margareth (Departamento de Tocoginecologia), Rosário (ASTEC) e
Denise (Pós-graduação) pela gentileza, atenção e excelente trabalho.*

*Aos meus familiares, amigos e todos aqueles que de alguma forma contribuíram
para a conclusão deste trabalho.*

*Às mulheres que participaram deste estudo, por compreenderem que a evolução
da medicina depende deste gesto... Obrigada!*

Este estudo foi financiado:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo
número 2008/09853-8

Sumário

Resumo	viii
Abstract	x
1. Introdução	12
2. Objetivos	25
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivos específicos.....	25
3. Publicações.....	26
3.1. Artigo 1	27
3.2. Artigo 2	48
4. Discussão.....	67
5. Conclusões.....	74
6. Referências Bibliográficas.....	75
7. Anexos	81
7.1. Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	81
7.2. Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	83
8. Apêndice	85

Resumo

Introdução: As vulvovaginites (VV) são consideradas como agravos importantes à saúde da mulher, pois afetam suas vidas no âmbito sexual, afetivo, social, e psíquico. Muitos aspectos da fisiopatogênese destas afecções ainda precisam ser esclarecidos, entre eles os mecanismos imunes relacionados à instalação e propagação da infecção. **Objetivos:** Identificar e quantificar por citometria de fluxo (CF) os leucócitos presentes no conteúdo vaginal de mulheres com flora normal e VV. Avaliar a expressão do CD16 nos neutrófilos do conteúdo vaginal destas mulheres. **Materiais e Métodos:** Estudo de corte transversal, no período de junho de 2009 a outubro de 2010. O estudo incluiu 152 mulheres no menacme diagnosticadas com: flora vaginal normal (n=51), vaginose bacteriana (VB) (n=34), candidíase vulvovaginal (CV) (n=43) e VB associada a CV (VB+CV) (n=14). As mulheres foram submetidas a exame especular para medida de pH vaginal, teste de Whiff, coleta de material para bacterioscopia e cultura para fungos. A VB foi detectada pelos critérios de Amsel e/ou escore de Nugent ≥ 7 . A CV, pela presença de hifas ou esporos no conteúdo vaginal. VB+CV foi diagnosticada quando estas duas VV estavam presentes na mesma mulher segundo critérios já descritos. Foram consideradas com flora vaginal normal, as mulheres que apresentaram flora do tipo 1 e ausência de patógenos nos exames laboratoriais.

Ao final do exame ginecológico, foi realizado um lavado da cavidade vaginal, o qual foi enviado ao laboratório para processamento. Os leucócitos foram marcados com anticorpos monoclonais conjugados a fluoróforos (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD14, anti-CD15, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD24 e anti-CD56) e analisados por CF. **Resultados:** Os granulócitos neutrófilos foram as células predominantes em todos os grupos estudados. A média da porcentagem de granulócitos neutrófilos foi significativamente maior ($p<0,05$) na CV comparado à flora normal e VB. A média da porcentagem de granulócitos neutrófilos foi significativamente menor ($p<0,05$) na VB comparado à flora normal e a CV. Macrófagos e linfócitos foram detectados em percentuais bem menores que os granulócitos neutrófilos. Houve significância estatística ($p<0,05$) para os linfócitos TCD4 que apresentaram média da porcentagem maior na CV e VB em comparação à flora normal. Considerando-se a intensidade da expressão do CD16 nos neutrófilos, houve maior expressão nas VV (VB, CV, VB+CV) quando comparado à flora normal ($p<0,05$). Entre as VV, esta ocorrência foi maior na VB comparado à CV ($p<0,05$). **Conclusões:** Os granulócitos neutrófilos foram as células predominantes nos lavados vaginais e suas quantidades foram decrescentes considerando-se CV, flora normal e VB. Estes dados sugerem que, como em outros tecidos, na vagina, os neutrófilos são as principais células efetoras da resposta imune apresentando-se em maiores ou menores concentrações conforme o estímulo imunológico causado pelo micro-organismo. A maior intensidade da expressão do CD16 nos neutrófilos das mulheres com VV indica um atraso na apoptose dos neutrófilos envolvidos nestas infecções, predominando na VB.

Palavras-chaves: leucócitos, imunidade, vaginose bacteriana, candidíase vulvovaginal, citometria de fluxo.

Abstract

Introduction: Vulvovaginitis (VV) is a serious health problem in women. This disease affects their lives in all aspects, be it, sexual, affective, social, and psychological. Many aspects of the pathophysiology of these infections have yet to be elucidated, including the immune mechanisms related to proliferation of microorganisms and maintenance of the infectious process. **Objectives:** One aim of this study was to identify and to quantify the immune cells present in the vaginal lumen of women with normal flora and VV by flow cytometry (FC). Another aim was to evaluate the expression of CD16 on neutrophils from the vaginal lumen of these women. **Materials and Methods:** A Cross-sectional study was performed from June 2009 to October 2010. The study included 152 women of childbearing age diagnosed with: normal vaginal flora (n=51), bacterial vaginosis (BV) (n=34), vulvovaginal candidiasis (VC) (n=43) and BV associated with VC (BV+VC) (n=14). The women underwent speculum examination for performing vaginal pH, Whiff test, Gram stain and culture for fungi. BV was diagnosed by the Amsel criteria and/or Nugent score ≥ 7 . VC was diagnosed by the presence of yeast or hyphae in the vaginal discharge. A diagnosis of BV+VC was made when both criteria were present in the same woman. Normal vaginal microflora was defined by the presence

of type 1 flora and absence of pathogens in laboratorial exams. During gynecological examination, a lavage of the vaginal cavity was performed and sent to the laboratory for processing. Immune cells were labeled with fluorochrome-conjugated monoclonal-antibodies (anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD14, anti-CD15, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD24 e anti-CD56) and analyzed by FC. **Results:** The neutrophil granulocytes were the predominant cells in all groups. The mean of the percentage of neutrophil granulocytes was significantly higher ($p < 0.05$) in VC compared to the normal flora and BV. On the other hand, the mean of the percentage of neutrophil granulocytes was significantly lower ($p < 0.05$) in BV compared to the normal flora and VC. Macrophages and lymphocytes were detected in percentages far lower than the neutrophil granulocytes. The mean percentage of CD4 lymphocytes was significantly higher ($p < 0.05$) in BV and VC compared to the normal flora. The expression of CD16 on neutrophils was higher in VV (BV, VC, BV+VC) compared to the normal flora ($p < 0.05$). Among the VV, it was higher in BV compared to VC ($p < 0.05$). **Conclusions:** Neutrophil granulocytes were the predominant cells in the vaginal lavages. Higher amount of neutrophil granulocytes was observed in VC, normal flora and BV respectively. These data suggest that neutrophils are presented in higher or lower concentrations as the immune stimulation caused by the pathogen. The highest intensity of CD16 expression on neutrophils in women with VV indicates a delay in neutrophil apoptosis in these infections, predominantly in BV.

Keywords: leukocytes, immunity, bacterial vaginosis, vulvovaginal candidiasis, flow cytometry.

1. Introdução

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

Inúmeras são as causas que propiciam inflamação do epitélio vaginal gerando diferentes tipos de VV. Os agentes infecciosos estão entre as principais causas, porém as VV podem ser decorrentes de processos alérgicos, irritativos, traumáticos, manifestações clínicas de doenças dermatológicas e/ou autoimunes, além de alterações fisiológicas do trato genital feminino (3,4). Considerando-se as diversas etiologias, provavelmente, toda mulher terá durante sua vida reprodutiva, um ou mais episódios de descarga vaginal que a levará ao consultório médico, o

que torna o corrimento vaginal seguramente a queixa mais comum nos consultórios de ginecologia e obstetrícia (5,6). De fato, no Brasil, foram estimados três milhões de episódios ao ano, gerando um gasto anual em torno de 80 a 100 milhões de dólares. Estes índices representam um prejuízo social e econômico considerável para o nosso país (7). Nos Estados Unidos da América, considerando os custos para diagnósticos, tratamentos e as despesas com atestados médicos, estimou-se um gasto de um bilhão de dólares ao ano (8).

Além da alta frequência do problema, o diagnóstico do corrimento genital pelo ginecologista, quer na rede pública de saúde ou na clínica privada, não é fácil. Muitos aspectos podem modificar a sintomatologia e o aspecto clínico do corrimento vaginal fazendo com que o diagnóstico, na maioria das vezes, torne-se um procedimento complexo. Apesar destes conhecimentos, a hipótese diagnóstica é frequentemente elaborada por uma anamnese superficial acompanhada de exame especular despretenso. Não se pode confiar apenas em sinais e sintomas clínicos para fazer o diagnóstico das VV, pois em um número muito grande de casos, os sinais e sintomas não são característicos, o que leva o ginecologista ao erro diagnóstico (3,9,10).

Sabe-se que as queixas e as informações fornecidas pelas pacientes não garantem o diagnóstico correto da causa do corrimento vaginal. A observação pura e simples do corrimento vaginal por meio do exame especular, quando usada isoladamente, não determina adequadamente o agente etiológico. Um estudo avaliou 123 mulheres com queixa de corrimento vaginal e mostrou que a hipótese diagnóstica fundamentada no exame especular para identificar a causa

do corrimento tem uma sensibilidade diagnóstica inferior a 50%. Os valores preditivos positivos e negativos encontrados foram respectivamente 18,2% e 88,8% para candidíase e de 37,9% e 80,8% para vaginose bacteriana, representando valores inaceitáveis. Além disso, considerando somente a anamnese, o percentual de acertos diagnósticos foi baixo (11).

Para o correto diagnóstico da etiologia do corrimento vaginal deve-se levar em conta fatores como: a história clínica adequada, exame físico completo e busca de manifestações de doenças que levam a sintomas genitais, exame ginecológico detalhado, e obrigatoriamente, complementação com mensuração do pH vaginal, teste das aminas e estudo da microbiota vaginal, o que não se realiza rotineiramente na prática clínica (6). Portanto, é necessário basear-se nas diversas técnicas laboratoriais disponíveis e não apenas na avaliação clínica, para se evitar tratamentos inadequados ou desnecessários (12).

As VV mais comuns que acometem as mulheres em idade reprodutiva são a vaginose bacteriana (VB) e a candidíase vulvovaginal (CV), respondendo por 22% a 50% e 17% a 39% das mulheres sintomáticas, respectivamente (12). O estudo da fisiopatogênese da CV e da VB sugere que estas doenças decorrem de um distúrbio no controle do ecossistema vaginal o qual propicia o crescimento desordenado do fungo nos casos de CV ou de bactérias anaeróbias nos casos de VB (8,13).

A VB é considerada a principal causa de VV. É definida como uma síndrome polimicrobiana caracterizada pelo crescimento abundante de micro-

organismos anaeróbios, em particular a *Gardnerella vaginalis*, *Mycoplasma hominis*, *Prevotella*, *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus*, *Mobiluncus sp* e *Atopobium vaginae*, e diminuição acentuada dos *Lactobacillus* presentes na flora vaginal normal (13,14). Não está claro, contudo, se a diminuição dos lactobacilos predispõe o crescimento das bactérias anaeróbicas ou se o crescimento desordenado destas bactérias depleta o “pool” de lactobacilos (15).

Diversos fatores, considerados predisponentes, se associam à VB, tais como: atividade sexual, multiplicidade de parceiros, homossexualismo feminino com presença de VB, raça negra, uso de dispositivo intrauterino (DIU), uso de duchas vaginais e tabagismo, sem contudo serem considerados causas do problema. Outros fatores como: parto prematuro, ruptura prematura de membranas, corioamnionite, recém-nascido com baixo peso, abortamento espontâneo, endometrite pós-abortamento e pós-parto, infecções pélvicas e pós-cirúrgicas estão associados à VB, e são considerados complicações desta doença. Outro ponto a ser considerado é a relação entre VB e maior susceptibilidade à aquisição de doenças sexualmente transmissíveis, em especial o HIV (16,17,18).

Clinicamente, a VB apresenta-se como uma descarga vaginal anormal com odor desagradável, entretanto, aproximadamente 50% das mulheres são assintomáticas. O diagnóstico da VB pode ser feito pelos critérios de Amsel e/ou escore de Nugent (19,20). Ao exame clínico observa-se pouca ou nenhuma reação inflamatória, apesar do aumento excessivo do número de bactérias na luz vaginal. Os esfregaços do conteúdo vaginal realizados para o estudo microbiológico mostram, via de regra, ausência de células de defesa

(leucócitos) (13,21). A ausência de processo inflamatório na VB é algo que necessita de maiores esclarecimentos.

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

A CV manifesta-se como um processo infeccioso agudo com maior ou menor sintomatologia, na dependência do grau de inflamação local. A descarga vaginal e o prurido são as queixas mais comuns, seguidas de irritação e ardor vulvovaginal, dispareunia e disúria externa. Ao exame ginecológico observa-se edema e eritema vulvar acompanhado de leucorréia branca grumosa aderida às paredes vaginais. O diagnóstico é confirmado pela identificação do fungo pelo exame microscópico e/ou cultura em meio de Sabouraud. Diferentemente da VB, na CV observa-se frequentemente uma reação inflamatória de intensidade variável, constatada pelo quadro clínico e pela observação de células de defesa no esfregaço do conteúdo vaginal (8).

Conforme citado anteriormente, a VB e a CV são causadas pela proliferação de micro-organismos comensais presentes na flora vaginal normal. Os mecanismos que desencadeiam o processo infeccioso ainda não são completamente compreendidos, porém, sabe-se que estão associados a fatores que interferem no equilíbrio do ecossistema vaginal (5). Para a manutenção deste equilíbrio, vários mecanismos de defesa atuam de forma sinérgica: a posição e localização anatômica da vagina, a integridade e trofismo da mucosa, produção de muco protetor, pH vaginal, microbiota colonizadora da vagina e o sistema imunológico (22). Entretanto, mulheres expostas aos mesmos fatores e patógenos podem desenvolver respostas diferentes, desde doença clínica ou subclínica até ausência de doença. Portanto, acredita-se que as VV, especialmente nos casos de recorrência, são desencadeadas em função de alterações locais do hospedeiro e que o mecanismo mais relevante para manutenção da homeostase vaginal é o imune (23).

O sistema imune vaginal possui muitas particularidades, nem todas esclarecidas. As células epiteliais da mucosa vaginal além de constituírem uma barreira física impedindo a passagem de patógenos, também ativam a resposta imunológica mediante percepção dos micro-organismos agressores. Este reconhecimento se faz através de receptores presentes na superfície celular, entre eles os chamados Toll-like receptors (TLR), que reconhecem partículas comuns aos micro-organismos ou seus produtos. Esta ligação desencadeia a migração de leucócitos para combater a infecção (24,25). Outro mecanismo de reconhecimento aos patógenos são os macrófagos residentes no tecido local.

Estas células percebem a alteração da homeostase tecidual e também estimulam o recrutamento de células como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos natural killer (NK) responsáveis pela imunidade inata (26). A resposta inata é imediata, porém não é específica contra o micro-organismo. É considerada a primeira linha de defesa do sistema imune da mucosa vaginal e as principais células efetoras são os neutrófilos, células capazes de migrar para o tecido nas fases iniciais da inflamação, destruir e fagocitar o micro-organismo invasor. Os macrófagos também são fagócitos, porém seu tempo de vida no tecido é maior, portanto, predominam nas fases mais tardias da inflamação. Por este motivo, são as células responsáveis pela reparação dos tecidos lesados e resolução da inflamação. Quando não é possível debelar a infecção, uma resposta imune tardia é desencadeada e direcionada especificamente contra o micro-organismo. As principais células ativadoras deste processo são as células dendríticas ou células de Langerhans presentes no tecido. Estas células são macrófagos especializados na apresentação do antígeno aos linfócitos T “naive”, os quais desenvolverão uma resposta imune adaptativa predominantemente celular – tipo Th1 (linfócitos T) ou humoral – Tipo Th 2 (linfócitos B) (25,27, 28, 29).

Na CV, acredita-se que os mecanismos de defesa vaginal operam independentemente dos mecanismos sistêmicos, pois apesar de se encontrar células da imunidade específica do tipo Th1 e anticorpos para cândida na circulação periférica, não existe correspondência local sugerindo uma deficiência na resposta vaginal responsável pela instalação da infecção. Além disso, uma provável hipótese para candidíase sintomática relaciona-se com o limiar

do micro-organismo no meio vaginal. Tem-se demonstrado que as células epiteliais vaginais são capazes de inibir o crescimento da *Candida albicans*, o que permite o comensalismo da cândida no tecido. Quando o fungo alcança determinada concentração vaginal, as células epiteliais deixam de tolerá-lo e secretam fatores quimiotáticos para atração de neutrófilos, desencadeando processo inflamatório e consequentes sintomas clínicos (30). Outro fator associado a CV é o polimorfismo do gene que codifica a lecitina ligadora de manose (mannose-binding lectin - MBL). A MBL é uma proteína antimicrobiana presente no sangue e nas secreções vaginais, que ao se ligar com o fungo desencadeia a cascata do complemento para combater a infecção. Foi demonstrado que mulheres com este polimorfismo apresentam predisposição à candidíase recorrente, sugerindo uma base genética para a infecção em algumas mulheres (24).

A VB surge quando ocorre um aumento do número de bactérias associadas à síndrome (entre 100 a 1000 vezes), porém, os fatores desencadeantes da alteração da flora permanecem em investigação. Os mecanismos imunes associados à VB após instalação da infecção também são pouco conhecidos. Sabe-se que os produtos bacterianos da VB, lipopolissacarídeos (LPS), ácido lipotecóico (LTA) e peptidoglicanas (PGN), são ligantes para TLR e estimulam TLR4 e TLR2. Esta ligação resulta na ativação de respostas antimicrobianas e produção de citocinas pró-inflamatórias. Entretanto, em mulheres com VB, observa-se aumento da citocina pró-inflamatória IL 1 β , mas não se observa aumento dos níveis de IL8, citocina responsável pela migração de

neutrófilos. Além disso, ácidos graxos de cadeia curta produzidos pelos anaeróbios podem inibir citocinas pró-inflamatórias afetando a migração das células, motivo pelo qual a VB é considerada uma condição não inflamatória (24, 27, 31, 32).

Como o microambiente vaginal é dinâmico sofrendo constantes agressões e mudanças na composição da flora, as células imunes atuam invariavelmente na manutenção da homeostase vaginal. Como já salientado, os neutrófilos são células essenciais para combater estas agressões. Após realizar suas funções, os neutrófilos iniciam um processo de morte celular programada (apoptose) e são fagocitados pelos macrófagos residentes no tecido. Durante a apoptose, os neutrófilos sofrem alterações que permitem seu reconhecimento pelos macrófagos e consequente fagocitose. Este mecanismo é essencial para resolução da inflamação pois evita a liberação dos produtos tóxicos produzidos pelos neutrófilos ativados no tecido impedindo o dano tecidual (26,33,34). Foi descrito que durante a apoptose, os neutrófilos perdem a expressão da molécula de superfície celular CD16, indicando esta molécula como um dos marcadores da apoptose dos neutrófilos (35,36,37).

A influência dos micro-organismos causando alterações no tempo de apoptose dos neutrófilos tem sido avaliada, porém poucos estudaram este fenômeno relacionado aos germes causadores das infecções genitais (37,38). Foi mostrado que o atraso na apoptose dos neutrófilos na tricomoníase vaginal é um dos fatores mantenedores do processo inflamatório nesta infecção (37). Por outro lado, um estudo recente revelou que os lactobacilos, germes comensais da flora vaginal, aceleram o processo de apoptose dos neutrófilos (39).

A identificação e quantificação das células de defesa nos fluidos biológicos são realizadas como rotina em diversas especialidades. Exames como hemograma, análise do líquido cefalorraquidiano permitem ao médico detectar qual o subtipo de leucócito predominante sugerindo a classe do agente etiológico, além de avaliar a presença e intensidade do processo inflamatório e se existe processo alérgico associado (40,41). Na propedêutica básica do corrimento vaginal, os exames detectam o agente etiológico, porém não dão uma idéia precisa do grau de inflamação (42). Portanto, a quantificação sistemática das células de defesa presentes na cavidade vaginal nas diferentes infecções poderá auxiliar o ginecologista e obstetra no manejo clínico destas afecções.

A detecção das diferentes células, sejam elas imunes ou epiteliais, pode ser realizada por microscopia óptica, porém esta técnica sofre influências de fatores inerentes ao examinador como capacitação técnica, experiência, estado emocional e motivação para o trabalho. Uma técnica interessante que vem sendo utilizada para este fim é a citometria de fluxo (CF). A CF tem a capacidade de identificar células de forma automatizada diminuindo a interferência das variáveis humanas. Com a CF pode-se fazer uma série de análises de forma rigorosa e confiável, possibilitando o estudo dos mais variados aspectos da biologia celular e permitindo saltos importantes na qualidade das investigações (43).

A CF tem a capacidade de medir as propriedades celulares determinando características detalhadas como tamanho, complexidade, fenótipo e higidez celular. Desta forma apresenta amplo espectro de aplicações como contagem de células, imunofenotipagem, apoptose, ciclo celular, expressão gênica,

metabolismo celular, análises de ploidias, entre outras (44). A sensibilidade da imunofenotipagem por CF e sua extensa aplicabilidade tornam esta técnica um dos instrumentos mais poderosos no arsenal da patologia clínica. Um exemplo disso é o fato da CF ser o instrumento padrão-ouro no diagnóstico das leucemias identificando as células neoplásicas (45), e também por contabilizar as mudanças das taxas de linfócitos B, T CD4 e T CD8 na síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (46).

A CF analisa as células conduzindo-as dentro do aparelho (citômetro de fluxo) por meio de um sistema de fluxo contínuo de líquido. Este fluxo centraliza e direciona as células uma a uma até o ponto em que são interceptadas pelo(s) raio(s) laser(s). A luz dispersada pela interação do(s) laser(s) com a célula é capturada por um sistema óptico e através de detectores específicos é transformada em sinal eletrônico. Estes sinais são processados e analisados por software que relata as características celulares (Figura 1 e 2 – Apêndice). Para se determinar o fenótipo celular, utiliza-se a análise de fluorescência. Nestes experimentos as amostras celulares são misturadas a anticorpos específicos para a célula em questão, marcados com moléculas fluorescentes. Estes anticorpos se ligam a receptores específicos na superfície da membrana celular (“clusters of differentiation” - CD) e a fluorescência é detectada pelo citômetro permitindo a identificação do fenótipo (44). Os linfócitos T CD4 são as células que apresentam o fenótipo $CD3^+ CD4^+$, os linfócitos T CD8 apresentam o fenótipo $CD3^+ CD8^+$, os linfócitos B apresentam o fenótipo $CD19^+$ e os linfócitos NK, fenótipo $CD56^+$. Os macrófagos

apresentam fenótipo CD14⁺. Os granulócitos, fenótipo CD24⁺, entre eles os neutrófilos apresentam o fenótipo CD24⁺ CD16⁺ CD15⁺.

A CF vem sendo utilizada nas pesquisas sobre imunidade do trato genital apresentando resultados interessantes. Di Fabio e colaboradores (47) coletaram amostras de lavados vaginais de macacas e mostraram que linfócitos e macrófagos estão presentes na vagina destes animais e podem ser identificados pela CF (47). Givan e colaboradores (48) desenvolveram um método para identificação e comparação quantitativa dos leucócitos presentes em biópsias dos diferentes órgãos do trato reprodutor feminino por CF. Os leucócitos representaram 6%-20% do número total de células presentes na vagina, colo uterino, útero e trompas de Falópio, sendo que a vagina e o colo continham menor proporção de leucócitos que o útero e as trompas. Os linfócitos T foram o maior constituinte em todos os tecidos, correspondendo a 30%-60% dos leucócitos, seguido pelos granulócitos, significativamente menos numerosos. Macrófagos e linfócitos B foram claramente detectados, porém em menor quantidade, representando aproximadamente 10% do total de células de cada tecido avaliado (48).

Os leucócitos da cavidade vaginal vêm sendo estudados com a finalidade de melhorar a compreensão sobre a fisiopatologia da resposta imune vaginal. Vários aspectos deste tema já foram pesquisados, porém, a quantificação das células de defesa em condições de normalidade e nas diversas infecções vaginais ainda não foi esclarecida. A CF surge como uma ferramenta útil para se estudar o microambiente genital identificando células, micro-organismos, citocinas, entre outros, além de correlacionar o fenótipo celular à função imune (47). No entanto,

não foram encontrados estudos que utilizaram a técnica para identificar e quantificar as células de defesa do conteúdo vaginal de mulheres com vulvovaginites. A quantificação destas células, se realizada rotineiramente, poderá auxiliar no raciocínio clínico das doenças que causam inflamação vaginal, assim como ocorre em outras partes do corpo. O diagnóstico mais elaborado poderá tornar o tratamento mais efetivo visando não só o agente infeccioso, mas também a manipulação da resposta imunológica, principalmente nos casos recorrentes.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar os leucócitos presentes no conteúdo vaginal de mulheres com vulvovaginites e flora vaginal normal por citometria de fluxo.

2.2. Objetivos específicos

- Identificar e quantificar os leucócitos (neutrófilos, macrófagos, linfócitos TCD4, TCD8, B e NK) presentes no conteúdo vaginal de mulheres com flora normal, vaginose bacteriana e/ou candidíase vulvovaginal e comparar estes achados.
- Avaliar a expressão do marcador de superfície celular CD16 nos neutrófilos do conteúdo vaginal de mulheres com flora normal, vaginose bacteriana e/ou candidíase vulvovaginal e comparar estes achados.

3. Publicações

Artigo 1 – **Identification of immune cells by flow cytometry in vaginal lavages from women with vulvovaginitis and normal microflora**

Paulo César Giraldo^{1,2}, Joziani Beghini Junqueira de Carvalho^{1,2},
Rose Luce Gomes do Amaral², Ana Katherine da Silveira Gonçalves³,
José Eleutério Jr⁴, Fernando Guimarães².

Artigo enviado para: *American Journal of Reproductive Immunology*

Artigo 2 – **Altered CD16 expression on neutrophils from vagina of women with vulvovaginitis**

Joziani Beghini Junqueira de Carvalho^{1,2}, Paulo César Giraldo^{1,2}, Steven
S. Witkin³, Ruth Riboldi², Rose Luce Gomes do Amaral², José
Eleutério Jr⁴, Fernando Guimarães²

Artigo enviado para: *Journal of Leukocyte Biology*

3.1. Artigo 1

Assunto: American Journal of Reproductive Immunology - Manuscript ID AJRI-07-11-128
De: editor.ajri@yale.edu (editor.ajri@yale.edu)
Para: jozibeghini@yahoo.com.br;
Data: Qua, 27 Jul 2011 17:08:05

27-Jul-2011

Dear Dr. Carvalho:

Your manuscript entitled "Identification of immune cells by flow cytometry in vaginal lavages from women with vulvovaginitis and normal microflora" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in the American Journal of Reproductive Immunology.

Your manuscript ID is AJRI-07-11-128.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <http://mc.manuscriptcentral.com/ajri> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/ajri>.

Please complete the attached Copyright Transfer Agreement and return it to our office at Editorial Manager, Yale University School of Medicine, 333 Cedar Street, P.O. Box 208063, LSOG 305, New Haven, CT 06520-8063. Also, kindly fax a signed copy to 203-785-4883 203-785-4883. In order to expedite the publication of your manuscript, it is important that you return the original form as soon as possible with all appropriate signatures (via mail). Your manuscript cannot be published without it.

Thank you for submitting your manuscript to the American Journal of Reproductive Immunology.

Sincerely,
American Journal of Reproductive Immunology Editorial Office

Identification of immune cells by flow cytometry in vaginal lavages from women with vulvovaginitis and normal microflora

Paulo César Giraldo^{1,2}, Joziani Beghini Junqueira de Carvalho ^{1,2}, Rose Luce Gomes do Amaral², Ana Katherine da Silveira Gonçalves³, José Eleutério Jr⁴, Fernando Guimarães².

¹ Departamento de Tocoginecologia, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas University.

² “Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti” - Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher, Campinas University.

³ Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Norte

⁴ Departamento de Saúde Materno-infantil, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará

Address for Correspondence:

Paulo César Giraldo

CAISM – UNICAMP

Rua Alexandre Fleming 101, Cidade Universitária “Zeferino Vaz”.

CEP: 13083-970, Campinas, SP, Brazil.

Telephone: +55 19 35217430, FAX: +55 19 35219306.

Email: giraldo@unicamp.br

Abstract

Problem: Many aspects of the pathophysiology of vulvovaginitis have yet to be elucidated, including the distribution of immune cells in different vaginal infections.

Objective: Identify and quantify by flow cytometry (FC), immune cells present in vagina of women with vulvovaginitis (VV) and with normal microflora. **Subjects**

and Methods: A total of 142 volunteers (34 cases of bacterial vaginosis - BV, 43 cases of vulvovaginal candidiasis - VC, 14 cases of BV associated with VC and 51 cases of normal microflora) were sampled to evaluate the immune cells by FC. Vaginal lavage using 5ml of PBS was performed to assess the immune cells. They were labeled with fluorochrome-conjugated monoclonal-antibodies to identify neutrophils granulocytes, macrophages, CD4 and CD8 T lymphocytes, B lymphocytes and NK lymphocytes. **Results:** Neutrophil granulocytes were the leukocyte population more prevalent among the vaginal lavages (84.6%). The mean percentage of neutrophil granulocytes was higher ($p<0.05$) in VC compared to BV and normal microflora. The mean percentage of neutrophil granulocytes was lower ($p<0.05$) in BV compared to normal microflora. Macrophages and lymphocytes were found in low percentages. The mean percentage of T-CD4 lymphocytes was higher ($p<0.05$) in VC and BV compared to normal microflora. **Conclusions:** Among the leukocytes, neutrophils were the predominant ones and they were associated with VC and inversely with BV. Despite the amount of T-CD4 lymphocytes was lower than the neutrophils, it was associated with VC and BV.

Keywords: cells, leucocytes, vagina, immunity, bacterial vaginosis, vulvovaginal candidiasis, flow cytometry.

Introduction

Vulvovaginitis (VV) is a serious problem in gynecology, increasing public health expenditures and causing damages that may have organic, emotional, social and reproductive implications. In addition, VV is the most frequent disease seen by physicians providing primary health care to women (1,2,3). Bacterial vaginosis (BV) and vulvovaginal candidiasis (VC) are the most frequent VV affecting women of childbearing age (3). BV is a polymicrobial syndrome characterized by an increase in anaerobes and a decrease in lactobacillus microorganisms (4,5,6). It seems to be a critical disturbance in the vaginal ecosystem characterized by an inefficient immune response and not a simple infection (7). Women with this vaginal ecosystem disorder are increasingly susceptible to pelvic infections (8), postsurgical infections (9) and sexually transmitted microorganisms, in particular HIV (10). These women also have a higher risk of adverse outcomes of pregnancy such as preterm birth (11). In clinical practice, about 50% of women with BV are asymptomatic. BV is presented as a thin homogeneous gray white vaginal discharge, and few or no signs of inflammation (4,12), however some studies have shown that some pro-inflammatory cytokines are increased (7,13). The real cause of the absence of the inflammatory response in such infection is still not clear and requires more studies. VC is the second most common cause of VV, being *Candida albicans* responsible for the majority (85%-95%) of symptomatic disease. Among non-albican yeast species *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei* are found less frequently causing infection. The clinical spectrum of VC varies with the degree of local inflammation. Sometimes, the VC cause erythema and swelling of the labia and vulva, as well

as vaginal erythema and an adherent off-white discharge, but sometimes the vaginal mucosa is normal, even in the presence of a great amount of fungus (14).

Vaginal infection and imbalance of vaginal microflora are caused by qualitative and quantitative alterations in microorganisms involved (2). Several mechanisms cooperate to prevent the proliferation of the infectious agents, the most important ones are: vaginal anatomic position, integrity of vaginal mucosa, protective mucus, vaginal pH, normal microflora and local and systemic immunity (15). The mucosal immune response plays an important role to prevent and control the invasion and proliferation of microorganisms. Vaginal epithelial cells and resident macrophages recognize changes in the tissue homeostasis and activate neutrophils, macrophages, dendritic cells, natural killer cells (16,17,18). When this immediate innate immune response cannot combat the spread of infection, alert signals are sent to T and B lymphocytes (16,17). However, immunological responses vary among women implying that VV is not only a consequence of the aggressiveness of microorganisms, but also a consequence of the failure in host defense mechanisms, especially in recurrent cases (19).

The tests used to identify cervicovaginal infections aim to detect etiologic agents, but they do not provide any information about the status of host immune response on the vaginal site (20). Altogether, systemic or localized infections can affect the amount of immune cells circulating in the blood, which can be identified by the hemogram. Hemogram is a blood test that can give an important clue about the intensity and the type of infection (bacterial or viral) and it also can suggest if there are allergic reactions involved. Similarly, in cases of meningitis, the analysis of

immune cells present in the cerebrospinal fluid, can sometimes orient the appropriated therapeutic (21,22). In this context and in order to decode the complex pathophysiology of VV, some studies have reported the composition of vaginal leukocytes in different circumstances (23,24,25,26,27,28,29). Flow cytometry has proved to be a useful tool for this analysis (23,25,29,30), however, this is the first study to our knowledge employing this technology to characterize immune cells present in vaginal lumen comparing women with normal microflora and women with infections. Therefore, standardizing the number and distribution of vaginal defense cells in the various infections can also us to assess the patient's immune status at the time of diagnosis and to carry out more effective and individualized treatments.

The aim of this study was to identify, quantify and compare leukocytes (neutrophil granulocytes, macrophages, CD4, CD8 T lymphocytes, B lymphocytes and NK lymphocytes) present in vaginal lavage of women with BV, VC, BV associated with VC, and women with normal microflora, analyzed by flow cytometry.

Materials and Methods

Subjects and vaginal lavage sampling

A cross-sectional study was conducted in the outpatient clinic of genital tract infections of the “Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti”, the women’s hospital of the Campinas University, Campinas, Brazil. The study was performed from June 2009 to October 2010, and 152 women were included considering the following criteria: women with normal vaginal microflora, women

with BV, women with VC and women with BV associated to VC. All women were of childbearing age and had initiated sexual activity. Women having their menstrual periods, pregnant, using antibiotics and/or antifungals (seven days or less) and with less than 12 hours since the time of last sexual intercourse were not included. Cases with uninterpretable test results and/or inappropriate material collected for analysis were excluded from the study. The study was approved by the Ethics and Research Committee of the Campinas University (Ethic permit no 643/2008), and all subjects signed a written informed consent term.

After the interview, women underwent speculum-based gynecological examination. BV was diagnosed by the Amsel criteria (31) and/or Nugent score ≥ 7 (32). VC was diagnosed by the presence of yeast or hyphae in the vaginal discharge by microscopy using wet mount and/or Gram stained vaginal fluid, and/or by culture positive for *Candida sp* in Sabourand medium. A diagnosis of combined VB and VC was made when both criteria were present in the same woman. Normal vaginal microflora was defined by the presence of type 1 flora (80% or more of lactobacilli) (33) and absence of pathogens in the vaginal discharge evaluated by microscopy of wet mount and Gram stain, in addition to negative fungal culture. Vaginal lavage sampling was performed by washing the vaginal cavity with 5 ml of PBS and retrieving the solution with a syringe. Vaginal lavage samples were further processed for evaluation of immune cells by flow cytometry.

Sample preparation and flow cytometry-based cell phenotyping

Immediately after collection of the vaginal lavage the samples were sent to the laboratory, centrifuged (600g/ 10min), the supernatants discharged and the pellets

were suspended with 4 ml of cold (8-12°C) PBS containing 2% fetal bovine serum (PBS 2% FBS). Samples were homogenized with vortex and a quick centrifugation was performed (600g/ 30seg). One ml was taken from the upper part of the supernatant and transferred to a conical micro-tube (1.5ml capacity). Samples were further washed 3 times (1000g/ 5min) with 1ml of PBS 2% FBS before phenotyping.

Cell staining was performed by mixing 100µl of cell suspensions with appropriate concentrations of fluorochrome-conjugated monoclonal-antibodies (MAb), incubated for 30 minutes at 8-12°C and protected from light. Fluorochrome-conjugated MAbs anti-CD3 (clone HTI3a), anti-CD4 (clone RPA-T4), anti-CD8 (clone RPA-T8), anti-CD14 (clone M5E2), anti-CD15 (clone HI98), anti-CD16 (clone 3G8), anti-CD19 (clone HIB19), anti-CD24 (clone ML5) and anti-CD56 (clone B159) (Becton Dickinson Biosciences, Mountain View, CA, USA) were used alone or in combination. After the incubation period the cells were washed twice (1000g/ 5min) and final cell pellets were suspended with 300µl of PBS 2% FBS. Data acquisition was carried out in a FACSCan (Becton Dickinson, San Jose, USA) cytometer. At least 10.000 cells were acquired for each sample. All samples were acquired by gating the whole leukocyte population after appropriately setting the forward (FSC) and side (SSC) light scatter parameters, according to cell size and granularity. Cytometry analyses were carried out by employing Cell Quest™ (Becton Dickinson, San Jose, USA) and FlowJo™ (Treestar, Ashland, OR, USA) software. A two gating strategy were used for data analyses: Firstly, immune cell populations was determined employing a wide gate (Gate 1) which included whole amount of leucocytes. Secondly, lymphocyte subsets were determined using a narrow gate (Gate 2), over the whole lymphocyte region. Leukocytes subpopulations were identified as

following: Granulocytes CD24⁺, neutrophils CD24⁺ CD15⁺ CD16⁺, macrophages CD14⁺, T CD4 lymphocytes CD3⁺ CD4⁺, T CD8 lymphocytes CD3⁺ CD8⁺, B lymphocytes CD19⁺ and NK lymphocytes CD56⁺.

Statistics

Data were expressed as the mean, median and standard deviation. SAS version 9.2 was the software used for analysis. For qualitative variables, comparisons among the groups were performed by Chi-square or Fisher's Exact test. For quantitative variables, the comparisons among the groups were performed by Kruskal-Wallis test followed Mann-Whitney and by general linear model ANOVA for repeated measures followed by Tukey test. The level of significance was set at <0.05.

Results

Thirty four women were diagnosed with BV, 43 with VC, 14 with BV and VC simultaneously, and 51 with normal vaginal microflora. Ten women were excluded from the study based on our exclusion criteria. The demographic characteristics of the study groups were shown in table 1. Considering the variables analyzed, there was no statistical significant differences among the groups showing their homogeneity.

Leukocytes were assessed in vaginal lavages by flow cytometry. Figure 1 shows the experimental groups in relation to the percentages of different leukocyte populations found in vaginal lavage samples, and shows that leukocyte populations were not ubiquitously distributed among all vaginal lavages. Table 2 shows the whole data regarding the leukocyte populations in relation to the percentage of samples

presenting these cells. Neutrophil granulocytes were the leukocyte population with the highest distribution among the vaginal lavages, and these cells were present in 84.6% of the total analyzed samples. Among the lymphocyte subtypes, T-CD4 had the highest distribution, being present in 33.3% of the total analyzed samples. NK and B lymphocytes were present in 10.5% and 13.5% of vaginal lavage samples respectively, but interestingly most of them belonged to the groups with VV (Table 2).

Statistical calculations to compare the experimental groups in relation to their contents of leukocyte populations were carried out taking into account only the cases in which immune cells were present (Table 3). Thus, the mean percentage of the neutrophil granulocytes was higher in the VC group compared to BV and normal microflora groups ($p < 0.05$). Additionally, the mean neutrophil percentage of the BV group was significantly lower compared with normal microflora ($p = 0.0356$) and VC ($p = 0.0041$) groups. Among the lymphocytes, the presence of CD4 lymphocytes was associated with VV. The mean CD4 lymphocytes percentage found in women with VV (BV $p = 0.0222$ and VC $p = 0.0418$) was significantly higher than in women with normal microflora (Table 3).

Discussion

In this study, we present the distribution of leukocyte populations from the vaginal lumen of women with and without vaginal infections. Among the cells studied we found that neutrophils and CD4 T lymphocytes varied according to the study groups. This suggests that these cells are presented in different percentages in

the vaginal lumen as a consequence of the immune stimulation caused by the pathogen.

All cells in the study, granulocytes (neutrophils), macrophages, and subtypes of lymphocytes (T-CD4, CD8-T, B and NK) were identified by flow cytometry, appointing neutrophil granulocytes as the most frequent cells among the samples. The results were similar to previous study of our group in which were assessed the immune cells present in vaginal smears of women with and without VV by optical microscopy (28). Additionally, we emphasize the advantages of flow cytometry, its accuracy to detect of cells and the ability to distinguish the lymphocyte subsets (TCD4, TCD8, B and NK).

Feitoza et al. (28) observed that the number of neutrophils was significantly higher ($p<0.05$) in VC group than in BV and normal microflora groups. Additionally, the number of neutrophils was significantly lower ($p<0.05$) in BV group compared to the group of women with normal microflora (28). The present study also showed the same relationship among the groups (Table 3), indicating that there are more neutrophils in women with VC than in women with normal microflora and less neutrophils in women with BV than in women with normal microflora.

It is believed that symptomatic candidiasis occurs when the fungus reaches a certain vaginal concentration (34,35). In this situation, the epithelial cells no longer tolerate it and produce chemotactic factors to attract neutrophils to the vagina, thus ending the fungus commensalism relationship and triggering a symptomatic infection. It is presumed that after the infection has been established, the neutrophils attracted to the vagina aren't able to inhibit the fungal proliferation (35). Considering that neutrophils are the predominant cells in inflammatory processes, this fact justifies its

higher prevalence in vaginal lavages from women with VC, where the inflammatory signs are more evident. Moreover, the inability of neutrophils to control fungal infection could contribute to the maintenance of the inflammatory process and perpetuation of the symptomatology. In contrast, BV does not trigger a significant inflammatory response, even though other studies have reported an increase in the pro-inflammatory cytokine IL 1 β in the vaginal fluid. Studies indicate that substances produced by anaerobic bacteria in BV inhibit the migration of neutrophils to the site of infection, which may explain the lower percentage of neutrophil granulocytes in the group of women with BV (7,13,36). Considering the number of neutrophils in BV associated with VC group, there was no significant statistical difference when compared with the other groups, probably due to the small number of cases in the group. However, we hypothesized that together, both infections, may nullify the effect of each other, thus observing an intermediate response.

Considering the macrophages, our results were similar to the Feitoza et al. (28). These cells were absent in most samples and in low percentages when present. By taking into account the lymphocytes, these cells were absent in most samples as it was in the study of Feitoza and colleagues. However, in the present study it was possible to identify the different subtypes of lymphocytes. (28). The fact that we found a higher percentage of CD4 T lymphocytes in BV and VC groups (Table 3) our study suggests that the activated response in these instances is cellular immunity.

Other studies evaluated the immune cells present in the vaginal tissue obtained from biopsies of the vaginal mucosa in humans. The predominant immune cells in the tissue were T lymphocytes, and CD8 T lymphocytes were more frequent

than CD4. Neutrophils, macrophages, B lymphocytes and NK cells appeared in low frequency or were absent (23,27). In contrast, the predominant immune cells present in the vaginal lumen, obtained by scraping the wall in Feitoza et al. study (28) and by vaginal lavages in the present study, were the neutrophils. In these samples, lymphocytes occurred at low frequency or were absent. These data indicate that there are differences in the distribution of immune cells according to the compartment analyzed, considering the vaginal tissue or lumen. Moreover, it is suggested that the adaptive immune response may be more effective in vaginal tissue while the innate response is predominant in the vaginal lumen, taking into account that neutrophils are the main effector cells of the innate immune response.

An interesting point to be highlighted is that, there are few studies showing the distribution of immune cells in vaginal cavity from women with normal microflora and VV. However, to establish the acceptable range for this type of cells in the vaginal lumen it will be necessary to conduct newer and larger studies in the future. Another point to be emphasized is that flow cytometry, a very efficient technique for diagnosis of other diseases, was used for the first time in this study to analyze the vaginal content from women with VV. The present study is proposing a new way to deal with the pathophysiology and diagnosis of vaginal infections. Moreover, the possibility of immunological evaluation at diagnosis will enable the development of new treatments focused not only on the infectious agent, but also on the manipulation of the immune response.

In conclusion, leukocyte populations present in vaginal lumen of women with VV and normal microflora were characterized. Neutrophil granulocytes were the most prevalent immune cells and were associated with VC and inversely

with BV. Macrophages, T-CD4, T-CD8, B and NK lymphocytes were absent in most of the samples. Despite the amount of T-CD4 lymphocytes was lower than the neutrophils, it was associated with VC and BV.

Conflict of interest

There are no potential conflicts of interest to disclose. The authors alone are responsible for writing the paper and its content.

Acknowledgements

The project was funded by the Research Support Foundation of São Paulo – FAPESP – Project n. 2008/09853-8. We would like to thank Sirlei Moraes for assisting in the statistical calculations, Eliane M. Brolazo and Ruth Riboldi for technical support.

References

1. Duarte G, Landers DV. Vulvovaginites: aspectos epidemiológicos. J Bras Doenças Sex Transm 1998; 9:4-14.
2. ACOG technical bulletin. Vaginitis. Number 226-July 1996 (replaces No. 221, March 1996). Committee on Technical Bulletins of the American College of Obstetricians and Gynecologists. Int J Gynaecol Obstet 1996; 54(3):293-302.
3. Nyirjesy P. Vulvovaginal candidiasis and bacterial vaginosis. Infect Dis Clin N Am 2008; 22:637-52.
4. Sobel JD. Bacterial vaginosis. Ann Rev Med 2000; 51:349-56.
5. Verstraelen H, Verhelst R, Claeys G, Temmerman M, Vaneechoutte M. Culture-independent analysis of vaginal microflora: the unrecognized association of Atopobium vaginae with bacterial vaginosis. Am J Obstet Gynecol 2004; 191:1130-2.

6. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines 2010. Diseases Characterized by Vaginal Discharge. Bacterial Vaginosis. <http://www.cdc.gov/std/treatment/2010/default.htm>
7. St John E, Mares D, Spear GT. Bacterial vaginosis and host immunity. *Curr HIV/AIDS Rep* 2007; 4(1):22-8.
8. Sweet RL. Gynecologic conditions and bacterial vaginosis: implications for the non-pregnant patient. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2000; 8:184-90.
9. Guaschino S, De Santo D, De Seta F. New perspectives in antibiotic prophylaxis for obstetric and gynecologic surgery. *J Hosp Infect* 2002; 50(Suppl A):S13-6.
10. Sewankambo N, Gray RH, Wawer MJ, Paxton L, McNaim D, Wabwire-Mangen F, et al. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet* 1997; 350:546–50.
11. McGregor JA, French JL. Bacterial vaginosis in pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 2000; 55: S1-19.
12. Donders G. Diagnosis and management of bacterial vaginosis and other types of abnormal vaginal bacterial flora: a review. *Obstet Gynecol Surv* 2010; 65(7):462-73.
13. Cauci S, Guachino S, De Aloysio D, Driussi S, De Santo D, Penacchioni P, et al. Interrelationships of interleukin-8 with interleukin-1beta and neutrophils in vaginal fluid of healthy and bacterial vaginosis positive women. *Mol Hum Reprod* 2003; 9(1):53-8.
14. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 2007; 369(9577):1961-71.
15. Giraldo PC, Gonçalves AKS, Eleutério J Jr. Mecanismos de defesa da mucosa genital feminina. In: Peixoto S. **Infecção genital na mulher**. São Paulo: Editora Roca Ltda; 2005. p.37-41.
16. Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Rev* 2005; 206:306-35.

17. Ledger WJ, Witkin SS. Vaginal immunity. In: Ledger WJ, Witkin SS. **Vulvovaginal infections**. Washington: ASM Press; 2007. p.12-5.
18. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature Rev Immunol* 2010; 10:427-39.
19. Giraldo PC, Feitoza SBN, Gonçalves AKS, Cornetta MCM, Eleutério Jr J, Tristão AR. A resposta imune celular da mucosa vaginal às vulvovaginites. *J bras Doenças Sex Transm* 2006; 18(4):263-5.
20. Giraldo PC, Gonçalves AKS, Linhares IM, Cornetta MCM, Giraldo HPD. Corrimento genital. Diagnósticos clínicos e laboratoriais. In: Martins NV, Ribalta JCL. **Patologia do trato genital inferior**. São Paulo: Editora Roca Ltda; 2005. p.124-9.
21. BalcellsGorina A. Exames de sangue. Hematologia clínica. **A clínica e o laboratório**. Rio de Janeiro: Medsi; 1996. p.121-58.
22. BalcellsGorina A. Exame do líquido cefalorraquidiano. **A clínica e o laboratório**. Rio de Janeiro: Medsi; 1996. p. 213-9.
23. Givan AL, White HD, Stern JE, Colby E, Gosselin EJ, Guyre PM, et al. Flow cytometric analysis of leukocytes in the human female reproductive tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix, and vagina. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38(5):350-9.
24. Patton DL, Thwin SS, Meir A, Hooton TM, Stapleton AE, Eschenbach DA. Epithelial cell layer thickness and immune cell populations in the normal human vagina at different stages of the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183(4):967-73.
25. White HD, Prabhala RH, Humphrey SL, Crassi KM, Richardson JM, Wira CR. A method for the dispersal and characterization of leukocytes from the human female reproductive tract. *Am J Reprod Immunol* 2000; 44(2):96-103.
26. Ma Z, Lü FX, Torten M, Miller CJ. The number and distribution of immune cells in the cervicovaginal mucosa remain constant throughout the menstrual cycle of rhesus macaques. *Clin Immunol* 2001; 100(2):240-9.

27. Ildgruben AK, Sjöberg IM, Hammarström ML. Influence of hormonal contraceptives on the immune cells and thickness of human vaginal epithelium. *Obstet Gynecol* 2003; 102(3):571-82.
28. Feitoza SBN, Giraldo PC, Gonçalves AKS, Amaral RLG, Eleutério Jr J, Tristão A, et al. Identificação e quantificação de células de defesa na mucosa vaginal de mulheres com vaginose bacteriana, candidíase vaginal e sem vulvovaginites. *Rev Bras Genitoscopia* 2009; 3(3-4):76-9.
29. Di Fabio S, Corrias F, Monardo F, Titti F. Flow cytometry analysis of immune cell populations isolated from cervicovaginal secretions of cynomolgus monkeys. *J Immunol Methods* 2004; 284(1-2):7-14.
30. Schultheiss T, Stolte-Leeb N, Sopper S, Stahl-Hennig C. Flow cytometric characterization of the lymphocyte composition in a variety of mucosal tissues in healthy rhesus macaques. *J Med Primatol* 2011; 40(1):41-51.
31. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983; 74:14-22.
32. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991; 29:297-301.
33. Spiegel CA, Amsel R, Holmes KK. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct Gram stain of vaginal fluid. *J Clin Microbiol* 1983; 18:170-7.
34. Giraldo P, von Nowaskonski A, Gomes FA, Linhares I, Neves NA, Witkin SS. Vaginal colonization by *Candida* in asymptomatic women with and without a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Obstet Gynecol*. 2000; 95(3):413-6.
35. Fidel PL Jr. History and update on host defense against vaginal candidiasis. *Am J Reprod Immunol* 2007; 57(1):2-12.
36. Mirmonsef P, Gilbert D, Zariffard MR, Hamaker BR, Kaur A, Landay AL, Spear GT. The effects of commensal bacteria on innate immune responses in the female genital tract. *Am J Reprod Immunol* 2011; 65(3):190-5.

Table 1. Demographic characteristics of the subjects studied

	Normal MF n=51	BV n=34	VC n=43	BV+VC n=14	p-value
White race	36 (70.6%)	18 (52.9%)	27 (62.8%)	6 (42.9%)	0.1791 ¹
Age Mean (±sd)	32.6 (8.0)	31.4 (8.5)	32.1 (8.8)	29.7 (6.2)	0.6616 ³
Years of formal education Mean (± sd)	11.8 (4.3)	11.0 (3.7)	10.8 (4.2)	10.1 (3.8)	0.275 ³
Pregnancy					0.7700 ²
0-1	33 (64.7%)	19 (55.9%)	24 (55.8%)	9 (64.3%)	
2 or +	18 (35.3%)	15 (44.1%)	19 (44.2%)	5 (35.7%)	
Parity					0.6889 ²
0-1	35 (68.6%)	19 (55.9%)	28 (65.1%)	9 (64.3%)	
2 or +	16 (31.4%)	15 (44.1%)	15 (34.9%)	5 (35.7%)	
Abortion					0.8352 ¹
No	44 (86.3%)	26 (76.5%)	34 (79.1%)	13 (92.9%)	
Yes	7 (13.8%)	8 (23.5%)	9 (20.9%)	1 (7.1%)	
Contraceptive method					0.2704 ¹
Combined hormonal contraceptive	22 (43.1%)	10 (29.4%)	18 (41.9%)	6 (42.9%)	
Progestin only contraceptive	1 (2.0%)	2 (5.9%)	2 (4.7%)	0	
Condom	7 (13.7%)	4 (11.8%)	6 (14.0%)	1 (7.1%)	
Intrauterine device	0	4 (11.8%)	0	2 (14.3%)	
Other or none	21 (41.2%)	14 (41.2%)	17 (39.5%)	5 (35.7%)	
Smokers	4 (7.8%)	8 (23.5%)	6 (14%)	3 (21.4%)	0.2099 ²
Age of first sexual intercourse Mean (±sd)	17.9 (3.6)	17.5 (2.7)	17.5 (2.5)	16.1 (1.5)	0.1972 ³
Sexual partners last 6 month					0.1887 ¹
0 and 1	48 (94.1%)	28 (82.4%)	35 (81.4%)	13 (92.9%)	
2 or +	3 (5.9%)	6 (17.6%)	8 (18.6%)	1 (7.1%)	
Current sexual activity					0.5953 ¹
No	5 (9.8%)	5 (14.7%)	4 (9.3%)	0	
Yes	46 (90.2%)	29 (85.3%)	39 (90.7%)	14 (100%)	

Normal microflora (MF), bacterial vaginosis (BV), vulvovaginal candidiasis (VC), BV associated with VC (BV+VC). ¹Fisher's Exact test, ²Chi-square test, ³Kruskal-Wallis test. $p < 0.05$.

Table 2. Presence of different leukocyte populations in vaginal lavage samples

	Total		Normal MF		BV		VC		BV+VC		p-value
	n	%	N	%	n	%	n	%	n	%	
Granulocytes (CD24)											0.1873
Absent	20	15.1	10	20.8	2	6.3	5	12.5	3	25.0	
Present	112	84.9	38	79.2	30	93.8	35	87.5	9	75.0	
Neutrophils (CD15 CD16)											0.1960
Absent	20	15.4	10	20.4	2	6.5	5	12.8	3	27.3	
Present	110	84.6	39	79.6	29	93.5	34	87.2	8	72.7	
Macrophages (CD14)											0.8793*
Absent	97	75.8	35	79.5	25	75.8	30	73.2	7	70.0	
Present	31	24.2	9	20.5	8	24.2	11	26.8	3	30.0	
T CD4 lymphocytes (CD4)											0.9960*
Absent	64	66.7	12	66.7	21	67.7	24	66.7	7	63.6	
Present	32	33.3	6	33.3	10	32.3	12	33.3	4	36.4	
T CD8 lymphocytes (CD8)											0.8847
Absent	72	75.0	13	72.2	22	71.0	28	77.8	9	81.8	
Present	24	25.0	5	27.8	9	29.0	8	22.2	2	18.2	
B lymphocytes (CD19)											0.6686
Absent	83	86.5	17	94.4	25	80.6	31	86.1	10	90.9	
Present	13	13.5	1	5.6	6	19.4	5	13.9	1	9.1	
NK lymphocytes (CD56)											0.3704
Absent	85	89.5	18	100	27	87.1	31	88.6	9	81.8	
Present	10	10.5	0	0.0	4	12.9	4	11.4	2	18.2	

Normal microflora (MF), bacterial vaginosis (BV), vulvovaginal candidiasis (VC), BV associated with VC (BV+VC). Fisher's exact test and Chi-square test*. $p < 0.05$.

Table 3. Mean percentage of each leukocyte population present in vaginal lavage samples

	Normal MF			BV			VC			BV+VC			p-value
	n	mean	sd	n	mean	sd	n	mean	sd	n	mean	sd	
Granulocytes (CD24)	38	48.15	24.88	30	32.43	21.04	35	58.44	23.47	9	46.83	27.77	0.0010
Neutrophils (CD15 CD16)	39	47.62	24.05	29	34.34	21.49	34	53.64	26.38	8	46.87	26.69	0.0209
Macrophages (CD14)	15	2.91	7.69	13	2.38	3.75	15	1.26	1.44	4	1.59	1.60	0.8166
T CD4 lymphocytes (CD4)	6	2.86	2.30	10	9.99	6.99	12	12.10	12.82	4	8.04	2.92	0.0473
T CD8 lymphocytes (CD8)	5	9.08	9.65	9	17.99	22.09	8	8.19	5.72	2	2.72	0.95	0.5619
B lymphocytes (CD19)	1	0.60		6	6.65	5.70	5	8.83	3.65	1	10.26		0.3009
NK lymphocytes (CD56)	0			4	8.37	6.62	4	10.31	4.45	2	4.00	2.18	0.3596

Normal microflora (MF), bacterial vaginosis (BV), vulvovaginal candidiasis (VC), BV associated with VC (BV+VC). Kruskal-Wallis test followed Mann-Whitney. $p < 0.05$: Granulocytes (CD24): Normal MF x VC, Normal MF x BV, VC x BV. Neutrophils (CD15 CD16): Normal MF x BV, VC x BV. TCD4 lymphocytes (CD4): Normal MF x VC, Normal MF x BV. All other comparison: $p > 0.05$.

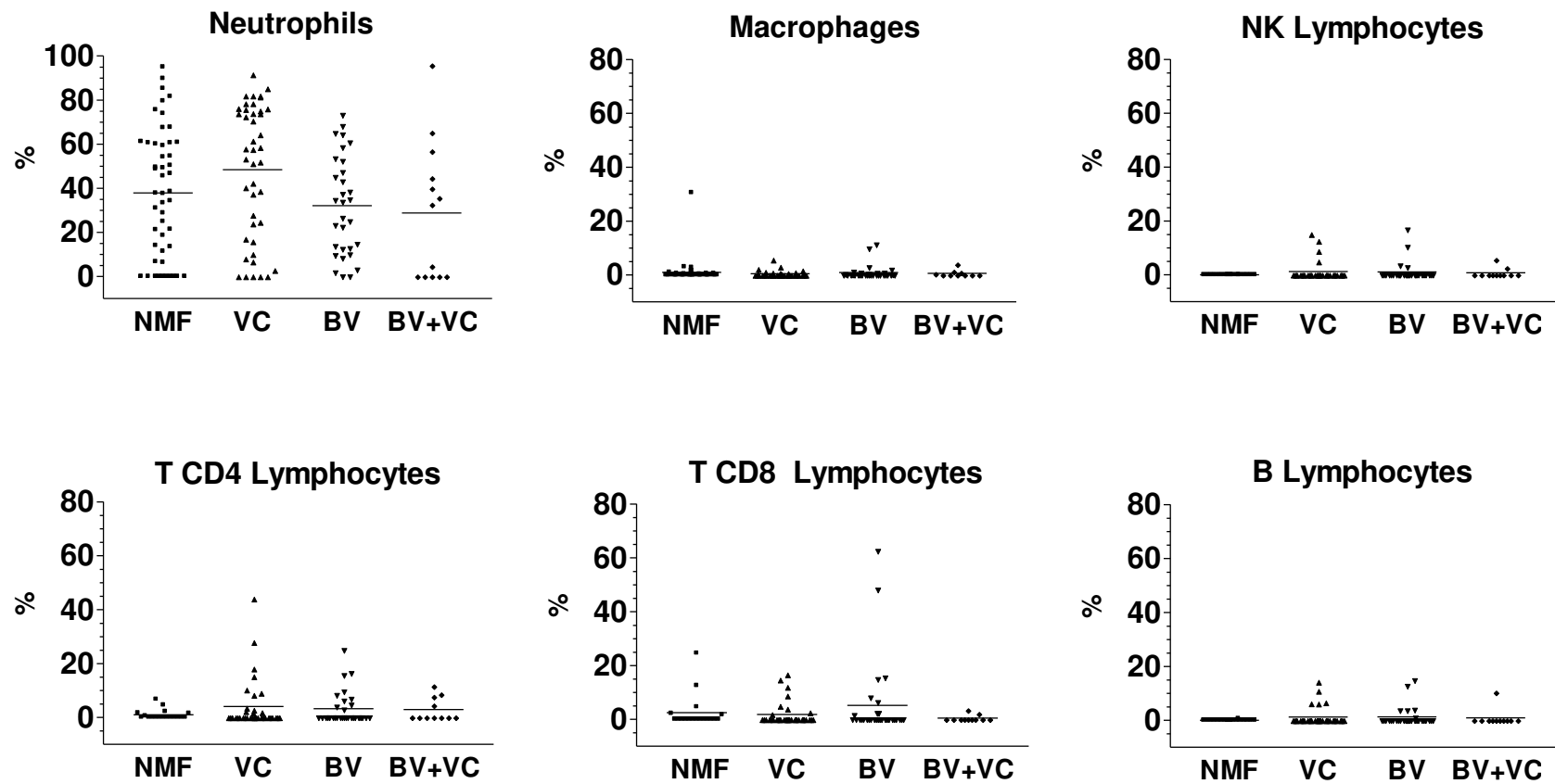


Figure 1. Frequencies of different leukocyte populations (Neutrophils $CD15^+CD16^+$, T lymphocytes $CD4^+$, T lymphocytes $CD8^+$, B lymphocytes $CD19^+$ and NK cells $CD56^+$) present in vaginal lavage samples from women with normal microflora (NMF), bacterial vaginosis (BV), vulvovaginal candidiasis (VC), BV associated with VC (BV+VC).

3.2. Artigo 2

Assunto: 4A0711-370 Receipt of Paper by Journal of Leukocyte Biology
De: jlb@journalstaff.com (jlb@journalstaff.com)
Para: jozibeghini@yahoo.com.br;
Data: Qui, 21 Jul 2011 20:19:46

Dear Joziani Carvalho,

On July 21, 2011 we received your manuscript entitled "ALTERED CD16 EXPRESSION ON VAGINAL NEUTROPHILS FROM WOMEN WITH VULVOVAGINITIS" by Joziani Carvalho, Paulo César Giraldo, Ruth Riboldi, Rose Amaral, José Eleutério Jr., Steven Witkin, and Fernando Guimarães. The manuscript has been assigned the Paper #: 4A0711-370.

All communications regarding this paper will be with your corresponding author, however, you will be notified once a decision is rendered. Should you have any questions, please contact the corresponding author or the JLB Managing Editor at jlb@journalstaff.com.

Thank you for submitting your work to the Journal of Leukocyte Biology.

Sincerely,

Luis J. Montaner, D.V.M., M.Sc., D.Phil.
Editor-In-Chief
Journal of Leukocyte Biology
9650 Rockville Pike
Bethesda, MD 20814-3998

Altered CD16 expression on neutrophils from vagina of women with vulvovaginitis

Joziani Beghini Junqueira de Carvalho^{1,2}, Paulo César Giraldo^{1,2}, Steven S. Witkin³, Ruth Riboldi², Rose Luce Gomes do Amaral², José Eleutério Jr⁴, Fernando Guimarães²

¹. Departamento de Tocoginecologia, Faculdade de Ciências Médicas, Campinas University.

² “Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti” - Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher, Campinas University.

³ Division of Immunology and Infectious Diseases, Department of Obstetrics and Gynecology, Weill Medical College of Cornell University.

⁴ Departamento de Saúde Materno-infantil, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará.

Address for Correspondence:

Fernando Guimarães

CAISM – UNICAMP

Rua Alexandre Fleming 101, Cidade Universitária “Zeferino Vaz”

CEP: 13083-970, Campinas, SP, Brazil

Telephone: +55 19 35219462, FAX: +55 19 35219433

Email: fernando@caism.unicamp.br

Abstract

Neutrophils can be observed in the human vagina, being the first line of defense against fungal and bacterial infections. CD16 down-regulation has been reported in neutrophils undergoing apoptosis, indicating this as a surface marker for tracking the apoptosis process. This study aimed to compare the expression of CD16 molecules on neutrophils from the vagina of women with normal microflora and vulvovaginitis (VV). Vaginal lavages were sampled from volunteers diagnosed with bacterial vaginosis (BV, n=34), vulvovaginal candidiasis (VC, n=43), BV and VC simultaneously (n=14), and women with normal microflora (n=51). Neutrophils in vaginal lavages were identified by the expression of CD15, CD16 and CD24 surface markers assessed by flow cytometry. CD16 expression was significantly higher on neutrophils from women with VV (BV $p < 0.0001$; VC $p = 0.01$; BV associated with VC $p = 0.0027$) compared to women with normal microflora. Considering only women with VV, CD16 expression was significantly higher ($p = 0.0273$) in BV than in VC. In conclusion, CD16 expression on vaginal neutrophils from women with BV and VC was higher than observed in women with normal microflora. This observation may be explained by a reduction in CD16 down-regulation, which also indicates a delay of neutrophil apoptosis in women with VV.

Keywords: neutrophil, apoptosis, CD16, vulvovaginitis, bacterial vaginosis, vulvovaginal candidiasis, flow cytometry

Introduction

Vulvovaginitis (VV) represents the most common problem in gynecology clinics, causing considerable public health expenditures plus additional emotional, social and reproductive implications (1). The most frequent VV affecting women of childbearing age is bacterial vaginosis (BV) (2). BV is a polymicrobial syndrome characterized by the replacing of a lactobacillus-dominated flora with massive amounts of bacteria such as *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus sp*, *Mycoplasma hominis*, *Atopobium vaginae* and gram-positive anaerobic rods (*Prevotella sp*, *Bacteroides sp*, *Porphyromonas sp*) (3,4). Women with this disordered vaginal ecosystem have increased susceptibility to pelvic infections (5), postsurgical infections (6) and sexually transmitted diseases including HIV (7). These women also have a higher risk of adverse outcomes of pregnancy such as preterm birth (8). Vulvovaginal candidiasis (VC) is the second most common cause of VV and *Candida albicans* is responsible for the vast majority (85%-95%) of symptomatic disease. Among the non-albicans yeast species *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, and *Candida krusei* are the less frequently found causing infection (9).

Although the vaginal cavity is often exposed to microorganisms, for a clinical infection to appear local defense mechanisms may have to be compromised. The fact that some microorganisms remain as commensals while others cause infection is determined by an interaction of the following factors: normal endogenous microbial ecosystem, intact epithelial barrier and components of the local genital tract immune system (10). In the vaginal cavity, the innate immune system plays an important role to prevent and control pathogen invasion. Vaginal epithelial and

immune cells have surface receptors called Toll-like receptors (TLRs) that recognize invariant components of many microbial invaders, and their activation trigger an immune response (10,11). Neutrophils are the first and most abundant cells recruited from the bloodstream to the vaginal cavity, and are responsible for the phagocytosis of microorganisms (11). In the circulation, neutrophils have a short life span (less than 24 hours), but in injured tissues, survival is prolonged by exposure to inflammatory mediators, which leads to a delay in neutrophil apoptosis, enabling their prolonged function. Physiologically, neutrophils contribute to the inflammatory response, but regulatory mechanisms are required to limit the extent of inflammation and restore tissue homeostasis (12,13,14,15). One such mechanism is programmed cell death, apoptosis. Apoptotic cells undergo several characteristic alterations, including cell membrane alterations which allow their recognition by phagocytes (13,14,15). A reduction in CD16 expression has been reported in neutrophils undergoing apoptosis, indicating this molecule as a surface marker for tracking the apoptosis process (15,16,17). CD16 is a cell surface molecule encoded by the Ig superfamily genes (FcγRIII), and is expressed on NK cells, neutrophils and macrophages.

In the course of studies on immune cells present in the vaginal lumen of women with and without VV, we observed that CD16 expression on vaginal neutrophils varied among samples. The aim of this study was to compare the expression of CD16 on neutrophils from the vagina of women with normal microflora and women with VV, including BV, VC and BV associated with VC, by using flow cytometry.

Materials and Methods

Subjects and vaginal lavage sampling

A cross-sectional study was conducted in the outpatient clinic of genital tract infections of the “Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti” the women’s hospital of the Campinas University (Unicamp), Campinas, Brazil. The study was performed from June 2009 to October 2010, and 152 women were included considering the following criteria: women with normal vaginal microflora, women with BV, women with VC and women with BV associated to VC. All women were of childbearing age and had initiated sexual activity. Women having their menstrual periods, pregnant, using antibiotics and/or antifungals (seven days or less) and with less than 12 hours since the time of last sexual intercourse were not included. Cases with uninterpretable test results and/or inappropriate material collected for analysis were excluded from the study. The study was approved by the Ethics and Research Committee of the Campinas State University (Ethic permit no 643/2008), and all subjects signed a written informed consent term.

After an interview, women underwent a speculum-based gynecological examination. BV was diagnosed by the Amsel criteria (18) and/or Nugent score ≥ 7 (19). VC was diagnosed by the presence of yeast or hyphae in the vaginal discharge by microscopy using wet mount and/or Gram-stain of vaginal fluid, and/or by culture positive for *Candida* sp in Sabourand medium. A diagnosis of combined VB and CV was made when both criteria were present in the same woman. Normal vaginal microflora was defined by the presence of type 1 flora (80% or more of lactobacilli) (20) and absence of pathogens in the vaginal discharge evaluated by microscopy of wet mount and Gram stain, in addition to a negative

fungal culture. Vaginal lavage sampling was performed by washing the vaginal cavity with 5 ml of PBS (phosphate buffer solution: 0.15M, pH 7.2: NaCl 0.137M; KCl 0.0027M; Na₂HPO₄ 0.008M; KH₂PO₄ 0.0015M) and retrieving the solution with a syringe. Vaginal lavage samples were further processed for evaluation of immune cells by flow cytometry.

Sample preparation and flow cytometry-based cell phenotyping

Immediately after collection of the vaginal lavage the samples were sent to the laboratory, centrifuged (600g/ 10min), the supernatants discarded and the pellets were suspended in 4ml cold (8-12°C) PBS containing 2% fetal bovine serum (PBS 2% FBS). Samples were homogenized with a vortex and a quick centrifugation was performed (600g/ 30sec). One ml was taken from the upper part of the supernatant and transferred to a conical micro-tube (1.5ml capacity). Samples were further washed 3 times (1000g/ 5min) with 1ml of PBS 2% FBS before phenotyping.

Cells staining was performed by mixing 100µl of cell suspensions with appropriate concentrations of fluorochrome-conjugated monoclonal-antibodies (MAb), and incubated for 30 minutes at 8-12°C and protected from light. Fluorochrome-conjugated MAbs anti-CD15 (clone HI98), anti-CD16 (clone 3G8) and anti-CD24 (clone ML5) (Becton Dickinson Biosciences, Mountain View, CA, USA) were used alone or in combination. After the incubation period the cells were washed twice (1000g/ 5min) and final cell pellets were suspended in 300µl of PBS 2% FBS. Data acquisition was carried out in a FACSCan (Becton Dickinson, San Jose, USA) cytometer. At least 10.000 cells were acquired for each sample. All samples were analyzed by gating the granulocyte population after setting appropriately the

forward (FSC) and side (SSC) light scatter parameters, according size and granularity of the cells. Neutrophils were identified by the expression of CD24, CD15 and CD16 surface markers. CD16 down-regulation was assessed by mean fluorescence intensity (MFI). Cytometry analyses were carried out by employing Cell Quest™ (Becton Dickinson, San Jose, USA) and FlowJo™ (Treestar, Ashland, OR, USA) software.

Statistics

Data were expressed as the mean, median and standard deviation. SAS version 9.2 was the software used for analysis. Variables were compared between groups, using the Kruskal-Wallis test followed by the Mann-Whitney test. The level of significance was set at <0.05.

Results

To study the expression of CD16 on vaginal neutrophils from the vaginal cavity of women with VV and normal microflora, vaginal lavage samples were collected from 152 women who underwent a speculum-based gynecological examination. Following clinical and laboratory evaluation, 34 women were diagnosed with BV, 43 with VC, 14 with BV and VC simultaneously, and 51 with normal vaginal microflora. Ten women were excluded from the study based on exclusion criteria.

Flow cytometry allowed the quantification of granulocytes (CD24⁺) present in the vaginal lavages from women with VV and normal microflora. The average percentage of granulocyte was significantly higher ($p=0.031$) in women with VC ($51.1\% \pm 29.4$, median=61.6) compared to women with normal microflora

(38.1% $\pm$ 29.6, median=38.4) and women with BV (30.4% $\pm$ 21.9, median=27.4) (Figure 1). Although the percentages of granulocytes in the vaginal lavages from women with BV associated with VC did not differ significantly from the other groups, the granulocyte percentages of this group tended towards the levels observed for women with normal microflora and women with BV. Granulocyte population was characterized as CD15⁺CD16⁺ cells, indicating that neutrophil is the main leukocyte population present in vaginal lavages. CD16 expression on vaginal neutrophils varied among the samples. Figure 2 depicts CD16 expression variation by presenting flow cytometry profiles of two different vaginal lavage samples, one taken from a BV patient (#112) with high expression of CD16 and another taken from a VC patient (#130) with low CD16 expression. CD16 expression on neutrophils was evaluated by mean fluorescence intensity (MFI) and results are presented in Figure 3. The MFI of the CD16 molecule was higher in neutrophils in vaginal lavages from women with VV compared to women with normal microflora. MFI of the CD16 was significantly higher ($p<0.05$) in neutrophils in vaginal lavages from women with BV (269.95 $\pm$ 287.58, median=164.39) and women with VC (156.18 $\pm$ 231.72, median=61.35) compared to women with normal microflora (80.69 $\pm$ 109.54, median=32.26). Considering only women with VV, CD16 expression was significantly higher ($p=0.0273$) in BV than in VC. In addition, the MFI of the CD16 on neutrophils in vaginal lavages from women with BV associated with VC (250.98 $\pm$ 252.01, median=134.18) was significantly higher ($p=0.0027$) compared to women with normal microflora (Figure 3).

Discussion

In this study, we demonstrated that CD16 expression on neutrophils present in the vagina appear to be affected by *Candida* infection and by alteration in the vaginal bacterial flora (BV). CD16 expression on neutrophils from women with VV was not only higher compared to women without infections, but also varied according to clinical diagnosis. Our observations can be explained by a reduction in CD16 down-regulation, which also indicates reduced neutrophil apoptosis, in women with VV.

Down-regulation of the CD16 expression is a physiological cell membrane alteration observed in neutrophils, mostly associated with apoptosis (15,16,17). This programmed cell neutrophil death is essential for the resolution of inflammation because it prevents tissue damage caused by the prolonged presence of these activated cells at the site of inflammation (12,14). Therefore, understanding of the local defense mechanisms, particularly those involving neutrophils and their apoptosis, have special significance since manipulation may enable more effective treatments for infections and control of inflammation.

Neutrophil apoptosis may be delayed, induced or enhanced by microorganisms, depending on the immune evasion strategies developed and health of the host encountered by these microorganisms (14). During the initial phase of a microbial infection, the release of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, and GM-CSF) enhance activation and survival of neutrophils and facilitate their accumulation to fight infection (21). After phagocytosis of bacterial and/or interaction with bacterial products, neutrophils initiate the apoptotic process allowing their phagocytosis by macrophages and resolution of inflammation (13,21).

In general, studies have shown that most bacteria can induce neutrophil apoptosis. However, it is known that several bacterial compounds, including lipopolysaccharide (LPS), may delay neutrophil apoptosis (21). Song et al. (17) reported that *Trichomonas vaginalis* lysate delays human neutrophil apoptosis while the viable *T. vaginalis* trophozoites accelerate apoptosis (17). The water-soluble surface proteins of *Helicobacter pylori*, a bacterium that causes persistent infiltration of neutrophils in gastric mucosa, was shown to inhibit neutrophil apoptosis (22). Inhibition of neutrophil apoptosis was also reported to occur in infections with intracellular parasites such as *Leishmania major* and *Toxoplasma gondii* (23,24). A recent study showed that *Lactobacillus* sp and *Bifidobacterium* sp have an apoptogenic effect on neutrophils (25), which might be related to an immune evasion mechanism since both bacteria are residents of the vagina.

However, most of the studies reporting the effect of infections on neutrophil life-span were performed with neutrophils isolated from peripheral blood followed by in vitro exposure of these neutrophils to different microorganisms or microbial components. In contrast, in our study CD16 expression was assessed in neutrophils present in fresh vaginal lavages obtained from women with VV and women with normal vaginal microflora. Therefore, the alterations observed in neutrophil CD16 expression resulted from factors present in the vaginal environment. The lowest mean CD16 expression found in this study was in neutrophils present in vaginal lavages from women with normal vaginal flora (without VV). This observation is compatible with down-regulation of CD16 expression being associated with neutrophil apoptosis, and supports what was previously reported that *Lactobacillus* sp have an apoptogenic effect on neutrophils (25). The induction of apoptosis by

lactobacilli might be a component of an immune evasion mechanism since these bacteria are the most common microorganism present in vaginal microflora. In contrast, neutrophils associated with VV had a significantly higher expression of CD16 molecule compared to women with normal microflora. This observation is compatible with an increased life-span of neutrophils as a consequence of BV and/or VC infections. In addition, the highest average expression of CD16 was found on neutrophils present in vaginal lavages from women with BV (Figure 3).

Neutrophils release a cytotoxic and proteolytic cocktail that allows effective killing of invading microorganisms. However, tissues at the site of this release can be damaged by prolonged exposure to the neutrophils products (12,14,21). Therefore, in this study it was observed that neutrophils associated with both, BV and VC have higher CD16 expression imply that they have prolonged life-spans that could damage the vaginal mucosa. Nevertheless, more intense inflammatory signs, detected by the presence of erythema in the vaginal mucosa, were significantly higher ($p<0.0001$) in women with candidiasis (VC=32.6% and BV plus VC=57.1%), in comparison to women with BV (2.9%) or with normal microflora (0.0%). A possible explanation for this observation may be related to the proportions of neutrophil granulocytes found in the vaginal lavages among women with BV, VC and normal microflora. In women with BV, the proportion of neutrophil granulocytes found in vaginal lavages was similar to that found in women with normal microflora, while in women with VC the proportion was significantly higher (Figure 1).

TLRs are the main receptors engaged in the innate immune response against microorganisms in the vagina. TLR4 recognizes lipopolysaccharides (LPS) present in gram-negative bacteria, triggering an immune response in BV (26). Engagement of

TLR4 by its ligands has been reported to delay neutrophil apoptosis (27,28,29). An opposite effect, i.e. induction of neutrophil apoptosis, has been attributed to short-chain fatty acids (SCFA), which are produced by anaerobic bacteria and can be detected in high concentrations in vaginal lavages from women with BV (30). Nevertheless, based on our results, the high CD16 expression found on neutrophils in vaginal lavages from women with BV seems to indicate a delayed apoptosis of neutrophils, suggesting that TLR4 stimulation was predominant over SCFA production in the vaginal environment.

In conclusion, CD16 expression on neutrophils present in the vagina of women with BV and VC was higher than observed in women with normal microflora. This observation may indicate a reduction in CD16 down-regulation, leading to a delay of neutrophil apoptosis and neutrophil-mediated tissue damage in women with VV.

Conflict of interest

There are no potential conflicts of interest to disclose. The authors alone are responsible for writing the paper and its content.

Acknowledgements

The project was funded by the Research Support Foundation of São Paulo – FAPESP – Project n. 2008/09853-8. Ruth Riboldi was the recipient of a FAPESP fellowship 2010/05767-0. We would like to thank Sirlei Moraes for assisting in the statistical calculations and Eliane M. Brolazo for technical support.

References

1. Duarte G, Landers DV. Vulvovaginites: aspectos epidemiológicos. J Bras Doenças Sex Transm 1998; 9:4-14.
2. Nyirjesy P. Vulvovaginal candidiasis and bacterial vaginosis. Infect Dis Clin N Am 2008; 22:637-52.
3. Sobel JD. Bacterial vaginosis. Ann Rev Med 2000; 51:349-56.
4. Verstraelen H, Verhelst R, Claeys G, Temmerman M, Vaneechoutte M. Culture-independent analysis of vaginal microflora: the unrecognized association of *Atopobium vaginae* with bacterial vaginosis. Am J Obstet Gynecol 2004; 191:1130-2.
5. Sweet RL. Gynecologic conditions and bacterial vaginosis: implications for the non-pregnant patient. Infect Dis Obstet Gynecol 2000; 8:184-90.
6. Guaschino S, De Santo D, De Seta F. New perspectives in antibiotic prophylaxis for obstetric and gynecologic surgery. J Hosp Infect 2002; 50(Suppl A):S13-6.
7. Sewankambo N, Gray RH, Wawer MJ, Paxton L, McNaim D, Wabwire-Mangen F, et al. HIV-1 infection associated with abnormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. Lancet 1997; 350:546-50.
8. McGregor JA, French JI. Bacterial vaginosis in pregnancy. Obstet Gynecol Surv 2000; 55: S1-19.
9. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. Lancet 2007; 369(9577):1961-71.
10. Ledger WJ, Witkin SS. Vaginal immunity. In: Ledger WJ, Witkin SS. **Vulvovaginal infections**. Washington: ASM Press; 2007. p.12-5.
11. Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L. Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. Immunol Rev 2005; 206:306-35.

12. Akgut C, Edwards SW. Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60:2402-8.
13. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature Rev Immunol* 2010; 10:427-39.
14. Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun.* 2010; 2:216-27.
15. Dransfield I, Buckle AM, Savill JS, McDowall A, Haslett C, Hogg N. Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression. *J Immunol* 1994; 15:1254-63.
16. Nusbaum P, Laine C, Seveau S, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Early membrane events in polymorphonuclear cell (PMN) apoptosis: membrane blebbing and vesicle release, CD43 and CD16 down-regulation and phosphatidylserine externalization. *Biochemical Society Transactions* 2004, vol. 32, part 3.
17. Song HO, Lim YS, Moon SJ, Ahn MH, Ryu JS. Delayed human neutrophil apoptosis by *Trichomonas vaginalis* lysate. *Korean J Parasitol* 2010; 48:1-7.
18. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983; 74:14-22.
19. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991; 29:297-301.
20. Spiegel CA, Amsel R, Holmes KK. Diagnosis of bacterial vaginosis by direct Gram stain of vaginal fluid. *J Clin Microbiol* 1983; 18:170-7.
21. DeLeo FR. Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. *Apoptosis* 2004; 9:399-413.

22. Kim JS, Kim JM, Jung HC, Song IS, Kim CY. Inhibition of apoptosis in human neutrophils by *Helicobacter pylori* water-soluble surface proteins. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36:589-600.
23. van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 2004; 173:6521-5.
24. Kim JY, Ahn MH, Jun HS, Jung JW, Ryu JS, Min DY. *Toxoplasma gondii* inhibits apoptosis in infected cells by caspase inactivation and NF-kappaB activation. *Yonsei Med J* 2006; 47:862-9.
25. Dolgushin II, Andreeva IuS, Plekhanova EV. Interaction of neutrophils and different bacterial agents. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2008; 5:103-5.
26. Witkin SS, Linhares IM, Giraldo P, Ledger WJ. An altered immunity hypothesis for development of symptomatic bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis* 2007; 44:554-7.
27. Sabroe I, Prince LR, Jones EC, Horsburgh MJ, Foster SJ, Vogel SN, et al. Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol* 2003; 170:5268-75.
28. François S, El Benna J, Dang PM, Pedruzzi E, Gougerot-Pocidalo MA, Elbim C. Inhibition of neutrophil apoptosis by TLR agonists in whole blood: involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathways, leading to increased levels of Mcl-1, A1, and phosphorylated Bad. *J Immunol* 2005; 174:3633-42.
29. Parker LC, Whyte MK, Dower SK, Sabroe I. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol.* 2005; 77(6):886-92.
30. Mirmonsef P, Gilbert D, Zariffard MR, Hamaker BR, Kaur A, Landay AL, et al. The effects of commensal bacteria on innate immune responses in the female genital tract. *Am J Reprod Immunol.* 2011; 65(3):190-5.

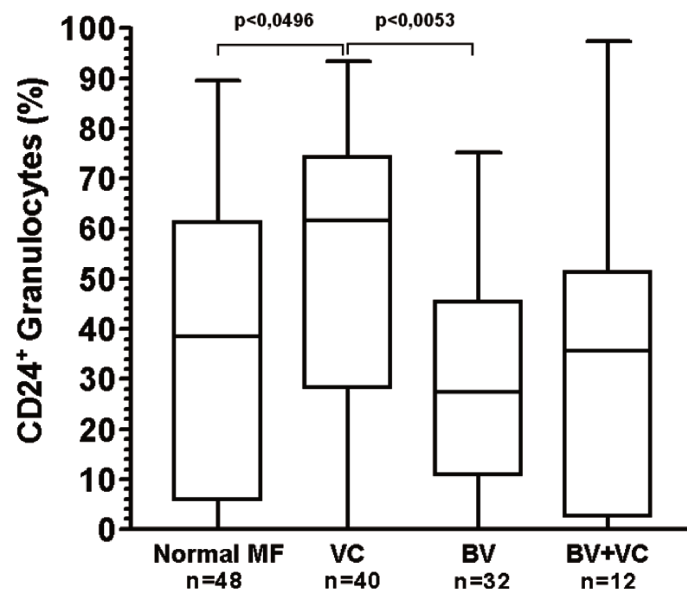


Figure 1. Box plot of CD24⁺ (granulocytes) cell percentages present in the vaginal lavage samples of women with normal vaginal microflora (MF) and vulvovaginitis (VV), including vulvovaginal candidiasis (VC), bacterial vaginosis (BV) and BV associated with VC (BV+VC). Statistics performed with the Kruskal-Wallis test.

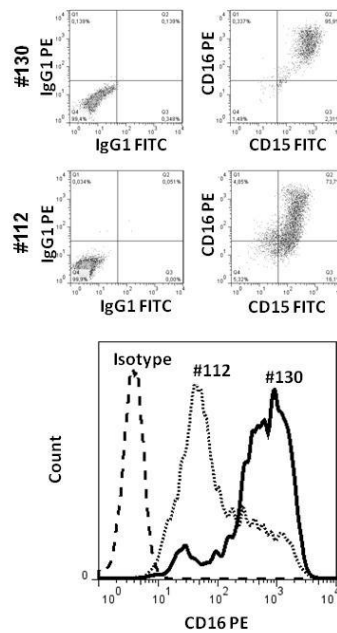


Figure 2. Flow cytometry profiles of two vaginal lavage samples collected from patients with vaginal candidiasis (#112) and bacterial vaginosis (#130). Samples were analyzed by setting appropriate SSC/FSC gates on the granulocyte (CD24⁺) population. CD16 expression on neutrophils (CD24⁺ CD15⁺ CD16⁺) varied among the vaginal lavage samples.

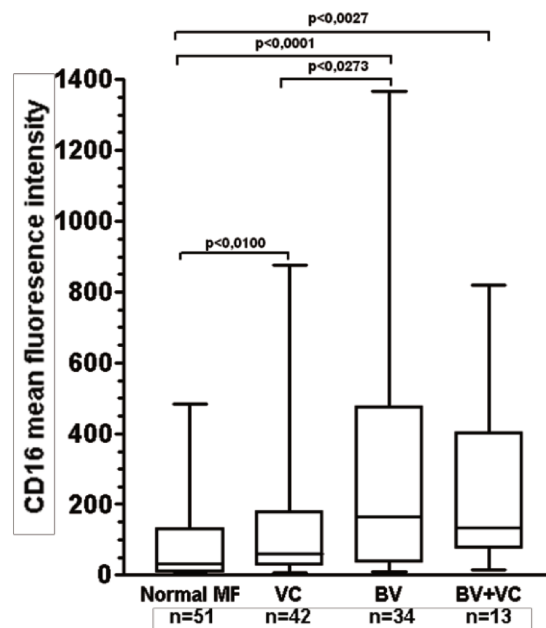


Figure 3. Box Plot of mean fluorescence intensity of CD16 on neutrophils present in vaginal lavage samples of women with normal vaginal microflora (MF) and vulvovaginitis (VV), including vulvovaginal candidiasis (VC), bacterial vaginosis (BV) and BV associated with VC (BV+VC). Statistics were performed with the Kruskal-Wallis test.

4. Discussão

Conhecer a composição das células imunes da vagina nas diferentes situações que interferem no equilíbrio do ecossistema vaginal pode auxiliar na decodificação dos mecanismos implicados nas defesas do trato genital feminino, entretanto, poucas pesquisas têm sido executadas com esta finalidade (48,49,50,51,52). A CF vem sendo utilizada em estudos que caracterizam as células de defesa vaginais em modelos animais e em humanos (47,48,50,53). Todavia, este foi o primeiro estudo que utilizou a técnica para avaliação das populações de células de defesa presentes na cavidade vaginal de mulheres com VV.

Os leucócitos identificados nos lavados vaginais das mulheres estudadas foram granulócitos neutrófilos, macrófagos, linfócitos T CD4, T CD8, linfócitos B e linfócitos NK, e as células predominantes nestas amostras foram os granulócitos neutrófilos. Este estudo obteve resultados semelhantes a outro estudo do nosso grupo que avaliou os leucócitos provenientes de esfregaços da parede vaginal de mulheres com e sem VV por microscopia óptica (52). Ressaltam-se as vantagens da CF em relação à microscopia óptica como a acurácia na detecção celular, a

possibilidade de identificar os subtipos de linfócitos, além da menor interferência do examinador.

Feitoza e colaboradores (52) observaram que o número de neutrófilos foi significativamente maior ($p < 0,01$) no grupo CV (mediana: 67,5) em relação ao grupo controle (mediana 20,5) e ao grupo VB (mediana 3,0). Observou-se também significância estatística ($p < 0,01$) para o grupo controle em relação ao grupo de mulheres com VB (52). Nosso estudo também observou as mesmas relações ao se comparar os grupos, indicando que na CV existem mais neutrófilos que nas demais mulheres, e na VB, menos neutrófilos.

Durante o exame ginecológico para se coletar o material desta pesquisa, a presença de sinais flogísticos na mucosa vaginal também foi avaliada. Observou-se que o eritema estava presente em 32% dos casos com CV e 57,1% dos casos com VB+CV, enquanto ocorreu em apenas 2,9% das mulheres com VB e em nenhuma das mulheres com flora normal. Acredita-se que a candidíase sintomática aconteça quando o fungo atinge determinada concentração vaginal. Nesta situação, as células epiteliais deixam de tolerá-lo e secretam fatores quimiotáticos para atração de neutrófilos para a vagina. Sendo assim, o fungo deixa de ser comensal e desencadeia uma infecção sintomática. Suspeita-se que após iniciada a infecção, os neutrófilos atraídos para a vagina não conseguem inibir a proliferação do fungo (30). Visto que os neutrófilos são as células predominantes nos processos inflamatórios (28), os dados justificam a maior prevalência destas células no lavado vaginal de mulheres portadoras de CV, onde o eritema e a inflamação são mais evidentes. Além disso, a incapacidade dos neutrófilos em

conter a infecção fúngica poderia colaborar para a manutenção do processo inflamatório e perpetuação da sintomatologia. O fato do grupo VB+CV apresentar eritema e baixos percentuais de neutrófilos sugere que o fungo por si só ou por liberar outras substâncias possa promover eritema e que este não é uma decorrência exclusiva da presença de grande número de neutrófilos.

Em contrapartida, a VB não suscita uma reação inflamatória significativa (abundante migração leucocitária para a vagina), apesar de estudos relatarem aumento da citocina pró-inflamatória IL 1 β no fluido vaginal de mulheres com VB. Foi observado que existe um aumento de IL 1 β , porém não acompanhado do aumento de IL8, citocina responsável pela quimiotaxia de neutrófilos. Sabe-se que algumas substâncias produzidas pelos anaeróbios na VB podem inibir a migração dos neutrófilos para o local da infecção (27, 31, 32). Este fato pode explicar a menor percentagem de granulócitos neutrófilos encontrados no grupo de mulheres com VB. Cauci e colaboradores (27) mostraram que o número de neutrófilos presentes na vagina de mulheres com vaginose bacteriana é semelhante ao de mulheres sem VV (27). Em contrapartida, nossos resultados mostraram menor quantidade de neutrófilos na VB comparado às mulheres sem VV, o que corrobora com a possibilidade de uma imunossupressão local em decorrência dos germes da VB.

Em relação ao número de neutrófilos do grupo que apresentou VB e CV simultaneamente, não se encontrou diferença estatística ao compará-lo com os demais grupos. Talvez, isto se deva ao pequeno número de casos do grupo. Porém, não se pode ignorar a hipótese que CV e VB, juntas, possam anular

uma o efeito da outra, observando-se uma resposta intermediária nesta situação.

Considerando-se os macrófagos, nossos resultados foram semelhantes ao estudo de Feitoza e colaboradores (52). Os macrófagos estavam ausentes na maioria das amostras e quando presentes foram observados em baixa frequência. Quanto aos linfócitos, estas células estavam ausentes na maior parte das amostras em ambos os estudos. Como o estudo de Feitoza utilizou a microscopia óptica não foi possível caracterizar os subtipos de linfócitos, o que impediu comparar os resultados obtidos para estas células entre os estudos (52). No presente estudo, o fato de encontrarmos maior percentual de linfócitos T CD4 nos grupos com CV e VB sugere que a resposta imunidade adaptativa esteja ativada nestes casos.

Estudos avaliaram o tecido vaginal obtido a partir de biópsias da mucosa vaginal em humanos e mostraram que os linfócitos T foram os leucócitos predominantes no tecido, e que, os linfócitos TCD8 foram mais frequentes que linfócitos TCD4. Neutrófilos, macrófagos, linfócitos B e NK apareceram em baixa frequência ou estavam ausentes (48,51). Contrariamente, analisando-se os leucócitos presentes no lúmen vaginal, obtidos por lavado vaginal no presente estudo e por esfregaço da parede no estudo de Feitoza e colaboradores (52), observou-se que os neutrófilos foram as células predominantes. Os linfócitos ocorreram em baixas quantidades ou estavam ausentes. Estes dados indicam que existem diferenças na distribuição das células de defesa vaginais conforme o compartimento analisado, tecido ou lúmen vaginal. Portanto, sugere-se que, na vagina, a resposta imune adaptativa atue a partir do tecido vaginal enquanto

a resposta imune inata é predominante no lúmen vaginal, considerando-se que os neutrófilos são as principais células efectoras da resposta imune inata.

Ao analisar os resultados deste estudo, observou-se que a expressão da molécula de CD16 dos neutrófilos variou entre as amostras. Como a diminuição da expressão da molécula de superfície celular CD16 é um dos marcadores do processo de apoptose dos neutrófilos (35,36,37), a expressão desta molécula nos neutrófilos foi avaliada no sentido de se estudar a apoptose dos neutrófilos presentes nos lavados vaginais.

Apesar de poucos estudos sobre os germes causadores das infecções genitais e sua influência na apoptose de neutrófilos, as pesquisas, em geral, mostraram que a maioria das bactérias pode induzir a apoptose de neutrófilos, enquanto, vários compostos de bactérias, incluindo lipopolissacarídeos (LPS), podem atrasá-la (38). Sabe-se que o atraso da apoptose dos neutrófilos expõe o tecido às substâncias tóxicas destas células causando dano tecidual (33,34). Foi relatado que trofozoítos viáveis de *T. vaginalis* aceleram a apoptose de neutrófilos, enquanto lisado de *Trichomonas vaginalis* atrasam-na, sugerindo que durante a tricomoníase, as partículas de tricomonas degradadas pelos leucócitos no tecido, retardam a apoptose dos neutrófilos, o que mantém o intenso processo inflamatório nesta infecção (37). Um estudo recente mostrou que os *Lactobacillus sp* e os *Bifidobacterium sp*, germes comensais da flora vaginal, têm um poderoso efeito apoptogênico nos neutrófilos, ao contrário dos micro-organismos facultativos (*S. aureus* e *E. coli*) (39). A ação apoptogênica dos lactobacilos parece indicar um mecanismo de evasão imunológica, uma vez que estas bactérias pertencem

à flora vaginal normal. Nossos resultados corroboram esta idéia, pois a expressão do CD16 foi mais baixa nas mulheres com flora vaginal normal, indicando que os neutrófilos deste grupo apresentam tempo de vida menor.

Ao contrário, as maiores médias da expressão do CD16 foram observadas nos grupos com VV apontando um atraso na apoptose dos neutrófilos em decorrência da infecção. Ao analisar as VV, observou-se maior expressão do CD16 na VB em relação a CV, indicando maior atraso na apoptose dos neutrófilos vaginais de mulheres com VB. Sabendo-se que o atraso na apoptose está associado com injúria tecidual acreditamos que não foi observado processo inflamatório na VB devido ao baixo número de granulócitos neutrófilos neste grupo, inclusive menor que nas mulheres com flora normal.

A resposta imune na VB é desencadeada pela ligação dos LPS presentes nas bactérias Gram negativas aos TLR4 presentes nas células epiteliais e nos neutrófilos (54). Foi demonstrado que, nos neutrófilos, a ativação do TLR4 pelo LPS da bactéria leva a um atraso na apoptose destas células (55,56,57). Por outro lado, ácidos graxos de cadeia curta produzidos pelas bactérias anaeróbicas e encontrados em altas concentrações na vagina de mulheres com VB, podem induzir a apoptose dos neutrófilos (32). Contudo, nossos resultados parecem indicar um atraso na apoptose dos neutrófilos destas mulheres sugerindo que o estímulo do TLR4 é fator predominante em relação à ação dos ácidos graxos.

É importante ressaltar que os estudos citados sobre apoptose de neutrófilos foram realizados com neutrófilos previamente isolados do sangue periférico e expostos aos micro-organismos ou suas substâncias em sistemas *in vitro*.

Diferentemente, neste estudo foi avaliada a expressão do CD 16 em neutrófilos presentes em lavados obtidos diretamente do ambiente vaginal. Sendo assim, as alterações observadas no tempo de vida dos neutrófilos resultaram da interação do conjunto de fatores presentes no ambiente vaginal.

Não se sabe até o momento porque algumas infecções são debeladas facilmente e outras se tornam graves ou muitas vezes recorrentes. Percebe-se que o mesmo agente patogênico causa quadros clínicos variados em diferentes indivíduos. Portanto, acredita-se que existam falhas imunológicas em determinados indivíduos que determinam o surgimento de infecções e suas recorrências (58). O estudo da imunidade vaginal pode auxiliar no entendimento da fisiopatologia das VV. A possibilidade de avaliação imunológica no momento do diagnóstico permitirá a elaboração de novas formas de tratamento enfocadas, não só no agente infeccioso, mas visando a manipulação da resposta imune.

É importante destacar que este estudo analisou as células de defesa extraídas diretamente da cavidade vaginal humana permitindo estudar as células da resposta imune em seu ambiente natural. Além disso, é o primeiro trabalho que utilizou a CF, técnica já empregada em outras doenças, para avaliar os leucócitos presentes no conteúdo vaginal de mulheres com VV. Os autores propõem o estabelecimento de novos protocolos de investigação que determinem padrões de variação da normalidade em relação às células de defesa vaginais.

5. Conclusões

- Os neutrófilos, macrófagos, linfócitos TCD4 e TCD8, linfócitos B e linfócitos NK foram identificados pela citometria de fluxo em mulheres com flora normal, vaginose bacteriana (VB), candidíase vulvovaginal (CV) e vaginose bacteriana associada à candidíase vulvovaginal (VB+CV). Os granulócitos neutrófilos foram as células predominantes em todos os grupos estudados, sendo que as demais células imunes foram detectadas em menores percentuais. A média da porcentagem de granulócitos neutrófilos foi maior na CV comparado à flora normal e VB. A média da porcentagem de granulócitos neutrófilos foi menor na VB comparado à flora normal. Os linfócitos TCD4 apresentaram média da porcentagem maior na CV e VB quando comparado a flora normal. Dados estatisticamente significativos.

- A expressão do CD16 nos neutrófilos foi maior nas VV (VB, CV, VB+CV) em comparação à flora normal. Entre as vulvovaginites, a expressão do CD16 foi maior na VB comparado à CV. Dados estatisticamente significativos.

6. Referências Bibliográficas

1. Tenkin O. Soranus'gynecology. Baltimore: Johns Hopkins Press, 1956:1-65, APUD Kent, HL. Epidemiology of vaginitis. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:1168-76.
2. Duarte G, Landers DV. Vulvovaginites: aspectos epidemiológicos. *J Bras Doenças Sexualm Transm* 1998; 9:4-14.
3. Sobel JD. Vulvovaginitis in healthy women. *Compr Ther* 1999; 25(6-7):335-46.
4. Farage MA, Miller KW, Ledger WJ. Determining the Cause of Vulvovaginal Symptoms. *Obstet Gynecol Surv* 2008; 63:445-64.
5. American College of Obstetrics and Gynecology. Vaginitis. *Int J Gynecol Obstet* 1996; 53:271-80.
6. Egan ME, Lipsky MS. Diagnosis of vaginitis. *Am Fam Physician* 2000; 62:1095-104.
7. Giraldo PC, Ribeiro Filho AD, Simões JA, Gomes FAM, Jarbas M. Vulvovaginites: aspectos habitualmente não considerados. *J Bras Ginecol* 1997; 107(4):89-93.
8. Sobel JD. Vulvovaginal candidosis. *Lancet* 2007; 369(9577):1961-71.
9. Owen MK, Clenney TL. Management of vaginitis. *Am Fam Physician* 2004; 70(11):2125-32.
10. Ledger WJ, Monif GR. A growing concern: inability to diagnose vulvovaginal infections correctly. *Obstet Gynecol* 2004; 103(4):782-4.

11. Gomes FAM. Valor de o exame clínico especular e da anamnese para o diagnóstico do corrimento vaginal. [Tese - Doutorado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), 2003.
12. Nyirjesy P. Vulvovaginal Candidiasis and Bacterial Vaginosis. *Infect Dis Clin N Am* 2008; 22 637-52.
13. Sobel JD. Bacterial vaginosis. *Annu Rev Med* 2000; 51:349-56.
14. Verstraelen H, Verhelst R, Claeys G, Temmerman M, Vaneechoutte M. Culture-independent analysis of vaginal microflora: the unrecognized association of *Atopobium vaginae* with bacterial vaginosis. *Am J Obstet Gynecol* 2004; 191:1130-2.
15. Linhares IM, Summers PR, Larsen B, Giraldo PC, Witkin SS. Contemporary perspectives on vaginal pH and lactobacilli. *J Obstet Gynecol* 2011; 204(2): 120.e1-5.
16. National Guideline for Management of bacterial vaginosis, 2006.
<http://www.guideline.gov/content.aspx?id=11602>
17. Centers for Disease Control and Prevention. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines 2010. Diseases Characterized by Vaginal Discharge. Bacterial Vaginosis. <http://www.cdc.gov/std/treatment/2010/default.htm>
18. Fethers KA, Fairley CK, Hocking JS, Gurrin LC, Bradshaw CS. Sexual risk factors and bacterial vaginosis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2008; 47(11):1426-35.
19. Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes KK. Nonspecific vaginitis: diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. *Am J Med* 1983; 74(1):14-22.
20. Nugent RP, Krohn MA, Hillier SL. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *J Clin Microbiol* 1991; 29(2):297-301.

21. Donders G. Diagnosis and management of bacterial vaginosis and other types of abnormal vaginal bacterial flora: a review. *Obstet Gynecol Surv* 2010; 65(7):462-73.
22. Giraldo PC, Gonçalves AKSG, Eleutério Jr J. Mecanismos de defesa da mucosa genital feminina. In: Peixoto S. **Infecção genital na mulher**. São Paulo: Roca; 2007. p.37-41.
23. Witkin SS, Linhares I, Giraldo P, Jeremias J, Ledger WJ Individual immunity and susceptibility to female genital tract infection. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183(1):252-6.
24. Ledger WJ, Witkin SS. Vaginal immunity. In: Ledger WJ, Witkin SS. **Vulvovaginal infections**. Washington: ASM Press; 2007. p.12-5.
25. Wira CR, Fahey JV, Sentman CL, Pioli PA, Shen L Innate and adaptive immunity in female genital tract: cellular responses and interactions. *Immunol Rev* 2005; 206:306-35.
26. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nature Rev Immunol* 2010; 10:427-39.
27. Cauci S, Guachino S, De Aloysio D, Driussi S, De Santo D, Penacchioni P, et al. Interrelationships of interleukin-8 with interleukin-1beta and neutrophils in vaginal fluid of healthy and bacterial vaginosis positive women. *Mol Hum Reprod*, 2003; 9(1):53-8.
28. Abbas, AK, Lichtman AH, Pober JS. **Imunologia celular e molecular**. 5^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda; 2005. p. 283-354.
29. LeBlanc DM, Barousse MM, Fidel PL Jr. Role for dendritic cells in immunoregulation during experimental vaginal candidiasis. *Infect Immun* 2006; 74(6):3213-21.
30. Fidel PL Jr. History and update on host defense against vaginal candidiasis. *Am J Reprod Immunol* 2007; 57(1):2-12.

31. St John E, Mares D, Spear GT. Bacterial vaginosis and host immunity. *Curr HIV/AIDS Rep* 2007; 4(1):22-8.
32. Mirmonsef P, Gilbert D, Zariffard MR, Hamaker BR, Kaur A, Landay AL, et al. The effects of commensal bacteria on innate immune responses in the female genital tract. *Am J Reprod Immunol* 2011; 65(3):190-5.
33. Akgut C, Edwards SW. Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors. *Cell Mol Life Sci* 2003, 60:2402-8.
34. Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate Immun* 2010; 2(3):216-27.
35. Dransfield I, Buckle AM, Savill JS, McDowall A, Haslett C, Hogg N. Neutrophil apoptosis is associated with a reduction in CD16 (Fc gamma RIII) expression. *J Immunol* 1994; 153(3):1254-63.
36. Nusbaum P, Laine C, Seveau S, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Early membrane events in polymorphonuclear cell (PMN) apoptosis: membrane blebbing and vesicle release, CD43 and CD16 down-regulation and phosphatidylserine externalization. *Biochemical Society Transactions* 2004, vol. 32, part 3.
37. Song HO, Lim YS, Moon SJ, Ahn MH, Ryu JS. Delayed human neutrophil apoptosis by *Trichomonas vaginalis* lysate. *Korean J Parasitol* 2010; 48(1):1-7.
38. DeLeo FR. Modulation of phagocyte apoptosis by bacterial pathogens. *Apoptosis* 2004; 9(4):399-413.
39. Dolgushin II, Andreeva IuS, Plekhanova EV. Interaction of neutrophils and different bacterial agents. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2008; 5(5):103-5.
40. Balcells Gorina A. Exames de sangue. Hematologia clínica. **A clínica e o laboratório**. Rio de Janeiro: Medsi; 1996. p.121-58.

41. Balcells Gorina A. Exame do líquido cefalorraquidiano. **A clínica e o laboratório**. Rio de Janeiro: Medsi; 1996. p.213-9.
42. Giraldo PC, Gonçalves AKS, Linhares IM, Cornetta MCM, Giraldo HPD. Corrimento genital. Diagnósticos clínicos e laboratoriais. In: Martins NV, Ribalta JCL. **Patologia do trato genital inferior**. São Paulo: Editora Roca Ltda; 2005. p.124-9.
43. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ. 10 Anos de Citometria de Fluxo no Brasil; 1998. Rio de Janeiro. In: picf.ioc.fiocruz.br/proceedings.doc.
44. Shapiro H. **Practical flow cytometry**. 4^a ed. New York: Wiley-Liss; 2003.
45. Wilson WH. International consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; 72(Suppl) 1:S2.
46. Bertho AL, Ferraz R. Citometria de fluxo: princípios e aplicações. Rio de Janeiro (RJ): Fiocruz 2005. <http://picf.ioc.fiocruz.br/apostila.doc>
47. Di Fabio S, Corrias F, Monardo F, Titti F. Flow cytometry analysis of immune cell populations isolated from cervicovaginal secretions of cynomolgus monkeys. *J Immunol Methods* 2004; 284 (1-2):7-14.
48. Givan AL, White HD, Stern JE, Colby E, Gosselin EJ, Guyre PM, et al. Flow cytometric analysis of leukocytes in the human female reproductive tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix, and vagina. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38(5):350-9.
49. Patton DL, Thwin SS, Meir A, Hooton TM, Stapleton AE, Eschenbach DA. Epithelial cell layer thickness and immune cell populations in the normal human vagina at different stages of the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183(4):967-73.

50. White HD, Prabhala RH, Humphrey SL, Crassi KM, Richardson JM, Wira CR. A method for the dispersal and characterization of leukocytes from the human female reproductive tract. *Am J Reprod Immunol* 2000; 44(2):96-103.
51. Ildgruben AK, Sjöberg IM, Hammarström ML. Influence of hormonal contraceptives on the immune cells and thickness of human vaginal epithelium. *Obstet Gynecol* 2003; 102(3):571-82.
52. Feitoza SBN, Giraldo PC, Gonçalves AKS, Amaral RLG, Eleutério Jr J, Tristão A, et al. Identificação e quantificação de células de defesa na mucosa vaginal de mulheres com vaginose bacteriana, candidíase vaginal e sem vulvovaginites. *Rev Bras Genitoscopia* 2009; 3(3-4):76-9.
53. Schultheiss T, Stolte-Leeb N, Sopper S, Stahl-Hennig C. Flow cytometric characterization of the lymphocyte composition in a variety of mucosal tissues in healthy rhesus macaques. *J Med Primatol* 2011; 40(1):41-51.
54. Witkin SS, Linhares IM, Giraldo P, Ledger WJ. An altered immunity hypothesis for development of symptomatic bacterial vaginosis. *Clin Infect Dis* 2007; 44(4):554-7.
55. Sabroe I, Prince LR, Jones EC, Horsburgh MJ, Foster SJ, Vogel SN, et al. Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span. *J Immunol* 2003; 170(10): 5268-75.
56. François S, El Benna J, Dang PM, Pedruzzi E, Gougerot-Pocidalo MA, Elbim C. Inhibition of neutrophil apoptosis by TLR agonists in whole blood: involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt and NF-kappaB signaling pathways, leading to increased levels of Mcl-1, A1, and phosphorylated Bad. *J Immunol* 2005; 174(6):3633-42.
57. Parker LC, Whyte MK, Dower SK, Sabroe I. The expression and roles of Toll-like receptors in the biology of the human neutrophil. *J Leukoc Biol* 2005; 77(6):886-92.
58. Witkin SS Immunology of the vagina. *Clin Obstet Gynecol* 1993; 36(1):122-8.

7. Anexos

7.1. Anexo 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

QUANTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS PRESENTES NA CAVIDADE VAGINAL DE MULHERES COM E SEM VULVOVAGINITES

Nº: _____

Data: ____/____/____

Pesquisadora Responsável: Dra Joziani Beghini Junqueira de Carvalho

Eu, _____, ____ anos,

RG _____, registrada na UNICAMP com o HC Nº _____,

Endereço: _____, cidade de _____.

Estou ciente que o objetivo dessa pesquisa é estudar pacientes com e sem problemas de corrimento vaginal para descobrir os tipos de células que aparecem na vagina dessas mulheres.

Com os resultados desse estudo, espera-se conseguir novas maneiras de tratar esse tipo de problema da mulher, ajudando aquelas que têm corrimento várias vezes ao ano.

Fui informada que:

- 1- Serei examinada pelos médicos responsáveis pelo estudo, e além dos exames de rotina, serão colhidas células vaginais, através de lavado da vagina. Tal procedimento poderá causar um leve desconforto momentâneo.

- 2- Alguns dos exames coletados serão avaliados pelo pesquisador e outros enviados ao laboratório do CAISM.
- 3- A coleta dos exames não vai me trazer nenhum prejuízo e será realizada durante o exame ginecológico, que é feito em todas as pacientes do ambulatório.
- 4- Não irei receber qualquer benefício a mais por participar da pesquisa.
- 5- Caso não aceite participar da pesquisa, sei que tenho assegurado agora e futuramente o mesmo acompanhamento e tratamento médico neste ambulatório.
- 6- Tenho o direito de ser esclarecida sobre qualquer dúvida que eu tenha sobre a pesquisa que estou participando.
- 7- Todas as informações sobre mim obtidas na pesquisa não serão identificadas com o meu nome. Serei identificada apenas por um número.
- 8- Qualquer dúvida que venha a surgir, devido a minha participação na pesquisa, poderei entrar em contato, em horário comercial, de segunda à sexta-feira, com Dra. Joziani ou Dr. Paulo César pelo telefone (0xx19) 3521 9306.
- 9- Qualquer outra dúvida que eu tenha, posso entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, nos mesmos horários e períodos acima descritos, pelo telefone (0xx19) 3521 8936.

Declaro concordar por minha livre e espontânea vontade, participar desta pesquisa que está sendo realizada no Ambulatório de Infecções Genitais, do Depto de Tocoginecologia, FCM / UNICAMP, pela Dra. Joziani Beghini Junqueira de Carvalho e Dr. Paulo César Giraldo.

Campinas, ____/_____/____

Assinatura da paciente: _____

Assinatura do pesquisador: _____

7.2. Anexo 2 – Parecer do CEP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 26/08/08.
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 643/2008 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0518.0.146.000-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "QUANTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES DE LEUCÓCITOS PRESENTES NO CONTEÚDO VAGINAL DE MULHERES COM E SEM VULVOVAGINITES".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Joziani Beghini Junqueira de Carvalho

INSTITUIÇÃO: CAISM / UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 12/08/2008

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 26/08/09 (O formulário encontra-se no site acima)

II - OBJETIVOS

Caracterizar as populações de células responsáveis pela imunidade local, descamadas para o lúmen vaginal em mulheres com e sem vulvovaginites.

III - SUMÁRIO

Serão estudadas 132 mulheres sendo, 44 com candidíase vaginal, 44 com vaginose bacteriana e outras 44 sem vulvovaginite infecciosa (44). A presença ou ausência de vulvovaginite será determinada através da correlação entre os achados do exame ginecológico, medida de pH vaginal, teste das aminas, exame bacterioscópico a fresco e corado pelo Gram do conteúdo vaginal. Será colhido um lavado da cavidade vaginal instilando-se 5 ml de PBS o qual será aspirado para posterior avaliação das células de defesa por citometria de fluxo. **ANÁLISE DOS DADOS:** O software utilizado para análise será o SAS versão 9.02. Na análise dos dados serão calculados, média, desvio-padrão, mediana e percentis. Serão utilizados os testes de qui-quadrado e ANOVA seguida do teste de Tukey caso necessário. O nível de significância será assumido em 5%.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Trata-se de projeto de mestrado que aborda assunto de relevância para o entendimento da fisiopatogênese das vulvovaginites onde se fará a caracterização da população de células vaginais descamadas para o lúmen em mulheres com e sem vulvovaginites. Os resultados do estudo servirão posteriormente para novas formas de tratamento desta doença. O projeto está bem redigido, o desenho do estudo é adequado, apresenta critérios de inclusão e exclusão bem definidos. Os aspectos éticos discutidos no projeto, O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido está adequadamente redigido de forma clara.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na VIII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 26 de agosto de 2008.

Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

8. Apêndice

Citometria de fluxo: Aplicabilidade em ginecologia e obstetrícia

Flow cytometry: Applicability in gynecology and obstetrics

Joziani Beghini Junqueira de Carvalho¹, Paulo César Giraldo², Rose Luce Gomes do Amaral³, Fernando Guimarães⁴.

¹ Mestranda do Departamento de Tocoginecologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

² Professor Titular do Departamento de Tocoginecologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. Responsável pelo Ambulatório de Infecções Genitais Femininas, Hospital da Mulher “Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti” - Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher, Universidade Estadual de Campinas.

³ Doutora pelo Departamento de Tocoginecologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. Médica contratada do Ambulatório de Infecções Genitais Femininas, Hospital da Mulher “Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti” - Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher, Universidade Estadual de Campinas.

⁴ Pesquisador Doutor do Laboratórios Clínicos Especializados, Hospital da Mulher “Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti” - Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher, Universidade Estadual de Campinas.

Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - 2008/09853-8

Endereço para Correspondência:

Paulo César Giraldo

Hospital da Mulher “Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti” - Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher – CAISM/UNICAMP

Caixa Postal: 6111, Campinas/ SP, CEP: 13083-970

Rua Alexandre Fleming 101, Cidade Universitária “Zeferino Vaz”

Telefone comercial: (19) 3521-7430 FAX: (19) 3521-9306

Email: giraldo@unicamp.br

Resumo

Os avanços tecnológicos recentes da medicina têm oferecido colaboração substancial no diagnóstico, tratamento e prognóstico das doenças. A técnica de citometria de fluxo, largamente usada em hematologia, oncologia e imunologia, vem ganhando importância na Ginecologia e Obstetrícia. Neste artigo apresentaremos uma visão geral sobre o tema, os princípios de funcionamento do citômetro e o histórico do seu surgimento, assim como as principais aplicações da citometria na saúde da mulher. Após extensa revisão realizada nas bases de dados MEDLINE, LILACS, EMBASE (descritores: ginecologia, obstetrícia e citometria de fluxo) além de sites e livro-texto sobre o tema, concluiu-se que a citometria de fluxo é uma técnica moderna, prática, porém de alto custo, que permite a análise de múltiplos parâmetros celulares simultaneamente e em poucos minutos. Tem grande potencial de aplicabilidade em ginecologia e obstetrícia e merece atenção dos profissionais para ser implementada nas rotinas diárias.

Unitermos: citometria de fluxo, ginecologia, obstetrícia.

Summary

Recent technological advances in medicine have provided substantial cooperation in the diagnosis, treatment and prognosis of diseases. The technique of flow cytometry is widely used in hematology, oncology, immunology has become increasingly important in obstetrics and gynecology. In this paper we present an overview of the topic, operating principles and the history of flow cytometry, as well as key applications of cytometry in women's health. After an extensive review performed in MEDLINE, LILACS, EMBASE (key words: gynecology, obstetrics and flow cytometry) as well as sites and textbook on the subject, concluded that flow cytometry is a modern technique, practice, but high cost that allows analysis of multiple cellular parameters simultaneously and in a few minutes. Have a potential application in gynecology and obstetrics and deserves the attention of professionals to be implemented in daily routines.

Uniterms: flow cytometry, gynecology, obstetrics.

Introdução

A citometria de fluxo é um importante método para diagnóstico e prognóstico de doenças, sendo também largamente utilizada em pesquisa clínica¹. Por este motivo, é fundamental que os ginecologistas e obstetras compreendam os princípios básicos desta tecnologia muito útil em outras áreas do conhecimento, porém pouco difundida na especialidade.

Os princípios da citometria de fluxo (CF) foram desenvolvidos a partir da década de 30, ganhando importância para o diagnóstico em várias especialidades como hematologia, oncologia, imunologia, pediatria, infectologia². O avanço da tecnologia ao longo dos anos levou ao aumento da especificidade e sensibilidade do método¹.

É uma técnica utilizada para medir as propriedades celulares por meio de um aparelho denominado citômetro de fluxo. As células que serão investigadas são direcionadas uma a uma, em uma câmara de fluxo contínuo de líquido, até o ponto em que são interceptadas por raios laser. Neste ponto, a dispersão da luz do laser que incidiu na célula, é capturada por um sistema óptico, gerando sinais eletrônicos que, uma vez processados, podem ser analisados por software específico que determinará as características detalhadas da célula (tamanho, complexidade, fenótipo e higidez) (Figura 1)³.

Portanto, esta técnica permite analisar estes múltiplos parâmetros de cada célula dentro de uma população pura ou mista. Desta forma, apresenta amplo espectro de aplicações como imunofenotipagem, contagem de células, análises de ploidias, ciclo celular, apoptose, expressão gênica, metabolismo celular, e análise de expressão de GFP (Green Fluorescent Protein), entre outras³. A extensa aplicação e sensibilidade da imunofenotipagem por CF é um dos instrumentos mais poderosos no arsenal da patologia clínica⁴.

A CF é utilizada em uma grande variedade de estudos para se compreender melhor a fisiopatologia, auxiliar no diagnóstico, determinar o prognóstico e monitorar a resposta terapêutica em diversas doenças, em especial naquelas em que há comprometimento do sistema imunológico^{5,6}.

Usada inicialmente para avaliação da função dos linfócitos T CD4, passou a ser utilizada no diagnóstico de neoplasias linfóides e mielóides¹. É o instrumento padrão-ouro no diagnóstico das leucemias agudas e crônicas⁴. A CF ajuda muito no diagnóstico das doenças autoimunes e na síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), contabilizando as mudanças das taxas de linfócitos B, T CD4⁺ e T CD8⁺. A fenotipagem destas subpopulações celulares é clinicamente relevante na avaliação da resposta imune celular,

na determinação da atividade de doenças autoimunes, na classificação adequada de órgãos para transplantes, na determinação de sinais precoces de rejeição em pacientes transplantados e na classificação de determinadas leucemias².

Em oncologia, facilita o diagnóstico, avalia o prognóstico e monitora o tratamento. Na microbiologia é utilizada no diagnóstico bacteriano e viral, e determina sensibilidade a antibióticos. Na área da genética, evidencia o cariótipo e o diagnóstico de portador de aberrações cromossômicas (diagnóstico pré-natal e tipagem para transplantes)². É utilizada nos transplantes autólogo e alogênico para identificar e quantificar as células-tronco no sangue periférico, parâmetro determinante e fundamental para a realização do procedimento⁷.

Apesar de largamente difundida pela versatilidade, a CF ainda sofre críticas devido a inconsistências na padronização e interpretação em novas aplicações. Consensos têm sido realizados na tentativa de padronização¹.

Existe, portanto, a necessidade de um maior conhecimento da aplicabilidade da Citometria de Fluxo pelo ginecologista e obstetra, a fim de que sejam feitos diagnósticos e prognósticos mais precisos e precoces nesta área e para ampliar as indicações futuras.

Histórico

Considera-se o primórdio da CF na década de 30, quando Moldavan desenvolveu o primeiro aparelho para contagem de células. Este protótipo consistia em um equipamento capaz de gerar fluxo de células sanguíneas em suspensão através de um tubo capilar e contá-las por intermédio de sensores fotoelétricos⁸. Em 1947, Gucker e colaboradores, criaram o primeiro contador de partículas utilizando “sheath fluid”, sistema no qual as partículas eram transportadas por um fluxo contínuo de líquido (sheath fluid), capaz de envolvê-las e centralizá-las⁹. Posteriormente, Crosland-Taylor (1953) adotou este recurso para contagem de células do sangue. Desta maneira, as células eram conduzidas uma a uma para serem analisadas individualmente¹⁰, tornando-se a base das câmaras de fluxo utilizadas na atualidade.

Wallace Coulter, em 1949, descreveu um princípio para contagem e análise automática das células. Neste sistema, as células suspensas passariam uma a uma por um pequeno orifício, onde variações na condutividade elétrica seriam captadas. Em 1956 foi lançada a primeira versão comercial do contador celular automático de alta velocidade e analisador celular Coulter Counter¹¹. Neste mesmo período, outras indústrias desenvolveram aparelhos similares.

Em meados da década de 60, Kamensky introduziu dois avanços importantes para citometria, o uso da espectrofotometria para quantificar DNA e a medida multiparamétrica da luz dispersada. Mais tarde, estes avanços permitiram o desenvolvimento do “Spectrophotometric Cell Sorter”, um separador celular baseado em propriedades espectrofotométricas^{12,13}. Neste mesmo período, Mack Fulwyler criava outro separador de células, porém baseado no volume celular. Este aparelho, posteriormente, foi capaz de separar neutrófilos de linfócitos do sangue¹⁴.

A partir destes equipamentos, o grupo de Leonard Herzenberg desenvolveu um separador celular baseado na fluorescência, que foi chamado Fluorescence Activated Cell Sorter (FACS). Este sistema utilizava moléculas fluorescentes, ou fluoróforos, conjugados a anticorpos específicos para marcação celular¹⁵. Em 1974 uma versão comercial foi lançada pela BD (Becton Dickinson and Company, San Jose, CA USA). A partir daí, os aparelhos foram sendo aperfeiçoados e patenteados¹⁶.

Citometria de Fluxo: componentes e funcionamento

Em geral, o citômetro de fluxo é constituído pelos seguintes componentes e sistemas: a) sistema fluídico: inclui soluções, condutos e componentes envolvidos com a condução das células através do aparelho e, principalmente, o “ponto de observação”, onde cada uma das células interage com o feixe luminoso do (s) laser (s); b) laser: em número de um ou mais, é a fonte da luz que interage com cada uma das células; c) sistema óptico: é o conjunto de lentes que captura e direciona a luz que emerge da interação do feixe luminoso com cada uma das células; d) sistema de detectores: recebe a luz; e) sistema de componentes eletrônicos e computador periférico: convertem o sinal luminoso que chega aos detectores em sinal digital, possibilitando seu processamento e análise (Figura 1)³.

A acurácia na obtenção de dados através da CF depende da passagem de uma célula (ou partícula) por vez pelo feixe luminoso. Esta condição é alcançada na maioria dos citômetros atuais, através de um processo conhecido como focalização hidrodinâmica (*hydrodynamic focusing*). Neste processo, a solução que contém as células em suspensão é conduzida por um fluxo contínuo de solução salina (*sheath fluid*) capaz de envolver as células, orientando-as para o centro do fluxo e, dessa forma, conduzi-las uma a uma. Como resultado, cada célula (ou partícula) é apresentada individualmente ao ponto de observação, onde é interceptada pelo feixe luminoso do laser. Ao interagir com a célula, o feixe luminoso é desviado para diferentes direções ou ângulos. A luz desviada

dentro de ângulos pequenos, ou seja, com espalhamento frontal (*forward scatter*), é proporcional ao tamanho celular e, portanto, utilizado para quantificar este parâmetro. A luz desviada com ângulos maiores, ou seja, com espalhamento lateral (*side scatter*), fornece informações relacionadas à complexidade da célula, que incluem características como a rugosidade da membrana plasmática, a presença de vacúolos e granulações, a forma do núcleo, entre outras (Figura 2)³.

Adicionalmente aos fenômenos relacionados ao desvio da luz, a CF utiliza a fluorescência resultante da interação do feixe luminoso com moléculas específicas como informação relevante para caracterização da célula. Portanto, a adição de anticorpos monoclonais específicos conjugados com material fluorescente possibilita a análise de diversas funções celulares, processos metabólicos, estágios da diferenciação e do ciclo celular (Figura 2). Os sinais luminosos gerados são convertidos em sinais eletrônicos e registrados, o que permite representá-los graficamente para serem analisados (Figura 3)³.

Aplicações em Ginecologia e Obstetrícia

Como vimos, a CF é capaz de identificar células e também separá-las, o que permite sua aplicação em diversas áreas das ciências biológicas. Na Reprodução Humana, a CF é empregada na determinação do sexo fetal e na identificação e exclusão dos gametas danificados. Desta forma, populações celulares contendo os cromossomos desejados são separadas no esperma ejaculado. O núcleo do espermatozóide é marcado com substâncias fluorescentes que permitem, através da citometria, a discriminação entre os cromossomos X e Y carregados pelos espermatozoides¹⁷.

É possível também utilizar a CF para identificar células fetais no sangue materno. Após identificação, estas células podem ser úteis em diversas situações, como análise genética e detecção de trissomias. Quando as células são extraídas diretamente do sangue periférico materno, reduzem-se os procedimentos de risco durante o pré-natal, como amniocentese e biópsias vilocoriais. Existe uma variedade de técnicas de separação celular e a CF está entre uma das mais comumente descritas, apesar de alguns fatores dificultarem o desenvolvimento de um método ideal^{18,19}. Bischoff e colaboradores realizaram uma abordagem não invasiva que permitiu a detecção de aneuploidias fetais associadas com graves defeitos congênitos através da identificação dos cromossomos X, Y, 13, 18, e 21²⁰.

Outra utilidade clínica da CF na identificação das células fetais consiste na determinação pré-natal não invasiva do status RhD fetal. A detecção celular é realizada

a partir de amostras de sangue periférico de gestantes Rh negativas previamente sensibilizadas pelo RhD²¹.

A isoimunização RhD tem consequências deletérias importantes para a saúde do binômio materno-fetal. O volume da hemorragia feto-materna, que é a proporção de hemoglobina fetal na circulação materna, determina a dose de imunoglobulina anti-D em gestantes Rh negativas. A citometria tem demonstrado acurácia semelhante ao teste padrão-ouro, conhecido como Teste de Kleihauer, na determinação dos índices de contaminação materna pelas células fetais^{22,23}.

Na ginecologia, a CF pode auxiliar na investigação de crimes sexuais. Uma ferramenta extremamente útil para identificação do suspeito é a tipagem do DNA presente no material coletado da cavidade vaginal de vítimas de estupro. Separar o sêmen das células vaginais a partir do swab coletado na cavidade vaginal destas mulheres é fundamental para a determinação do DNA do suspeito. As técnicas tradicionais são limitadas quando existe pequena quantidade de esperma em meio a numerosas células vaginais. Logo, a citometria envolvida em protocolos possibilitou a separação celular para posterior identificação do DNA do agressor²⁴.

Na oncologia ginecológica, a citometria é capaz de identificar a qualidade da amostra de esfregaços cervicovaginais de Papanicolaou, levando a menores taxas de falso-negativos. Quando a qualidade da amostra é avaliada pelo Sistema de Bethesda, as amostras classificadas como “insatisfatória” e “satisfatória, mas limitada por”, estão associadas a 16% de resultados citológicos posteriores de lesão intraepitelial cervical e neoplasia. A utilização da CF, além de rápida, permite a determinação da qualidade da amostra da citologia cervical em preparações em meio líquido, antes da preparação das lâminas para avaliação morfológica²⁵.

A citometria também vem se tornando um instrumento capaz de auxiliar na determinação do prognóstico da detecção precoce do câncer cervical. Entre as categorias citológicas, os casos com aneuploidia dos grupos de lesão intraepitelial cervical (LIE) de baixo e alto grau, e de células escamosas atípicas de significado indeterminado (ASC-US) demonstram alta contagem de uma determinada região nuclear que facilmente é corada por prata (AgNOR - regiões organizadoras nucleolares manchadas com prata). Mulheres com citologias de ASC-US e displasia apresentam altas taxas de células na fase S do ciclo celular, que são facilmente identificadas pela citometria. A associação desses fatores revelam que os casos com aneuploidias, alta contagem AgNOR e fração de fase S do ciclo apresentam uma tendência progressiva à doença²⁶.

Um ensaio com amostras de citologia cervical em meio líquido, que consiste na imunofenotipagem de células epiteliais cervicais por meio da CF seguida de hibridização *in situ* ultrasensível destas células, buscou a detecção de RNAm de E6 e E7 do HPV. Quando comparada ao Papanicolaou, a sensibilidade foi de 83,3% e especificidade de 91,3% para LIE de alto grau. Em um subgrupo destas amostras, a sensibilidade e especificidade foram mais altas que a captura híbrida (Digene, Gaithersburg, MD) para genótipos de alto risco²⁷. Portanto, a citometria pode auxiliar no diagnóstico de partículas virais de HPV, aumentando a sensibilidade e especificidade para detecção deste agente.

Outra utilidade importante da CF consiste na realização de ensaios “multiplex” que permitem a detecção simultânea de mais de um agente em uma amostra clínica. É uma tecnologia emergente que apresenta múltiplas vantagens, entre elas a necessidade de pequeno volume de amostra, alta reprodutibilidade, alta sensibilidade, e talvez a mais excitante de todas: o potencial para a análise múltipla. Os citômetros têm sido usados com sucesso em ensaios “multiplex” para o diagnóstico de doenças sexualmente transmissíveis, como: úlceras genitais (*Treponema pallidum*, *Haemophilus ducreyi*, *Herpes simplex 1 e 2*, *Klebsiella granulomatis*, *Chlamydia trachomatis*) e corrimentos vaginais (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Trichomonas vaginalis*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*)²⁸.

Revisões já documentaram a capacidade da CF em quantificar as células bacterianas em “amostras a fresco” em várias áreas da microbiologia. Porém, a cavidade vaginal e suas células foram pouco investigadas até o momento. Uma das primeiras descrições da análise de bactérias comensais em amostras vaginais por CF foi à quantificação simples e rápida do total de bactérias em amostras autocoletadas da cavidade vaginal. Um maior desenvolvimento desta técnica pode auxiliar no entendimento da dinâmica complexa do ecossistema vaginal²⁹.

Múltiplos fatores estão envolvidos na manutenção do ecossistema vaginal, sendo que alguns ainda são pouco compreendidos. Sabe-se que o equilíbrio deste ecossistema depende da integridade e trofismo da mucosa, da posição anatômica da vagina, da produção de ácido lático e peróxido de hidrogênio, do pH vaginal, do equilíbrio bacteriano com predomínio de lactobacilos, da produção de muco pela glândulas vestibulares, além da imunidade local. O entendimento destes mecanismos poderia auxiliar no tratamento individualizado e mais eficaz de algumas afecções, inclusive nas de curso crônico³⁰. A identificação detalhada do funcionamento de cada um destes mecanismos possibilitaria a introdução de medidas preventivas contra estas afecções, tão comuns nos consultórios

ginecológicos, o que melhoraria a qualidade da saúde da população, diminuindo os gastos públicos com determinadas doenças e suas sequelas.

Nos estudos sobre imunidade vaginal, na tentativa de conhecer melhor a resposta imune do trato genital feminino, a CF vem ganhando espaço devido à sua capacidade de identificar no microambiente genital células como leucócitos e células epiteliais, micro-organismos, citocinas, entre outras. Alguns estudos têm caracterizado leucócitos presentes no conteúdo vaginal por meio da CF. Di Fabio e colaboradores identificaram linfócitos, macrófagos em lavados da cavidade vaginal de macacas através da análise citométrica por FACS. Esta técnica permite estudar o microambiente vaginal e correlacionar o fenótipo celular à função imunológica³¹.

Givan e colaboradores desenvolveram um método para comparação quantitativa dos leucócitos nas trompas de Falópio, útero, colo uterino e vagina. Através da CF, demonstraram que os leucócitos representam 6% a 20% do número total de células destes órgãos, sendo que o útero e as trompas contêm maior proporção de leucócitos que o colo e a vagina³².

Atualmente existe a possibilidade de tornar o citômetro um instrumento pequeno, barato e flexível, capaz de substituir alguns testes laboratoriais. O advento de citômetros portáteis, que podem ser usados no ponto de coleta da amostra, permitirá o envio das leituras aos laboratórios por via eletrônica, possibilitando a avaliação imediata por peritos, auxiliando no controle de qualidade e tornando possível a coleta de uma nova amostra quando necessário^{28,33}.

Portanto, a CF poderá estar no contexto das doenças ginecológicas e obstétricas, servindo como uma arma fundamental em muito pouco tempo. Poderá auxiliar o diagnóstico e a monitorização dos tratamentos, oferecendo aos clínicos valores e resultados de maneira rápida. Na ginecologia e obstetrícia, vem sendo usada atualmente para pesquisas, porém tem futuro promissor para as atuações práticas diárias.

Referências bibliográficas

1. Davis BH, Holden JT, Bene MC, Borowitz MJ, Braylan RC, Cornfield D, et al. 2006 Bethesda International Consensus Recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia: medical indications. *Cytometry B Clin Cytom* 2007; 72(Suppl 1):S5-13.

2. Bertho AL, Ferraz R. Citometria de fluxo: princípios e aplicações. Rio de Janeiro (RJ): Fiocruz [internet] 2005 [citado 2010 Abr 10]. Disponível em:<<http://picf.ioc.fiocruz.br/apostila.doc>>
3. Shapiro H. Practical flow cytometry. 4^a ed. New York: Wiley-Liss; 2003.
4. Wilson WH. International consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia. Cytometry B Clin Cytom 2007; 72(Suppl 1):S2.
5. Stetler-Stevenson M, Davis B, Wood B, Braylan R. 2006 Bethesda international consensus conference on flow cytometric immunophenotyping of hematolymphoid neoplasia. Cytometry B Clin Cytom 2007; 72(Suppl 1):S3.
6. Craig FE, Foon KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. Blood 2008; 111(8):3941-67.
7. Ribeiro EM, Andrade EMF, Arruda AP, Ribeiro EM. Terapia com células-tronco. Rev Bras Clín Terap 2006; 32:11-6.
8. Moldavan A. Photo-electric technique for the counting of microscopical cells. Science 1934; 80:188.
9. Gucker FT Jr, O'Konski CT, Pickard HB, Pitts JN Jr. A photoelectronic counter for colloidal particles. J Am Chem Soc 1947; 69:2422-31.
10. Crosland-Taylor PJ. A device for counting small particles suspended in fluid through a tube. Nature 1953; 171:37.
11. Coulter WH. High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. Proc Natl Electronics Conf 1956; 12:1034.
12. Kamensky LA, Melamed MR, Derman H Spectrophotometer: new instrument for ultrarapid cell analysis. Science 1965; 150(3696):630-1.
13. Kamensky LA, Melamed MR. Spectrophotometric cell sorter. Science 1967; 156(780):1364-5.
14. Fulwyler MJ. Electronic separation of biological cells by volume. Science 1965; 150(698):910-1.

15. Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG et al. Fluorescence activated cell sorting. *Rev Sci Instrum* 1972; 43(3):404-9.
16. Shapiro H. History. In: Shapiro H. *Practical flow cytometry*, 4^a ed. New York: Wiley-Liss; 2003. p.73-100.
17. Meseguer M, Garrido N, Remohí J, Simón C, Pellicer A. Gender selection: ethical, scientific, legal, and practical issues. *J Assist Reprod Genet* 2002; 19(9):443-6.
18. Merchant FA, Castleman KR. Strategies for automated fetal cell screening. *Hum Reprod Update* 2002; 8(6):509-21.
19. Cha DH, Khosrotehrani K, Bianchi DW, Johnson KL. The utility of an erythroblast scoring system and gender-independent short tandem repeat (STR) analysis for the detection of aneuploid fetal cells in maternal blood. *Prenat Diagn* 2005; 25(7):586-91.
20. Bischoff FZ, Lewis DE, Nguyen DD, Murrell S, Schober W, Scott J, et al. Prenatal diagnosis with use of fetal cells isolated from maternal blood: five-color fluorescent in situ hybridization analysis on flow-sorted cells for chromosomes X, Y, 13, 18, and 21. *Am J Obstet Gynecol* 1998; 179(1):203-9.
21. Di Simone N, Lai M, Rumi C, Riccardi P, D'Asta M, Leone G, et al. Non-invasive detection of fetal rhesus D status: a comparison between polymerase chain reaction and flow cytometry. *Fetal Diagn Ther* 2006; 21(5):404-9.
22. Fernandes BJ, von Dadelszen P, Fazal I, Bansil N, Ryan G. Flow cytometric assessment of feto-maternal hemorrhage; a comparison with Betke-Kleihauer. *Prenat Diagn* 2007; 27(7):641-3.
23. Savithrisowmya S, Singh M, Kriplani A, Agarwal N, Mehra NK, Bhatla N. Assessment of fetomaternal hemorrhage by flow cytometry and Kleihauer-Betke test in Rh-negative pregnancies. *Gynecol Obstet Invest* 2008; 65(2):84-8.
24. Schoell WM, Klintschar M, Mirhashemi R, Strunk D, Giuliani A, Bogensberger G, et al. Separation of sperm and vaginal cells based on ploidy, MHC class I, CD45, and cytokeratin expression for enhancement of DNA typing after sexual assault. *Cytometry* 1999; 36(4):319-23.

25. Grundhoefer D, Patterson BK. Determination of liquid-based cervical cytology specimen adequacy using cellular light scatter and flow cytometry. *Cytometry* 2001; 46(6):340-4.
26. Singh M, Prasad S, Kalra N, Singh U, Shukla Y. Silver-stained nucleolar organizer regions in normal and dysplastic cervical lesions: correlation with DNA ploidy and S-phase fraction by flow cytometry. *Oncology* 2006; 71(5-6):411-6.
27. Narimatsu R, Patterson BK. high-throughput cervical cancer screening using intracellular human papillomavirus E6 and E7 mRNA quantification by flow cytometry. *Am J Clin Pathol* 2005; 123(5):716-23.
28. Jani IV, Janossy G, Brown DW, Mandy F. Multiplexed immunoassays by flow cytometry for diagnosis and surveillance of infectious diseases in resource-poor settings. *Lancet Infect Dis* 2002; 2(4):243-50.
29. Schellenberg J , Blake Ball T, Lane M, Cheang M, Plummer F. Flow cytometric quantification of bacteria in vaginal swab samples self-collected by adolescents attending a gynecology clinic. *J Microbiol Methods* 2008; 73(3):216-26.
30. Gonçalves AKS, Giraldo PC, Cornetta MCM, Linhares IM, Amaral RLG. Mecanismos de defesa vaginal. In: Martins NV, Ribalta JCL. *Patologia do trato genital inferior*. São Paulo: Roca; 2005. p.106-11.
31. Di Fabio S, Corrias F, Monardo F, Titti F. Flow citometry analysis of immune cell populations isolated from cervicovaginal secretions of cynomolgus monkeys. *J Immunol Methods* 2004; 284(1-2):7-14.
32. Givan AL, White HD, Stern JE, Colby E, Gosselin EJ, Guyre PM, Wira CR. Flow cytometric analysis of leukocytes in the human female reproductive tract: comparison of fallopian tube, uterus, cervix, and vagina. *Am J Reprod Immunol* 1997; 38(5):350-9.
33. Polina R, Sturgis C, Patterson J, Patterson BK. rapid, high throughput determination of cervical cytology specimen adequacy using a capillary-based cytometer. *Cytometry B Clin Cytom* 2008; 74(2):133-6.

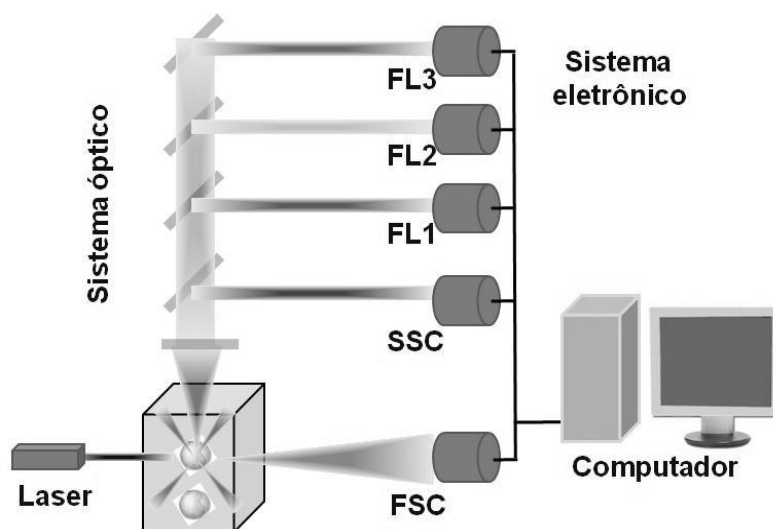


Figura 1. Principais componentes de um citômetro com 5 parâmetros (2 morfológicos e 3 cores): laser, sistema óptico, sistema de detectores (FSC, SSC, FL1, FL2 e FL3), sistema eletrônico.

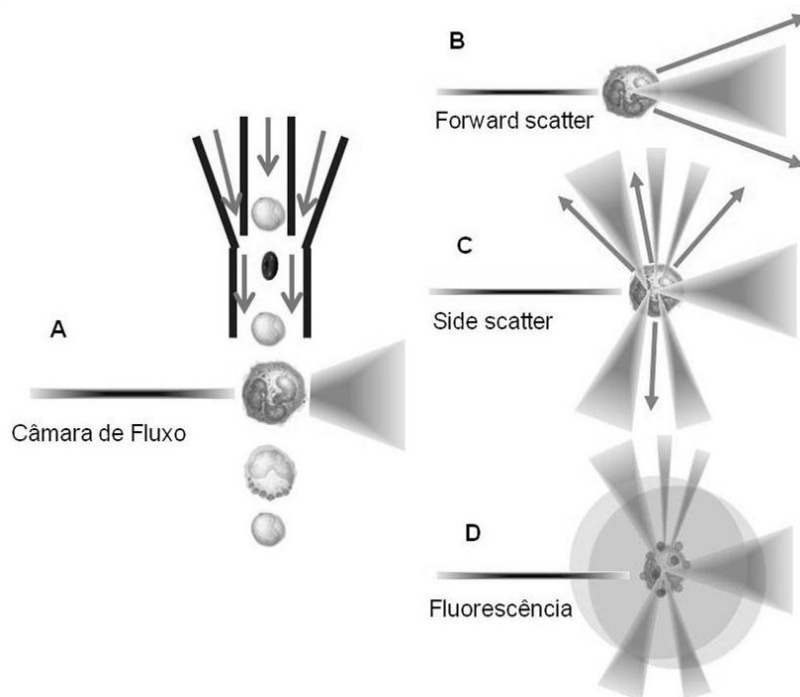


Figura 2. Resultado da interação do laser com a célula. Ao interagir com a célula o feixe luminoso (A) é desviado em diferentes ângulos. A luz com espalhamento frontal (forward scatter, B) é proporcional ao tamanho da célula. A luz com espalhamento lateral (side scatter, C) determina a complexidade celular. Anticorpos monoclonais conjugados a fluoróforos permitem detectar moléculas de superfície que caracterizam a célula (fluorescência, D).

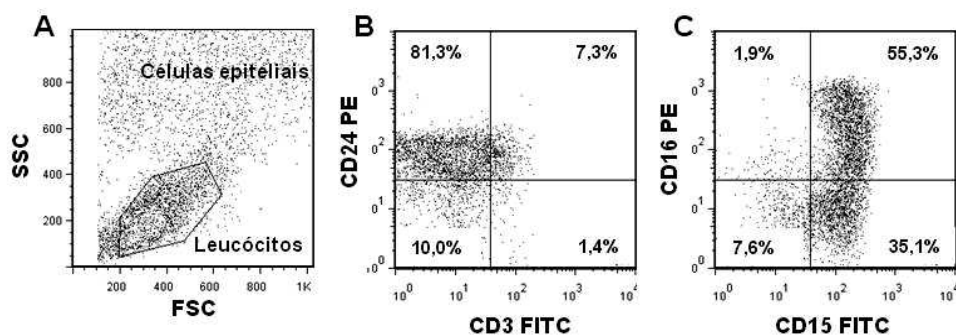


Figura 3: Exemplo de citometria utilizando como amostra suspensão de células vaginais obtidas por lavagem com 5ml de PBS. Figura **A** mostra os canais FSC (forward scatter) e SSC (side scatter) que definem a morfologia das células e permite selecionar a população de leucócitos. Figura **B** mostra os canais de fluorescência FL1 e FL2 (FL: foto sensor), permitindo a detecção de leucócitos marcados com anticorpo monoclonal anti CD24 que caracteriza os granulócitos. Figura **C** mostra os canais de fluorescência FL1 e FL2, permitindo a detecção de duas populações de neutrófilos uma marcada simultaneamente com os anticorpos monoclonais anti CD15 e anti CD16 e a segunda apenas com anti CD 15.