

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL –
PPGCA

ANÁLISE DA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS
(BAL) VAGINAIS CULTIVÁVEIS EM RESPOSTA AO ESTRÓGENO E
SUA INFLUÊNCIA NO POTENCIAL OXIDANTE E ANTIOXIDANTE
DO AMBIENTE VAGINAL EM *Ovis aries*

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

THAMIRIS VIEIRA MARSICO

Uruguaiana

2019

THAMIRIS VIEIRA MARSICO

ANÁLISE DA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS
(BAL) VAGINAIS CULTIVÁVEIS EM RESPOSTA AO ESTRÓGENO E
SUA INFLUÊNCIA NO POTENCIAL OXIDANTE E ANTIOXIDANTE
DO AMBIENTE VAGINAL EM *Ovis aries*

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

Orientador: Fernando Silveira Mesquita

Co-Orientador: Mateus José Sudano

Discente: Thamiris Vieira Marsico

Uruguaiana

2019

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

M372a Marsico, Thamiris Vieira Marsico
ANÁLISE DA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS (BAL)
VAGINAIS CULTIVÁVEIS EM RESPOSTA AO ESTRÓGENO E SUA INFLUÊNCIA
NO POTENCIAL OXIDANTE E ANTIOXIDANTE DO AMBIENTE VAGINAL EM
Ovis aries / Thamiris Vieira Marsico Marsico.
40 p.

Dissertação(Mestrado)-- Universidade Federal do Pampa,
DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL, 2019.
"Orientação: Fernando Silveira Mesquita Mesquita".

1. Microbiota vaginal. 2. Benzoato de estradiol. 3.
Ambiente redox. 4. Ovinos. I. Título.

THAMIRIS VIEIRA MARSICO

ANÁLISE DA POPULAÇÃO DE BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS
(BAL) VAGINAIS CULTIVÁVEIS EM RESPOSTA AO ESTRÓGENO E
SUA INFLUÊNCIA NO POTENCIAL OXIDANTE E ANTIOXIDANTE
DO AMBIENTE VAGINAL EM *Ovis aries*

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

Área de concentração: Reprodução e
Produção Animal

Dissertação defendida e aprovada em 25 de março de 2019.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Fernando Mesquita
Orientador
Universidade Federal do Pampa

Prof. Dra. Fracielli Cibin
Universidade Federal do Pampa

Prof. Dra. Irina Lübeck
Universidade Federal do Pampa

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer ao meu amor Guilherme, que não mediu esforços para que eu conseguisse passar por mais esses difíceis momentos e por todos os outros ao longo destes 8 anos, estando sempre comigo mesmo quando não era possível estar pessoalmente presente. Por isso e mais tantas outras coisas, não existem palavras suficientes para que eu demonstre a grandiosidade da presença dele neste momento da minha vida.

Gostaria de agradecer aos meus bons e velhos amigos, Bruno e Tina, que me receberam de braços abertos e providenciaram todo o suporte possível para que eu pudesse finalizar essa etapa, eu amo muito vocês. Também agradeço aos amigos que adquiri ao longo de minhas viagens durante esses 2 anos, em especial a Cecília e Isabela que me apoiaram muitas vezes quando eu não achava que conseguiria sozinha e fizeram meus problemas ficarem muito mais fáceis de encarar. Cada um de vocês faz parte da minha história e eu jamais irei esquecer isso.

Não poderia deixar de agradecer o pessoal do Laboratório BIOREP - UFSM, onde eu desenvolvi a primeira tentativa de projeto de mestrado. Pessoas especiais que me ajudaram de todas as formas possíveis, especialmente Vitor Rissi, que foi durante 6 meses um mentor extremamente dedicado e umas das pessoas mais generosas que eu conheci.

Além disso, gostaria de agradecer a Professora Irina e seu laboratório por me ensinarem tudo que foi preciso e me deram suporte para que o presente trabalho fosse concluído. Também agradeço a Professora Francielli, Professor Juliano e Professor Fernando por ajudarem em análises importantes na relevância dos dados.

Finalmente gostaria de agradecer a todos que de alguma forma me ajudaram e permitiram a realização do meu mestrado. A vocês todos meu muito obrigada!

*“It's a cruel and random
world, but the chaos is all so beautiful.”*

Hiromu Arakawa

RESUMO

Microbiota é o termo utilizado para caracterizar a comunidade de micro-organismos que habitam tecidos e fluídos biológicos de organismos multicelulares. Divergências nesta composição em vários casos podem ser relacionadas com o desenvolvimento de diversas enfermidades infecciosas, hepáticas, metabólicas, respiratórias, mentais, autoimunes e neoplasias intestinais. Esta proposta objetivou caracterizar as flutuações da população de bactérias ácido lácticas (BAL) cultiváveis no ambiente vaginal em resposta ao estrógeno em ovelhas de corte. Além disso, este trabalho verificou a correlação entre a presença de BAL cultiváveis na vagina e o potencial oxidativo deste ambiente. Para tanto, foram realizados experimentos para caracterização da microbiota BAL vaginal e do potencial oxidante/antioxidante deste ambiente em resposta a estrógeno divididos em três grupos (5 animais/grupo): (1) controles (D-2.5), (2) 12h após injeção de benzoato de estradiol (D.0.5) e (3) 60h após injeção de benzoato de estradiol (D.2.5). Os resultados sugerem um modelo *in vivo* apropriado para o estudo da microbiota vaginal e ambiente oxidante/antioxidante que foi capaz de detectar efeitos de benzoato de estradiol nas variáveis testadas. Em conclusão, estrógeno regula o ambiente vaginal microbiano pela alteração da população das BAL vaginais e o balanço entre atividade oxidante e antioxidante. Finalmente, as particularidades do modelo validado *in vivo* merecem uma investigação mais aprofundada para abordar questões recentes que surgiram a partir dos dados gerados por este estudo.

Palavras-chave: Microbiota vaginal, benzoato de estradiol, ambiente redox, ovinos.

ABSTRACT

Microbiota is the used term to characterize the community of microorganisms that inhabit tissues and biological fluids of multicellular organisms. Divergences in this composition in several cases may be related to the development of various infectious, hepatic, metabolic, respiratory, mental, autoimmune and intestinal neoplasms. This proposal aimed to characterize the fluctuations of the cultivable population of lactic acid bacteria (LAB) in the vaginal environment in response to estrogen in cut sheep. In addition, this work verified the correlation between the presence of cultured LABs in the vagina and the oxidative potential of this environment. To do so, experiments were carried out to characterize the vaginal microbiota and the oxidant/antioxidant potential of this environment in response to estrogen divided into three groups (n = 15): (1) controls (D-2.5), (2) 12h after injection of estradiol benzoate (D.0.5) and (3) 60h after injection of estradiol benzoate (D.2.5). The results suggest a appropriate *in vivo* model for studying vaginal microbiota and oxidant/antioxidant environment which was able to detect effects of estradiol benzoate (EB) on the assessed variables. In conclusion, estrogen acutely regulates the vaginal environment by altering the population of vaginal LAB and the balance between oxidant and antioxidant activity. Lastly, particularities of the validated *in vivo* model warrant further investigation to address recent questions that raised from the data generated.

Keywords: Vaginal microbiome, estradiol benzoate, redox state, ewes.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1. Ovinocultura	11
2.2. Fisiologia da reprodução	12
2.3. Perfil hormonal durante ciclo estral	13
2.4. Microbiota vaginal	14
2.5. Radicais livres, espécies reativas e enzimas antioxidantes	16
2.5.1. <i>Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos</i>	17
4. ARTIGO CIENTÍFICO	19
ABSTRACT	19
1. Introduction	20
2. Material and methods	22
2.1. <i>Experiment 1 – Quantitative analysis of the vaginal population of lactic acid bacteria</i>	22
2.2. <i>Experiment 2 – Oxidative and antioxidant potential of the vaginal environment</i>	22
2.3. <i>Vagina swab</i>	22
2.4. <i>Vaginal washing</i>	23
2.5. <i>Seeding of vaginal swabs</i>	23
2.6. <i>Reactive oxygen species (ROS) assay</i>	24
2.7. <i>Ferric reducing antioxidant potential (FRAP) assay</i>	24
2.8. <i>Statistical analysis</i>	24
3. Results	25
4. Discussion	26
5. Conclusions	28
References	29
5. CONCLUSÕES	32
6. PERSPECTIVAS	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
APÊNDICE	38

1. INTRODUÇÃO

A enorme demanda que está prevista para os produtos pecuários no início do século XXI, impulsionada quase inteiramente pelo crescimento populacional, aumento de renda e crescente urbanização nos países em desenvolvimento, apresenta uma oportunidade para o desenvolvimento de novas abordagens as quais incluem a relação entre microbioma e problemas de fertilidade para aumentar a produção animal sem exigir montantes maiores de terra (FAO, 2017).

Originalmente, os estudos científicos buscavam o agente patológico relacionado diretamente ao estado enfermo, porém com o advento de novas tecnologias, as chamadas ômicas, foi possível a caracterização abrangente da comunidade de micro-organismos que habitam tecidos ou fluídos biológicos de organismos multicelulares, chamada microbiota. Estudos de composição da microbiota em diversos tecidos e órgãos tem revelado associações com o desenvolvimento de condições, como por exemplo, obesidade, diabetes gestacional, pré-eclâmpsia, hipertensão, hipercolesterolemia, doenças cardiovasculares, renais, hepáticas, metabólicas, respiratórias, autoimunes, neoplasias, doenças mentais e psicológicas (Brown and Hazen, 2017; Daliri et al., 2017; Hou et al., 2017; Leung and Yimlamai, 2017; Pelzer et al., 2017; Wypych and Marsland, 2017). Contudo, os micro-organismos não estão relacionados apenas com estados disbióticos, é o caso dos probióticos, considerados micro-organismos vivos que quando administrados favorecem a saúde do hospedeiro (Reid, 2017). Um exemplo disso, é a presença de uma determinada população bacteriana favorecendo a saúde do trato reprodutor feminino. Foi comprovado que um distúrbio na proporção de bactérias benéficas e patogênicas está associado a casos de vaginose bacteriana em mulheres, sendo que a ingestão de bactérias probióticas como tratamento foi capaz de reverter o quadro (Anukam et al., 2006; Sirota et al., 2014; Recine et al., 2016). Outros estudos, relacionam a composição da microbiota sendo regulada por hormônios como progesterona (P4) e estrógeno (E2) e isso, consequentemente, influencia a resposta imune local e na atividade de barreira desenvolvida pelo epitélio vaginal (Doerflinger et al., 2014; Sirota et al., 2014).

O gênero bacteriano mais abundante e benéfico no trato genital, são os *Lactobacillus*. Estes pertencem a um grupo de bactérias chamadas bactérias ácido-láticas (BAL) em maioria consideradas comensais ou simbióticas apesar de apresentar poucas espécies patogênicas como *Streptococcus pneumoniae*. Este grupo possui esta denominação pela capacidade de produção fermentativa do ácido lático, além de ácido acético, etanol, acetona, proteases e bacteriocinas. Essas características, principalmente a

produção de agentes antimicrobianos como as bacteriocinas, fazem com que este grupo seja amplamente utilizado pela indústria farmacêutica e alimentícia (Bosma et al., 2017; Porto et al., 2017).

Há inúmeros casos na literatura de associação positiva entre a presença de bactérias específicas no trato reprodutor feminino, em particular as pertencentes ao grupo de BAL, e fertilidade. A confirmação desta relação tem levado à investigação acerca da utilização de probióticos conjuntamente a técnicas de reprodução assistida, a fim de incrementar as taxas de fertilidade e reduzir as perdas gestacionais em humanos (Moore et al., 2000; Sirota et al., 2014; Fox and Eichelberger, 2015; Franasiak and Scott, 2015; Mor et al., 2015). Ressalta-se ainda que além de um papel relevante na regulação do crescimento exagerado de bactérias patogênicas, a presença de *Lactobacillus* agrega benefícios adicionais, como por exemplo, o potencial de ligar-se e/ou degradar toxinas ambientais como metais pesados e pesticidas (Reid et al., 2013).

As flutuações hormonais, especialmente estrógeno, tem relação direta com os *Lactobacillus* e efeito bastante positivo no ambiente vaginal. Foi demonstrado que os níveis de estrógeno são diretamente proporcionais a população dessas bactérias no trato reprodutivo, onde em mulheres em menopausa, a população de BAL era muito baixa em comparação à mulheres na puberdade ou grávidas. Isso acontece porque o estrógeno induz a maturação das células epiteliais vaginais e a acumulação de glicogênio, que é o maior substrato utilizado pelas BAL. Com isso, os *Lactobacillus* promovem a acidificação do trato vaginal auxiliando na inibição de organismos patogênicos. Entretanto, os efeitos antimicrobianos causados pelos *Lactobacillus* vão muito além da acidificação do meio, eles são responsáveis pela produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), bacteriocinas e biosurfactantes, além de evitar a conexão física de patógenos com o epitélio vaginal e degradação via processos de autofagia (Amabebe and Anumba, 2018). Por isso, este trabalho evidenciou a caracterização das flutuações da população de bactérias ácido-láticas (BAL) cultiváveis no ambiente vaginal em resposta a estrógeno em ovelhas de corte. Além disso, foi analisada a correlação entre a presença de BALs cultiváveis na vagina e o potencial oxidativo deste ambiente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ovinocultura

A ovinocultura no Brasil é considerada uma atividade em expansão, pois ainda são enfrentados problemas de cultura, experiência e situação econômica do produtor. Ainda

há uma falta de organização e comunicação entre segmentos, os quais dificultam a criação de bancos de dados confiáveis em diversas áreas desta atividade, sendo estas informações predominantemente da espécie bovina. A ovinocultura é uma vertente do agronegócio que vem apresentando resultados positivos nos últimos anos dado a rapidez do giro do capital investido tendo como resultado alta lucratividade (Raineri et al., 2015).

Os maiores rebanhos mundiais encontram-se na Ásia, África e Oceania. Entretanto, em 2015, o Brasil apresentava aproximadamente 13,7 milhões de animais em seu rebanho (IBGE, 2017), localizados principalmente na região nordeste e sul nos estados da Bahia (BA) e Rio Grande do Sul (RS), o que demonstra um crescente interesse do mercado nacional. Entre estas duas regiões brasileiras há diferenças entre as raças, enquanto na região sul os animais são de raças de carne, laneiras e mistas, em geral adaptadas ao clima subtropical, os animais da região nordeste apresentam raças deslanadas com alta rusticidade adaptadas ao clima tropical (Silva et al., 2013).

No RS, a prática encontra-se atuante nas regiões sudeste e sudoeste do estado, porém o cenário se manteve com padrões similares aos do início da atividade, de forma extensiva e muitas vezes secundária, concomitante com a produção de bovinos. Além disso, a dificuldade de comércio de produtos derivados da ovinocultura está associada com as técnicas reprodutivas e as medidas sanitárias utilizadas, pois desta maneira só é possível criar rebanhos de poucos animais (Silva et al., 2013).

Nesse contexto, o segmento tem muito a evoluir a nível nacional e este crescimento é dependente de mudanças que vão desde o produtor até o consumidor. Ao mesmo tempo em que há limitações, esta cultura apresenta muito potencial a ser explorado. Dentre elas está a fixação do homem no campo, ajudando a promover o desenvolvimento de áreas rurais. Para isso, é necessário aumentar do efetivo de animais produzidos para contemplar áreas carentes de proteína animal, ajudando regiões menos favorecidas a suprir necessidades básicas.

2.2. Fisiologia da reprodução

Ovelhas são animais poliéstricos sazonais sensíveis ao fotoperíodo e seu ciclo dura em torno de 17 dias durante a estação reprodutiva. O estro dura em torno de 30 horas e ocorre geralmente no outono e pode sofrer influência de alguns fatores como: raça, idade, início da puberdade, estação de monta e presença do carneiro. O início da puberdade depende também da raça, além de fatores como nutrição, presença do macho e época do nascimento. Entretanto, estes animais podem iniciar sua vida sexual aos 7-8 meses de

idade quando atingirem 70% do peso corporal de um animal adulto (Senger, 2003; Bartlewski et al., 2011).

O desenvolvimento folicular e taxas de ovulação são cruciais para determinação da fertilidade. O ciclo apresenta 4 etapas: proestro, estro, metaestro e diestro. O estro é o momento em que a fêmea apresenta comportamento permissivo para acasalamento, cerca de 30h e quando ocorre a liberação do óvulo pelos ovários. Após a finalização do estro, começa a etapa chamada metaestro que tem duração de aproximadamente 3 dias e o momento de formação inicial do corpo lúteo (CL) afim de produzir progesterona para manter a gestação. O período em que o CL está completamente funcional é chamado de diestro e tem duração de 14 dias e proestro é quando ocorre o início da regressão do CL e queda da progesterona circulante caso não haja prenhez até o próximo estro (Evans et al., 2000).

Como estes animais são reprodutores sazonais, a tendência natural é que o acasalamento esteja posicionado em uma época do ano que permita o nascimento dos cordeiros na primavera quando a temperatura é mais quente e há bastante alimento disponível. Fora deste período, as ovelhas entram em estado de anestro onde não há ciclicidade e, portanto, não há gestações no rebanho (Lunstra and Christenson, 1981).

2.3. Perfil hormonal durante ciclo estral

Esse período da formação dos gametas está relacionado com uma sequência de eventos endócrinos que são regulados por uma série de órgãos e glândulas: (1) hipotálamo: produz GnRH, (2) glândula pituitária: FSH, LH e oxitocina, (3) folículo antral: estrógeno e inibina, (4) CL: progesterona e oxitocina, (5) endométrio uterino: prostaglandina (Scaramuzzi et al., 1993). Todas estas moléculas trabalham em conjunto para o sucesso da nova gestação. As gonadotrofinas derivadas da glândula pituitária, por exemplo, são responsáveis inicialmente pela maturação e desenvolvimento do folículo, esteroidogênese e formação do corpo lúteo, porém a biodisponibilidade e secreção destas moléculas está associada com fatores externos e internos como: presença dos feromônios masculinos, fotoperíodo, presença de esteroides ovarianos, estresse, outros hormônios proveniente do folículo, tradução de proteínas específicas, etc (Wagenmaker et al., 2010).

Em fazendas comerciais, biotécnicas para sincronização de estro permitem a produção de mais cordeiros em um intervalo menor de tempo e até mesmo fora da época de reprodução. Os métodos mais utilizados incluem a utilização de hormônios exógenos para o aumento da fertilidade destes animais (Hashim et al., 2013). Os métodos baseados

em progesterona e seus análogos simulam a atividade do corpo lúteo funcional afetando a fase luteínica do ciclo por meio da redução desta etapa, os tratamentos tradicionais incluem esponjas intravaginais embebidas em progesterona por 12-14 dias (Dias et al., 2015). Outros hormônios também podem ser adicionados concomitantemente com as esponjas, em bovinos a inserção de estradiol induz atresia folicular e o início de uma nova onda depois de 4,5 dias, em ovelhas a nova onda tem um atraso, iniciando em torno de 5-7 dias (Barrett et al., 2008).

Os principais estrógenos utilizados são 17 β -estradiol e benzoato de estradiol, utilizados em bovinos e ovinos a fim de suprimir as concentrações FSH para emergência de uma nova onda folicular. Em alpacas foi demonstrado que uma dose intramuscular de 17 β estradiol 0,5 mg ou 2 mg foi capaz de induzir regressão folicular e iniciar uma nova onda, possivelmente pela regulação de gonadotrofinas pelo estradiol nessa espécie (Ratto et al., 2003). Inicialmente, foi demonstrado que as concentrações de estradiol eram inversamente relacionadas com as concentrações sistêmicas de FSH (Baird et al., 1991), porém estudos posteriores demonstraram que não há existência de correlação temporal (Bartlewski et al., 1998). Outros estudos demonstraram que apenas doses de estrógeno muito acima do fisiológico durante a fase luteínica afetam a secreção de FSH e em um atraso na emergência da onda folicular. Outro estudo mostrou que implantes que liberam estradiol subcutâneo, aumentaram 3 vezes a concentração em 20 dias e a supressão da onda através da limitação dos picos de FSH, sugerindo que há uma concentração basal de FSH necessário antes da nova onda acontecer (Barrett et al., 2007).

2.4. Microbiota vaginal

Microbiota é o termo utilizado para caracterizar a comunidade de micro-organismos presentes em tecidos e fluídos biológicos de animais multicelulares. Na literatura há diversos estudos relacionando a composição da microbiota de diversos órgãos com o desenvolvimento de enfermidades, como por exemplo, obesidade, diabetes gestacional, pré-eclâmpsia, hipertensão, hipercolesterolemia, doenças cardiovasculares, renais hepáticas, metabólicas, respiratórias, e autoimunes, neoplasias, doenças mentais e psicológicas (Brown and Hazen, 2017; Daliri et al., 2017; Hou et al., 2017; Leung and Yimlamai, 2017; Pelzer et al., 2017; Wypych and Marsland, 2017). A partir disso foi desenvolvido o conceito de probiótico, micro-organismos vivos que favorecem a saúde do hospedeiro, pois havia a necessidade de identificação de bactérias com características

favoráveis à manutenção do funcionamento normal de órgãos e sistemas orgânicos (Reid, 2017).

Neste sentido, estudos do trato reprodutor feminino têm demonstrado que a presença de algumas espécies de bactérias está associada ao organismo saudável. Como acontece no caso da vaginose bacteriana em mulheres, por exemplo, onde há desequilíbrio na proporção entre bactérias benéficas e patogênicas. Entretanto, pode ser tratado de maneira eficiente com o uso de bactérias probióticas como demonstrado em alguns estudos (Anukam et al., 2006; Sirota et al., 2014; Recine et al., 2016). Além disso, esta microbiota pode ser influenciada pelas concentrações de E2 e P4 circulantes e consequentemente influenciar a resposta imune local e a atividade de barreira desenvolvida pelo epitélio vaginal, por exemplo (Doerflinger et al., 2014; Sirota et al., 2014).

Esta associação de bactérias benéficas, principalmente *Lactobacillus*, com a saúde do trato reprodutor feminino não acontece ao acaso. Os *Lactobacillus* pertencem a um grupo de bactérias chamado de bactérias ácido-láticas (BAL), que apesar da presença de algumas poucas bactérias patogênicas como o *Streptococcus pneumoniae*, é amplamente composto por bactérias consideradas comensais ou mesmo simbióticas. Estas bactérias têm como característica a produção fermentativa de ácido lático, ácido acético, etanol, acetona, proteases e bacteriocinas. A produção de bacteriocinas, ou biomoléculas com atividade antimicrobiana, por algumas espécies de BAL justifica o amplo uso deste grupo de bactérias pela indústria farmacêutica e alimentícia (Bosma et al., 2017; Porto et al., 2017). De particular interesse para este estudo, são os inúmeros relatos de associação positiva entre a presença de bactérias específicas no trato reprodutor feminino, em particular as pertencentes ao grupo de BAL, e fertilidade (Moore et al., 2000; Sirota et al., 2014; Fox and Eichelberger, 2015; Franasiak and Scott, 2015; Mor et al., 2015). A confirmação desta relação tem levado à investigação acerca da utilização de probióticos conjuntamente a técnicas de reprodução assistida, a fim de incrementar as taxas de fertilidade e reduzir as perdas gestacionais em humanos (Franasiak and Scott, 2015). Ressalta-se ainda que além de um papel relevante na regulação do crescimento exagerado de bactérias patogênicas, a presença de *Lactobacillus* agrega benefícios adicionais, como por exemplo, o potencial de ligar-se e/ou degradar toxinas ambientais como metais pesados e pesticidas (Reid et al., 2013).

2.5. Radicais livres, espécies reativas e enzimas antioxidantes

O termo radical livre (RL) refere-se ao átomo ou molécula que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não-emparelhamento de elétrons que lhes confere alta reatividade tornando-os instáveis e fazendo com que estejam sempre buscando capturar ou ceder elétrons das células à sua volta através de reações de oxidação-redução (COTINGUIBA, 2013). A geração de radicais livres é um processo contínuo e fisiológico, cumprindo funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas, no entanto, a produção excessiva de RL pode conduzir a danos celulares.

Radical livre não é o termo ideal para designar os agentes reativos provenientes do oxigênio, pois alguns deles não apresentam elétrons despareados em sua última camada (FERREIRA and L.S, 1997). A principal via de metabolismo do oxigênio envolve a sua completa redução em água, incorporando quatro elétrons ao final da cadeia de transporte de elétrons no interior da mitocôndria. Havendo ao longo da cadeia respiratória redução do oxigênio com número menor de elétrons, ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Cerca de 2% a 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias é desviado para outra via metabólica, e reduzido de forma univalente, dando origem a espécies reativas como os radicais superóxido, hidroxila e peróxido de hidrogênio (BARBOSA, 2010). A principal espécie reativa de nitrogênio (ERN) e que origina outras ERN é o óxido nítrico, um gás inorgânico, incolor e radical livre por possuir em sua configuração eletrônica sete elétrons do nitrogênio e oito elétrons do oxigênio resultando em um elétron desemparelhado.

Fontes geradoras de RL podem ser endógenas (mitocôndrias, citoplasma, membrana celular, peroxissomos, NADPH oxidases, lipoxigenases, citocinas inflamatórias, etc) ou exógenas (poluição, estresse, resíduos pesticidas, álcool, cigarro, gorduras saturadas, etc). Porém, os RL têm funções positivas para o organismo que envolvem mecanismos de defesa, ataque e destruição das células de micro-organismos patogênicos, geração de energia e ativação de genes. Entretanto, em situações de estresse oxidativo podem causar envelhecimento precoce, mutações, doenças como Parkinson, mal de Alzheimer, entre outras.

Os compostos antioxidantes são substâncias que em concentrações mínimas têm como função bloquear e reduzir os danos decorrentes da formação de radicais livres e, conseqüentemente, inibir o estresse oxidativo através de diferentes mecanismos de ação.

De acordo com a estrutura dos antioxidantes, os mecanismos de ação podem ser enzimáticos ou não enzimáticos e são provenientes de fontes endógenas, quando produzidos intracelularmente através de mecanismo de retroalimentação negativo ou fonte exógena por meio da alimentação (Barboza et al 2010).

2.5.1. *Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos*

Existem várias isoformas de superóxido dismutases (SOD), classificadas em três grupos: CuZn-SOD (citoplasma), Mn-SOD (mitocôndrias) e Ec-SOD (extracelular) (Vasconcelos et al., 2007). A SOD “dismuta” a molécula de superóxido. A dismutação é um tipo único de reação, onde duas equações idênticas, porém opostas ocorrem em duas moléculas separadas. A SOD usa duas moléculas de superóxido, retira o elétron extra de uma e coloca na outra. Com isso, uma molécula acaba com um elétron a menos e forma o gás O₂ e a outra permanece com um elétron a mais. Esta última, reúne dois hidrogênios e forma peróxido de hidrogênio, o qual continua sendo tóxico e por isso é necessário que a cascata de desintoxicação continue (Fukai and Ushio-Fukai, 2011).

A catalase é uma enzima encontrada no peroxissoma em todos os organismos que possuem o oxigênio em seu metabolismo. Basicamente a CAT está envolvida no processo de desintoxicação celular via quebra de peróxidos orgânicos, oxigênios singlete e resíduos carbonílicos, todos provenientes dos ácidos graxos de cadeia longa, transformando-os em água e oxigênio, o que a torna muito importante para evitar os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO). Esta enzima é um tetrâmero de 240 kDa e cada molécula contém 4 grupos heme em que o ferro se encontra em estado oxidado, que são o sítio de catalítico com o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Kirkman and Gaetani, 1984; Vasconcelos et al., 2007). A CAT faz a rápida destruição da molécula de peróxido de hidrogênio. No processo, o H₂O₂ se liga à CAT onde é quebrada; um átomo de oxigênio é extraído e ligado ao átomo de ferro, e o resto é liberado em moléculas de água. Posteriormente, uma segunda molécula de peróxido de hidrogênio se liga, é quebrada e liberada em água. A segunda molécula de oxigênio se liga a primeira e é liberada em forma de gás oxigênio (Li and Schellhorn, 2007; Vasconcelos et al., 2007).

A glutathione peroxidase (GPx) é uma enzima dependente do micronutriente Selênio (Se), o qual auxilia na redução de peróxidos lipídicos e peróxidos de hidrogênio para álcool e água, respectivamente (Espinoza et al., 2008). A família das GPx possui diferentes isoformas e cada uma delas é encontrada em um local diferente dentro do organismo. Enquanto a GPx1 é encontrada universalmente no citosol de todas as células

do corpo, GPx2 (trato gastrointestinal), GPx3 (pulmão, leite materno e plasma) e GPx4 (membranas e lipoproteínas) são mais especializadas em tipos celulares determinados (Vasconcelos et al., 2007; Espinoza et al., 2008). Basicamente, a GPx utiliza glutathiona (GSH) reduzida que serve como doadora de elétrons, ou seja, a GSH é oxidada e perde sua habilidade de reduzir peróxidos nesta forma, conhecida como dissulfeto de glutathiona (GSSG). Esta molécula é regenerada por outra enzima chamada Glutathiona redutase (GR) por meio de uma reação com gasto de energia via oxidação de NADPH (Aitken and Roman, 2008; Higuchi, 2014).

Outra parte da defesa antioxidante são as substâncias não enzimáticas, as mais conhecidas são as vitaminas A, C e E, minerais como selênio e manganês, e carotenoides como o betacaroteno, a luteína e o licopeno (Lobo et al., 2010).

A vitamina C, mais conhecida tem ação “scavenger” e é encontrada facilmente em diversas frutas cítricas, além de outros alimentos como pimentões e tomates. Ela age diretamente na proteção com infecções, auxilia na produção de colágeno e absorção de ferro pelo organismo. Já a vitamina E tem grande efeito antioxidante e regenerador, protegendo o organismo contra envelhecimento e danos nos tecidos oculares, cardiovasculares, etc. A vitamina E está presente em uma variedade imensa de grãos mas também em vegetais de folhas verdes como espinafre e couve, além de óleos de soja, girassol, etc. A vitamina C por ser hidrossolúvel possuía ação principal no plasma sanguíneo, enquanto a vitamina E age nas membranas celulares por ter características lipossolúveis (Niki and Traber, 2012; Lykkesfeldt et al., 2014). Os carotenoides mais conhecidos são os β -carotenos, precursores da vitamina A no intestino, responsáveis pela redução dos danos causado pelos RL via sequestro de lipoperóxidos juntamente com as lipoproteínas presentes no intestino (Johnson et al., 2018). Geralmente são encontrados em as frutas como pêssigo, damasco, mamão e manga, além de brócolis, abóbora e batatas doces.

Estudos demonstraram a influência de hormônios esteroides no estresse oxidativo. Hormônios produzidos pela tiroide regulam metabolismo de diversos tecidos como: músculo esquelético, cardíaco, hepático, renal e cerebral via aumento de consumo de O₂, geração de calor e flutuações no metabolismo intermediário. O aumento no consumo de O₂ aumenta a fosforilação oxidativa que consequentemente aumenta a produção de ERO. Isso é constatado em casos de hipotireoidismo, que apresentam menor produção de ERO em um estudo que relacionou GSH/GSSG e nível de GR, todos aumentados em casos de

hipotireoidismo e com aplicação hormonal exógena todos voltaram aos seus níveis basais (Araujo, 2002).

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo caracterizar as flutuações da população de bactérias ácido lácticas (BAL) cultiváveis no ambiente vaginal em resposta ao estrógeno em ovelhas de corte. Além disso, este trabalho verificou a correlação entre a presença de BAL cultiváveis na vagina e o potencial oxidativo deste ambiente

4. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas encontram-se no próprio manuscrito que será submetido para publicação no periódico *Livestock Science*.

ANALYSIS OF THE POPULATION OF VAGINAL LACTIC ACID BACTERIA (LAB) CULTIVATED IN RESPONSE TO ESTROGEN AND ITS INFLUENCE ON THE OXIDATIVE POTENTIAL OF THE VAGINAL ENVIRONMENT IN *Ovis aries*

Thamiris Vieira Marsico¹, Irina Lübeck¹, Francielli Weber Santos Cibin¹, Tiago Gallina Correa¹, Juliana Bernera Ramalho¹, Juliano Gonçalves Pereira², Mateus José Sudano³, Fernando Silveira Mesquita^{1*}

¹ School of Veterinary Medicine, Federal University of Pampa, UNIPAMPA – Uruguaiana/RS - Brazil

² School of Veterinary Medicine, São Paulo State University, UNESP – Botucatu/SP - Brazil

³ Center for Natural and Human Sciences, Federal University of ABC, UFABC – Santo André/SP – Brazil

* Corresponding author: fernandomesquita@unipampa.edu.br

ABSTRACT

Microbiota is the used term to characterize the community of microorganisms that inhabit tissues and biological fluids of multicellular organisms. Divergences in this composition in several cases may be related to the development of various infectious, hepatic, metabolic, respiratory, mental, autoimmune and intestinal neoplasms. This proposal aimed to characterize the fluctuations of the cultivable population of lactic acid bacteria (LAB) in the vaginal environment in response to estrogen in cut sheep. In

addition, this work verified the correlation between the presence of cultured LABs in the vagina and the oxidative potential of this environment. To do so, experiments were carried out to characterize the vaginal microbiota and the oxidant/antioxidant potential of this environment in response to estrogen divided into three groups (n = 15): (1) controls (D-2.5), (2) 12h after injection of estradiol benzoate (D0.5) and (3) 60h after injection of estradiol benzoate (D2.5).

The results suggest a appropriate *in vivo* model for studying vaginal microbiota and oxidant/antioxidant environment which was able to detect effects of estradiol benzoate (EB) on the assessed variables. In conclusion, estrogen acutely regulates the vaginal environment by altering the population of vaginal LAB and the balance between oxidant and antioxidant activity. Lastly, particularities of the validated *in vivo* model warrant further investigation to address recent questions that raised from the data generated.

Keywords: Vaginal microbiome, estradiol benzoate, redox state, ewes.

1. Introduction

The huge demand for livestock products in the early 21st century, driven almost entirely by population growth, income growth and increasing urbanization in developing countries, presents an opportunity for the development of new approaches which include the relationship between microbioma and fertility problems to increase animal production without requiring larger amounts of land (FAO, 2017).

Originally, scientific studies focused in finding the pathological agent directly related to the disease state, but with the advent of new technologies, the so-called omics, it was possible the comprehensive characterization of the microorganism's community that inhabit biological tissues or fluids of multicellular organisms, called microbiota. Studies of the composition of the microbiota in different tissues and organs have revealed associations with the development of conditions such as obesity, gestational diabetes, preeclampsia, hypertension, hypercholesterolemia, cardiovascular diseases, hepatic renal, metabolic, respiratory, and autoimmune diseases, neoplasia, mental and psychological illness (Brown and Hazen, 2017; Daliri et al., 2017; Hou et al., 2017; Leung and Yimlamai, 2017; Pelzer et al., 2017; Wypych and Marsland, 2017). However, microorganisms are not only related to dysbiosis states, such as probiotics, which are considered living microorganisms that, when administered, favour host health (Reid, 2017). An example of this is the presence of a certain bacterial population favouring the

health of the female reproductive tract. It has been proven that a disorder in the proportion of beneficial and pathogenic bacteria is associated with cases of bacterial vaginosis in women, and the ingestion of probiotic bacteria as treatment was able to reverse the disease (Anukam et al., 2006; Sirota et al., 2014; Recine et al., 2016). Other studies have related the composition of the microbiota being regulated by hormones such as P4 and E2 and this consequently influences the local immune response and the barrier activity developed by the vaginal epithelium (Doerflinger et al., 2014; Sirota et al., 2014).

The most abundant and beneficial bacterial species in the genital tract are *Lactobacillus*. These belong to a group of bacteria called acid-lactic bacteria (LAB), most of them considered commensal or symbiotic, although they have few pathogenic species such as *Streptococcus pneumoniae*. This group has this denomination for the lactic acid fermentative production capacity, as well as acetic acid, ethanol, acetone, proteases and bacteriocins. These characteristics, especially the production of antimicrobial agents such as bacteriocins, make this group widely used by the pharmaceutical and food industry (Bosma et al., 2017; Porto et al., 2017).

There are numerous cases in the literature of positive association between the presence of specific bacteria in the female reproductive tract those belonging to the LAB group, and fertility. The confirmation of this relationship has led to research on the use of probiotics in conjunction with assisted reproduction techniques in order to increase fertility rates and reduce gestational losses in humans (Moore et al., 2000; Sirota et al., 2014; Fox and Eichelberger, 2015; Franasiak and Scott, 2015; Mor et al., 2015). In addition to a significant role in regulating the overgrowth of pathogenic bacteria, the presence of *Lactobacillus* adds additional benefits, such as the potential to bind and degrade environmental toxins such as heavy metals and pesticides (Reid et al., 2013).

Hormonal fluctuations, especially estrogen, are directly related to *Lactobacillus* and have a very positive effect on the vaginal environment. It has been shown that estrogen levels are directly proportional to the population of this bacteria in the reproductive tract, where in menopausal women, the LAB population was very low compared to women at puberty or pregnant women. This is because estrogen induces the maturation of vaginal epithelial cells and the accumulation of glycogen, which is the largest substrate used by LABs. Thus, *Lactobacillus* promotes acidification of the vaginal tract by helping to inhibit pathogenic organisms. However, the antimicrobial effects caused by *Lactobacillus* go far beyond the acidification of the medium, they are responsible for the production of hydrogen peroxide (H₂O₂), bacteriocins and

biosurfactants, besides avoiding the physical connection of pathogens with the vaginal epithelium and degradation via autophagy (Amabebe and Anumba, 2018). Therefore, this work evidenced the characterization of fluctuations of the lactic acid bacterial (LAB) population in the vaginal environment in response to estrogen in ewes. In addition, the correlation between the presence of cultured LABs in the vagina and the oxidative potential of this environment was analysed.

2. Material and methods

2.1. Experiment 1 – Quantitative analysis of the vaginal population of lactic acid bacteria

Five adult ewes were treated with two injections of 125 ug of sodium cloprostenol (Sincrocio, Ouro Fino, PGF), 11 days apart and checked twice daily for estrous signs, using an adult, healthy ram. Ewes were considered in anestrus. On Day zero (D0), fourteen days after the second PGF injection, five ewes were randomly selected (n=15), and a vaginal sample was collected by a sterile swab (Fig. 1). Vaginal swab was processed for *in vitro* culture to determine growth of lactic acid bacteria. Twelve hours later, PGF was administered to all experimental animals. On Day 2.5, all ewes were injected with 1 mg of estradiol benzoate (Sincrodiol, Ouro Fino, EB). On D3 and D5, the second and third vaginal swab sampling was performed on the same ewes previously collected.

2.2. Experiment 2 – Oxidative and antioxidant potential of the vaginal environment

Fifteen adult ewes received the same exogenous hormonal protocol and estrus observation regimen. Ewes were considered in anestrus. On Day zero (D0), fourteen days after the second PGF injection, five ewes were randomly selected (n=15), and a vaginal washing was performed to assess the oxidative and antioxidant potential of the vaginal environment. Twelve hours later, PGF was administered to all animals. On Day 2.5, all ewes were injected with 1 mg of estradiol benzoate (EB). On D3 and D5, two different groups of five ewes were randomly selected for each day and vaginal washing was collected.

2.3. Vagina swab

External genitalia were wiped with 70% ethanol and a paper towel to minimize vaginal contamination with debris. Vulva was gently opened with gloved hands, swab was removed from its package, and introduced towards the cranial most extremity of the

vagina. Swab was turned clockwise and rubbed against the vaginal wall for approximately 15 seconds, removed and stored into a sterile glass tube containing 1 ml of sterile saline. Swabs were immediately transported at room temperature to the lab for seeding.

2.4. Vaginal washing

External genitalia were wiped with 70% ethanol and a paper towel to minimize vaginal contamination with debris. Vulva was gently opened with gloved hands and a sterile traqueotube was introduced into the vagina until the balloon was no longer observed. Five ml of air was injected into the balloon, and vaginal washing was performed by injecting 20 ml of sterile saline through sterile a traqueotube into the vagina, followed by immediate inversion of the tube into a sterile collection tube. Tubes were immediately transported to the lab, aliquoted and stored at -20°C for later processing.

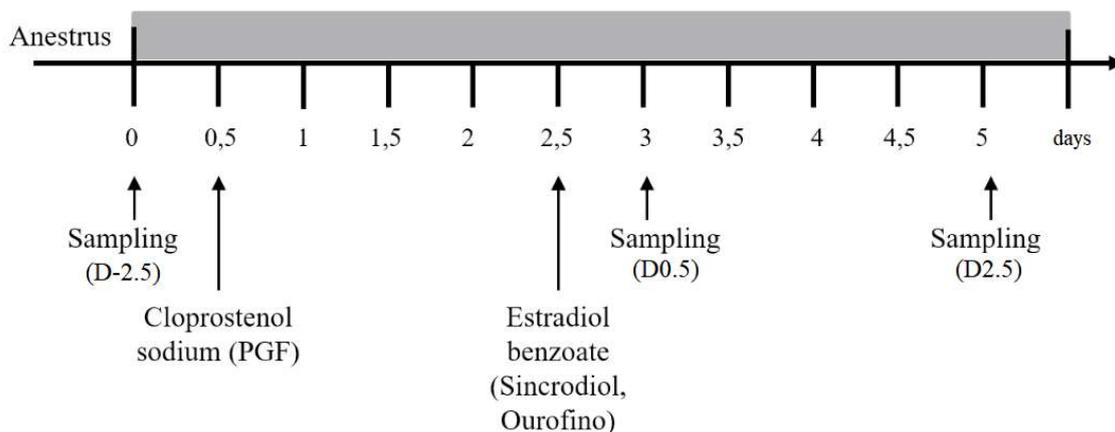


Fig 1. Synchronization protocol. Sampling (swab and washing) was done in days D-2.5 (60 hours prior to 1 mg estradiol benzoate - EB - injection; D0), D0.5 (12 hours post EB injection) and D2.5 (60 hours post EB injection).

2.5. Seeding of vaginal swabs

After vaginal swab collection tubes containing swabs in 0.85% saline solution and vortexed for 30 sec. In duplicates, 1ml of the saline suspension of vaginal swab was seeded on MRS agar (De Man and Rogosa and Sharpe) by the pour plate method without dilution, for growth of acid lactic bacteria. Plates were incubated at 37°C for 72h. In addition, the plates were conditioned in anaerobic jars with anaerobiosis generating system and after the 72h in MRS agar the most expressive colonies were transferred to MRS broth and cultivated for another 24h at 37°C to be used to catalase, oxidase and Gram staining tests followed by addition of 10% glycerol and kept at -80 ° C for storage.

2.6. Reactive oxygen species (ROS) assay

Reactive oxygen species levels were determined by a spectrofluorimetric method using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-D) (Loetchutin et al., 2005). The samples were incubated in the dark with 5 µl of DCF-C (1 mM). The oxidation of DCF-D was monitored for fluorescent dichlorofluorescein (DCF) by the reactive species. The emission of the fluorescence intensity was performed at 520 nm (488 nm excitation) 60 minutes after the addition of DCF-D in Shimadzu Spectrofluorimeter model RF-5301PC. The results are expressed as FU (fluorescence units).

2.7. Ferric reducing antioxidant potential (FRAP) assay

The vaginal washing antioxidant potential was determined by ferric reducing antioxidant potential assay. In this assay, the antioxidants present in the sample were evaluated as reducers from Fe₊₃ to Fe₊₂, which is chelated by 2,4,6-Tri (2-pyridyl) -s-triazine (TPTZ) to form the Fe₊₂-TPTZ with maximum absorption at 593 nm (Benzie and Strain, 1996).

2.8. Statistical analysis

Colony forming units (CFU), fluorescence units of fluorescent dichlorofluorescein and µg ascorbic acid equivalent data were not normally distributed according to PROC UNIVARIATE results. After logarithm transformation data met the analysis of variance assumptions of normal distribution and equality of variances, as well as sphericity for the repeated measures analysis of variance.

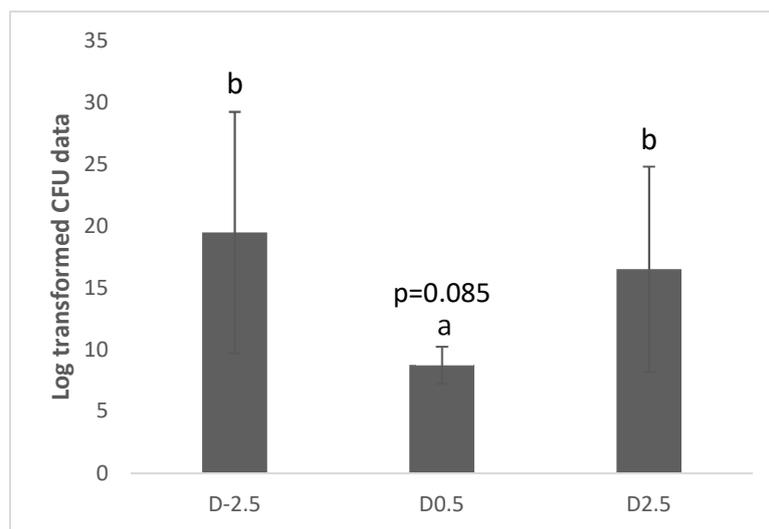
Population of lactic acid bacteria was measured as number of colonies forming units after seeding of vaginal swab for *in vitro* culture. Comparisons were performed across the three experimental groups, characterized by sampling day having as reference the day of estradiol benzoate exposure (D0). A repeated measures design was used, where the same five ewes were collected at all three time points, therefore, a one-way repeated measures ANOVA was applied. The GLM procedure and repeated command were used in the statistical package SAS. In spite of the lack of a significant effect of group from the repeated measures ANOVA, the numerical difference between the acute EB effect (D0.5) and the other two groups, prior and late EB effect, was assessed by the contrast command.

Oxidant and antioxidant potentials, measured by oxidation of dichlorofluorescein acetate to fluorescent dichlorofluorescein and reduction of Fe₊₃ to Fe₊₂, respectively, were compared across the three experimental groups described above. A completely

randomized design was used, where 5 different ewes were randomly assigned to each of the three experimental groups. GLM procedure was applied in the SAS statistical package. Upon the observation of a significant effect of group by the ANOVA, the Bonferroni *post hoc* test for comparison of means was used.

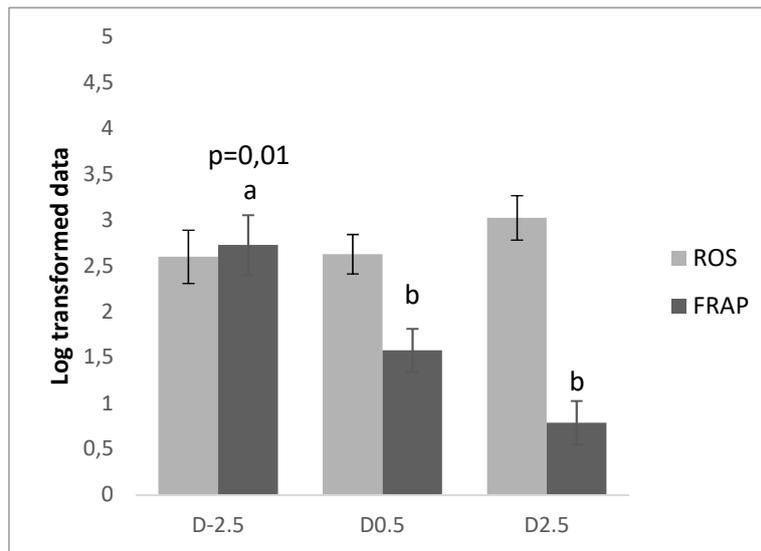
3. Results

Overall quantitative analysis of vaginal population of LAB did not indicate differences among experimental groups, as shown on Graph 1. However, numerical difference suggesting an acute decrease in the population of LAB near the EB exposure, which is followed by a return to pre-EB exposure levels was confirmed by contrast analysis between CFU at D0.5 and the average of CFU at D-2.5 and D2.5 together ($P=0.085$).



Graph 1. Response of lactic acid bacteria population to estradiol benzoate challenge. Analysis of variance comparing sampling days D-2.5 (60 hours prior to 1 mg estradiol benzoate - EB - injection; D0), D0.5 (12 hours post EB injection) and D2.5 (60 hours post EB injection). Mean \pm standard error of the mean of log-transformed colony forming units (CFU). $N_{\text{total}}=15$, 5 each group.

Assessment of the vaginal environment by sampling vaginal secretions in sterile sodium chloride 0.85% identified a reduced antioxidant potential (FRAP) at both acute and late exposure to EB (Graph 2). No difference was observed for reactive oxygen species levels (ROS) across experimental groups.



Graph 2. Response of lactic acid bacteria oxidant and antioxidant capacity of the vaginal environment to estradiol benzoate challenge. Analysis of variance comparing sampling days D-2.5 (60 hours prior to 1 mg estradiol benzoate - EB - injection; D0), D0.5 (12 hours post EB injection) and D2.5 (60 hours post EB injection). Mean \pm standard error of the mean of log-transformed fluorescence units of fluorescent dichlorofluorescein (ROS) and log-transformed μ g of ascorbic acid equivalent (FRAP).

4. Discussion

Presence of LAB have the potential to modulate local homeostasis by preventing the overgrowth of pathogenic microorganisms, therefore influencing local and systemic health status. In addition, LAB further influence local environment through biochemical activities that reduce pH and alter oxidant/antioxidant equilibrium for instance. According to our overarching hypothesis fluctuations in the vaginal LAB population and oxidant/antioxidant potential are under the influence of cyclic changes of ovarian steroid hormones. Our work provides strong evidence that exogenous administration of estradiol benzoate induces an acute response of the ovine vaginal environment associated with reduced population of cultivable LAB and reduced antioxidant potential.

In humans, the increase in circulating estrogen promotes maturation, proliferation and accumulation of glycogen in the vaginal epithelial cells. LAB, estrogen and glycogen are responsible for formation of acidic environment by the decrease in pH, which assists in the growth of *Lactobacilli* species and other anaerobic bacteria (Aldunate et al., 2015). This idea is reinforced by studies looking at vaginal microbiota of menopause women, where estrogen concentrations decline along with the dominance of *Lactobacilli*, returning to normal after hormone replacement therapy (Gupta et al., 2006).

Basically, estrogen and *Lactobacillus* genera have a positive effect on the vaginal environment. Glycogen released from exfoliated or lysed cells is catabolized by α -

amylase into the vaginal lumen and subsequently transformed into lactic acid by *Lactobacilli*. This genera produce not only lactic acid, but also cytolysins, stimulating the lysis of epithelial cells to increase the bioavailability of glycogen. In addition, lactic acid collaborates to the acidification of the vaginal milieu, which facilitates the proliferation of *Lactobacillus* spp. and hinders that of other organisms, including pathogens. The antimicrobial effect caused by *Lactobacillus* goes beyond the acidification of the environment. Production of hydrogen peroxide (H₂O₂), bacteriocins and biosurfactants, as well as competitive inhibition of pathogen binding to the vaginal epithelium represent additional antimicrobial mechanisms used by *Lactobacillus* (Amabebe and Anumba, 2018). Our data indicates an acute reduction in the population of cultivable LAB at 12 hours post EB injection, followed by a return to pre-EB exposure CFU counts. In comparison to cycling individuals (menstrual or estrous cycle), anoestrus ewes experience neither a progesterone priming effect, nor a post-estrogen progesterone exposure. Furthermore, pharmacological exposure to EB is known to promote supraphysiological estradiol plasma concentrations, which were likely maintained above pre-exposure concentrations for up to 5 days. Such particularities of the model used in our study create a distinct endocrine environment that may explain observed results. The assessment of acute effects of estrogen (i.e., 12 hours) on local microbiome has not been explored. Although a positive relationship among estrogen concentrations, glycogen production and LAB population has been reported, the mechanism is unlikely to take place within a few hours. In addition, it is speculated that an immediate response of the vaginal epithelium to estrogen is taken towards accumulating glycogen, while progesterone would be responsible for regulating breakdown of epithelial cells and catabolism of glycogen (Bowman and Rose, 2017). Such a sharp reduction in the amount of cultivable LAB observed shortly after EB exposure may be a consequence of increased adherence potential of bacteria to vaginal epithelial cells. *Lactobacillus* have been reported to competitively bind and inhibit binding of pathogens to the urogenital tract (Zarate and Nader-Macias, 2006), and binding to uroepithelial cells and competitive inhibition of healthy microbiota seems to be influenced by the menstrual cycle (Chan et al., 1984). An acute EB induction of LAB binding capacity to vaginal epithelial cells and/or vaginal epithelial cells receptivity towards LAB may impair the ability of recovering bacteria by swab sampling, partially explaining our results.

Estrogens have been described to regulate the oxidant/antioxidant equilibrium either by upregulation of the antioxidant defence mechanisms of the cell, or by inhibiting

the production of oxidative molecules. The antioxidant effect of estrogens was reported in cell types such as brain cells, where E2 induced glutathione levels (Schmidt et al., 2002) as well as in other cell types where it reduced lipid peroxidation (Lacort et al., 1995) and hepatocyte damage (Leal et al., 1998; Joswig et al., 1999). Our observations identified a reduced antioxidant potential at both acute and late response to EB exposure, with no observable effect of EB on ROS production. The observed decrease in cultivable LAB at 12 hours post EB might suggest a concomitant and indirect reduction effect on ROS due to the expected reduction in LAB-derived H₂O₂ production, which it was not observed. Furthermore, the stability of ROS levels does not support the usual homeostasis mechanism observed when studying oxidant and antioxidant potential in biological systems, where a compensatory response hypothesis is commonly proposed. It is likely that a direct effect of EB on LAB population would take longer than a few days to be established, therefore, responses to EB taking place through changes in LAB might not be observed in the time frame proposed by our study. In this regard, one may speculate a direct effect of EB on epithelial cells, regulating oxidant/antioxidant molecules, for instance. Numerous studies have observed a positive relationship between EB (absence/presence or concentration) and both ROS production and mRNA expression, and activity in some cell types, of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase (Strehlow et al., 2003; Felty et al., 2005; Bellanti et al., 2013; Maleki et al., 2015; Panza et al., 2017). In comparison to our study, several of the published studies have assessed the relationship between EB and oxidant/antioxidant cellular response using an *in vitro* model, distinct time points, estrogen ester and concentrations, sampling method and biological matrix investigated. Such experimental discrepancies may certainly explain the apparently unsupported results.

5. Conclusions

Considering our results, it is fair to state that our *in vivo* model is appropriate for studying vaginal microbiota and oxidant/antioxidant environment. Additionally, our model could detect acute effects of EB on the assessed variables. Most importantly, we conclude that estrogen acutely regulates the vaginal environment by altering the population of vaginal LAB and the balance between oxidant and antioxidant activity. Such relevant information regarding the regulation of the vaginal environment by estrogen may impact prophylaxis and therapeutics for maintenance of the reproductive tract health status and has the potential to lead further investigation towards fertility-

related issues. Lastly, particularities of the validated *in vivo* model warrant further investigation to address recent questions that raised from the data generated. For example, investigation of endometrial gene expression of oxidant/antioxidant-related molecules, characterization of the specific pathways involved in the reduced antioxidant potential, isolation and characterization of LAB species, EB dose-response and comparison to a cycling ewe model, effect of the progesterone priming of the reproductive tract are just a few of the questions that remain to be answered.

Conflict of interest: No conflicts of interest influenced this research.

Funding: This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

- Aldunate, M., Srbinovski, D., Hearps, A.C., Latham, C.F., Ramsland, P.A., Gugasyan, R., Cone, R.A., Tachedjian, G., 2015. Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Front Physiol* 6, 164.
- Amabebe, E., Anumba, D.O.C., 2018. The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of Lactobacilli. *Front Med (Lausanne)* 5.
- Anukam, K.C., Osazuwa, E., Osemene, G.I., Ehigiagbe, F., Bruce, A.W., Reid, G., 2006. Clinical study comparing probiotic *Lactobacillus* GR-1 and RC-14 with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis. *Microbes Infect* 8, 2772-2776.
- Bellanti, F., Matteo, M., Rollo, T., De Rosario, F., Greco, P., Vendemiale, G., Serviddio, G., 2013. Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: impact of estrogen therapy. *Redox Biol* 1, 340-346.
- Benzie, I.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239, 70-76.
- Bosma, E.F., Forster, J., Nielsen, A.T., 2017. Lactobacilli and pediococci as versatile cell factories - Evaluation of strain properties and genetic tools. *Biotechnol Adv* 35, 419-442.
- Bowman, K., Rose, J., 2017. Estradiol stimulates glycogen synthesis whereas progesterone promotes glycogen catabolism in the uterus of the American mink (*Neovison vison*). *Anim Sci J* 88, 45-54.
- Brown, J.M., Hazen, S.L., 2017. Targeting of microbe-derived metabolites to improve human health: The next frontier for drug discovery. *J Biol Chem* 292, 8560-8568.

Chan, R.C., Bruce, A.W., Reid, G., 1984. Adherence of cervical, vaginal and distal urethral normal microbial flora to human uroepithelial cells and the inhibition of adherence of gram-negative uropathogens by competitive exclusion. *J Urol* 131, 596-601.

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

Doerflinger, S.Y., Throop, A.L., Herbst-Kralovetz, M.M., 2014. Bacteria in the vaginal microbiome alter the innate immune response and barrier properties of the human vaginal epithelia in a species-specific manner. *J Infect Dis* 209, 1989-1999.

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

Felty, Q., Xiong, W.C., Sun, D., Sarkar, S., Singh, K.P., Parkash, J., Roy, D., 2005. Estrogen-induced mitochondrial reactive oxygen species as signal-transducing messengers. *Biochemistry* 44, 6900-6909.

Fox, C., Eichelberger, K., 2015. Maternal microbiome and pregnancy outcomes. *Fertil Steril* 104, 1358-1363.

Franasiak, J.M., Scott, R.T., Jr., 2015. Reproductive tract microbiome in assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 104, 1364-1371.

Gupta, S., Kumar, N., Singhal, N., Kaur, R., Manektala, U., 2006. Vaginal microflora in postmenopausal women on hormone replacement therapy. *Indian J Pathol Microbiol* 49, 457-461.

Hou, Q., Ye, L., Huang, L., Yu, Q., 2017. The Research Progress on Intestinal Stem Cells and Its Relationship with Intestinal Microbiota. *Front Immunol* 8, 599.

Joswig, M., Hach-Wunderle, V., Ziegler, R., Nawroth, P.P., 1999. Postmenopausal hormone replacement therapy and the vascular wall: mechanisms of 17 beta-estradiol's effects on vascular biology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107, 477-487.

Lacort, M., Leal, A.M., Liza, M., Martin, C., Martinez, R., Ruiz-Larrea, M.B., 1995. Protective effect of estrogens and catecholestrogens against peroxidative membrane damage in vitro. *Lipids* 30, 141-146.

Leal, A.M., Begona Ruiz-Larrea, M., Martinez, R., Lacort, M., 1998. Cytoprotective actions of estrogens against tert-butyl hydroperoxide-induced toxicity in hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 56, 1463-1469.

Leung, D.H., Yimlamai, D., 2017. The intestinal microbiome and paediatric liver disease. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2, 446-455.

Loetchutinat, C., Kothan, S., Dechsupa, S., Meesungnoen, J.i., Jay-Gerin, J.-P., Mankhetkorn, S., 2005. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of

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

Maleki, J., Nourbakhsh, M., Shabani, M., Korani, M., Nourazarian, S.M., Ostadali Dahaghi, M.R., Moghadasi, M.H., 2015. 17 β -Estradiol Stimulates Generation of Reactive Species Oxygen and Nitric Oxide in Ovarian Adenocarcinoma Cells (OVCAR 3). *Iran J Cancer Prev* 8.

Moore, D.E., Soules, M.R., Klein, N.A., Fujimoto, V.Y., Agnew, K.J., Eschenbach, D.A., 2000. Bacteria in the transfer catheter tip influence the live-birth rate after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 74, 1118-1124.

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

Panza, S., Santoro, M., De Amicis, F., Morelli, C., Passarelli, V., D'Aquila, P., Giordano, F., Cione, E., Passarino, G., Bellizzi, D., Aquila, S., 2017. Estradiol via estrogen receptor beta influences ROS levels through the transcriptional regulation of SIRT3 in human seminoma TCam-2 cells. *Tumour Biol* 39, 1010428317701642.

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

Porto, M.C., Kuniyoshi, T.M., Azevedo, P.O., Vitolo, M., Oliveira, R.P., 2017. *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnol Adv* 35, 361-374.

Recine, N., Palma, E., Domenici, L., Giorgini, M., Imperiale, L., Sassu, C., Musella, A., Marchetti, C., Muzii, L., Benedetti Panici, P., 2016. Restoring vaginal microbiota: biological control of bacterial vaginosis. A prospective case-control study using *Lactobacillus rhamnosus* BMX 54 as adjuvant treatment against bacterial vaginosis. *Arch Gynecol Obstet* 293, 101-107.

Reid, G., 2017. The development of probiotics for women's health. *Can J Microbiol* 63, 269-277.

Reid, J.N., Bisanz, J.E., Monachese, M., Burton, J.P., Reid, G., 2013. The rationale for probiotics improving reproductive health and pregnancy outcome. *Am J Reprod Immunol* 69, 558-566.

Schmidt, A.J., Krieg, J., Vedder, H., 2002. Differential effects of glucocorticoids and gonadal steroids on glutathione levels in neuronal and glial cell systems. *J Neurosci Res* 67, 544-550.

Sirota, I., Zarek, S.M., Segars, J.H., 2014. Potential influence of the microbiome on infertility and assisted reproductive technology. *Semin Reprod Med* 32, 35-42.

Strehlow, K., Rotter, S., Wassmann, S., Adam, O., Grohe, C., Laufs, K., Bohm, M., Nickenig, G., 2003. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res* 93, 170-177.

Wypych, T.P., Marsland, B.J., 2017. Diet Hypotheses in Light of the Microbiota Revolution: New Perspectives. *Nutrients* 9.

Zarate, G., Nader-Macias, M.E., 2006. Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Lett Appl Microbiol* 43, 174-180.

5. CONCLUSÕES

- ✦ Geração de um modelo *in vivo* apropriado para estudo de microbiota vaginal e potencial oxidante/antioxidante pois foi capaz de detectar os efeitos agudos da exposição ao BE nas variáveis testadas;
- ✦ Estrógeno regula de forma aguda o ambiente vaginal pela alteração na população de BAL vaginais e o balanço entre atividade oxidante/antioxidante;

6. PERSPECTIVAS

A partir dos resultados obtidos, as perspectivas para futuros trabalhos são:

- ✦ Informações relacionando a regulação do ambiente vaginal pelo estrógeno pode afetar profilaxia e terapias para manutenção da saúde do trato reprodutivo e tem potencial para estimular investigação de problemas relacionados a fertilidade.
- ✦ Este modelo *in vivo* ainda necessita de futuras investigações, como:
 - ✓ Investigação de expressão gênica endometrial de moléculas reacionados ao ambiente oxidativo/antioxidativo
 - ✓ Caracterização de vias de sinalização desse ambiente
 - ✓ Isolamento de espécies de BAL
 - ✓ Análise de dose-resposta ao BE
 - ✓ Comparação com animais cíclicos (ovinos)
 - ✓ Efeitos de pré-exposição à progesterona

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aitken, R.J., Roman, S.D., 2008. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. *Oxid Med Cell Longev*, pp. 15-24.
- Aldunate, M., Srbinovski, D., Hearps, A.C., Latham, C.F., Ramsland, P.A., Gugasyan, R., Cone, R.A., Tachedjian, G., 2015. Antimicrobial and immune modulatory effects of lactic acid and short chain fatty acids produced by vaginal microbiota associated with eubiosis and bacterial vaginosis. *Front Physiol* 6, 164.
- Amabebe, E., Anumba, D.O.C., 2018. The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of Lactobacilli. *Front Med (Lausanne)* 5.
- Anukam, K.C., Osazuwa, E., Osemene, G.I., Ehigiagbe, F., Bruce, A.W., Reid, G., 2006. Clinical study comparing probiotic *Lactobacillus* GR-1 and RC-14 with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis. *Microbes Infect* 8, 2772-2776.
- Araujo, A.S.d.R., 2002. Influencia do hipotireoidismo no dano oxidativo e nas defesas antioxidantes. Instituto de Ciências Básicas da Saúde - Departamento de Fisiologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Baird, D.T., Campbell, B.K., Mann, G.E., McNeilly, A.S., 1991. Inhibin and oestradiol in the control of FSH secretion in the sheep. *J Reprod Fertil Suppl* 43, 125-138.
- BARBOSA, K.B.F., 2010. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista Nutrição Brasil* 23, 629-643.
- Barrett, D.M., Bartlewski, P.M., Duggavathi, R., Davies, K.L., Huchkowsky, S.L., Epp, T., Rawlings, N.C., 2008. Synchronization of follicular wave emergence in the seasonally anestrous ewe: the effects of estradiol with or without medroxyprogesterone acetate. *Theriogenology* 69, 827-836.
- Barrett, D.M., Duggavathi, R., Davies, K.L., Bartlewski, P.M., Bagu, E.T., Rawlings, N.C., 2007. Differential effects of various estradiol-17beta treatments on follicle-stimulating hormone peaks, luteinizing hormone pulses, basal gonadotropin concentrations, and antral follicle and luteal development in cyclic ewes. *Biol Reprod* 77, 252-262.
- Bartlewski, P.M., Baby, T.E., Giffin, J.L., 2011. Reproductive cycles in sheep. *Anim Reprod Sci* 124, 259-268.
- Bartlewski, P.M., Beard, A.P., Cook, S.J., Rawlings, N.C., 1998. Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. *J Reprod Fertil* 113, 275-285.

Bellanti, F., Matteo, M., Rollo, T., De Rosario, F., Greco, P., Vendemiale, G., Serviddio, G., 2013. Sex hormones modulate circulating antioxidant enzymes: impact of estrogen therapy. *Redox Biol* 1, 340-346.

Benzie, I.F., Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem* 239, 70-76.

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

Bowman, K., Rose, J., 2017. Estradiol stimulates glycogen synthesis whereas progesterone promotes glycogen catabolism in the uterus of the American mink (*Neovison vison*). *Anim Sci J* 88, 45-54.

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

Chan, R.C., Bruce, A.W., Reid, G., 1984. Adherence of cervical, vaginal and distal urethral normal microbial flora to human uroepithelial cells and the inhibition of adherence of gram-negative uropathogens by competitive exclusion. *J Urol* 131, 596-601.

COTINGUIBA, G.C.e.a., 2013. Método de Avaliação da Defesa Antioxidante: Uma Revisão de Literatura. *Ciências Biológicas e Saúde* 15, 231-237.

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

Dias, L.M., de Barros, M.B., Viau, P., Sales, J.N., Valentim, R., dos Santos, F.F., da Cunha, M.C., Jr., Marino, C.T., de Oliveira, C.A., 2015. Effect of a new device for sustained progesterone release on the progesterone concentration, ovarian follicular diameter, time of ovulation and pregnancy rate of ewes. *Anim Reprod Sci* 155, 56-63.

Doerflinger, S.Y., Throop, A.L., Herbst-Kralovetz, M.M., 2014. Bacteria in the vaginal microbiome alter the innate immune response and barrier properties of the human vaginal epithelia in a species-specific manner. *J Infect Dis* 209, 1989-1999.

Espinoza, S.E., Guo, H., Fedarko, N., DeZern, A., Fried, L.P., Xue, Q.L., Leng, S., Beamer, B., Walston, J.D., 2008. Glutathione peroxidase enzyme activity in aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 63, 505-509.

Evans, A.C., Duffy, P., Hynes, N., Boland, M.P., 2000. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. *Theriogenology* 53, 699-715.

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

Felty, Q., Xiong, W.C., Sun, D., Sarkar, S., Singh, K.P., Parkash, J., Roy, D., 2005. Estrogen-induced mitochondrial reactive oxygen species as signal-transducing messengers. *Biochemistry* 44, 6900-6909.

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

Fox, C., Eichelberger, K., 2015. Maternal microbiome and pregnancy outcomes. *Fertil Steril* 104, 1358-1363.

Franasiak, J.M., Scott, R.T., Jr., 2015. Reproductive tract microbiome in assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 104, 1364-1371.

Fukai, T., Ushio-Fukai, M., 2011. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid Redox Signal* 15, 1583-1606.

Gupta, S., Kumar, N., Singhal, N., Kaur, R., Manektala, U., 2006. Vaginal microflora in postmenopausal women on hormone replacement therapy. *Indian J Pathol Microbiol* 49, 457-461.

Hashim, N.H., Syafnir, Sembiring, M., 2013. Time of PMSG administration: Effect on progesterone and estradiol concentration in synchronized ewes. *Biomedical Research* 24.

Higuchi, M., 2014. Chapter 15 – Antioxidant Properties of Wheat Bran against Oxidative Stress. In: Press, A. (Ed.), *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*, pp. 181–199.

Hou, Q., Ye, L., Huang, L., Yu, Q., 2017. The Research Progress on Intestinal Stem Cells and Its Relationship with Intestinal Microbiota. *Front Immunol* 8, 599.

Johnson, Q.R., Mostofian, B., Fuente Gomez, G., Smith, J.C., Cheng, X., 2018. Effects of carotenoids on lipid bilayers. *Phys Chem Chem Phys* 20, 3795-3804.

Joswig, M., Hach-Wunderle, V., Ziegler, R., Nawroth, P.P., 1999. Postmenopausal hormone replacement therapy and the vascular wall: mechanisms of 17 beta-estradiol's effects on vascular biology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 107, 477-487.

Kirkman, H.N., Gaetani, G.F., 1984. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 4343-4347.

Lacort, M., Leal, A.M., Liza, M., Martin, C., Martinez, R., Ruiz-Larrea, M.B., 1995. Protective effect of estrogens and catecholestrogens against peroxidative membrane damage in vitro. *Lipids* 30, 141-146.

Leal, A.M., Begona Ruiz-Larrea, M., Martinez, R., Lacort, M., 1998. Cytoprotective actions of estrogens against tert-butyl hydroperoxide-induced toxicity in hepatocytes. *Biochem Pharmacol* 56, 1463-1469.

Leung, D.H., Yimlamai, D., 2017. The intestinal microbiome and paediatric liver disease. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2, 446-455.

Li, Y., Schellhorn, H.E., 2007. Rapid Kinetic Microassay for Catalase Activity. *J Biomol Tech* 18, 185-187.

Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev* 4, 118-126.

Loetchutinat, C., Kothan, S., Dechsupa, S., Meesungnoen, J.i., Jay-Gerin, J.-P., Mankhetkorn, S., 2005. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiation Physics and Chemistry* 72, 323-331.

Lunstra, D.D., Christenson, R.K., 1981. Synchronization of ewes during anestrus: influence of time of year and interval to onset of estrus on conception rate. *J Anim Sci* 53, 448-457.

Lykkesfeldt, J., Michels, A.J., Frei, B., 2014. Vitamin C1. *Adv Nutr*, pp. 16-18.

Maleki, J., Nourbakhsh, M., Shabani, M., Korani, M., Nourazarian, S.M., Ostadali Dahaghi, M.R., Moghadasi, M.H., 2015. 17 β -Estradiol Stimulates Generation of Reactive Species Oxygen and Nitric Oxide in Ovarian Adenocarcinoma Cells (OVCAR 3). *Iran J Cancer Prev* 8.

Moore, D.E., Soules, M.R., Klein, N.A., Fujimoto, V.Y., Agnew, K.J., Eschenbach, D.A., 2000. Bacteria in the transfer catheter tip influence the live-birth rate after in vitro fertilization. *Fertil Steril* 74, 1118-1124.

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

Niki, E., Traber, M.G., 2012. A history of vitamin E. *Ann Nutr Metab* 61, 207-212.

Panza, S., Santoro, M., De Amicis, F., Morelli, C., Passarelli, V., D'Aquila, P., Giordano, F., Cione, E., Passarino, G., Bellizzi, D., Aquila, S., 2017. Estradiol via estrogen receptor beta influences ROS levels through the transcriptional regulation of SIRT3 in human seminoma TCam-2 cells. *Tumour Biol* 39, 1010428317701642.

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

- Porto, M.C., Kuniyoshi, T.M., Azevedo, P.O., Vitolo, M., Oliveira, R.P., 2017. *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnol Adv* 35, 361-374.
- Raineri, C., Nunes, B.C., Gameiro, A.H., 2015. Technological characterization of sheep production systems in Brazil. *Anim Sci J* 86, 476-485.
- Ratto, M.H., Singh, J., Huanca, W., Adams, G.P., 2003. Ovarian follicular wave synchronization and pregnancy rate after fixed-time natural mating in llamas. *Theriogenology* 60, 1645-1656.
- Recine, N., Palma, E., Domenici, L., Giorgini, M., Imperiale, L., Sassu, C., Musella, A., Marchetti, C., Muzii, L., Benedetti Panici, P., 2016. Restoring vaginal microbiota: biological control of bacterial vaginosis. A prospective case-control study using *Lactobacillus rhamnosus* BMX 54 as adjuvant treatment against bacterial vaginosis. *Arch Gynecol Obstet* 293, 101-107.
- Reid, G., 2017. The development of probiotics for women's health. *Can J Microbiol* 63, 269-277.
- Reid, J.N., Bisanz, J.E., Monachese, M., Burton, J.P., Reid, G., 2013. The rationale for probiotics improving reproductive health and pregnancy outcome. *Am J Reprod Immunol* 69, 558-566.
- Scaramuzzi, R.J., Adams, N.R., Baird, D.T., Campbell, B.K., Downing, J.A., Findlay, J.K., Henderson, K.M., Martin, G.B., McNatty, K.P., McNeilly, A.S., et al., 1993. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod Fertil Dev* 5, 459-478.
- Schmidt, A.J., Krieg, J., Vedder, H., 2002. Differential effects of glucocorticoids and gonadal steroids on glutathione levels in neuronal and glial cell systems. *J Neurosci Res* 67, 544-550.
- Senger, P.L., 2003. Pathways to pregnancy and parturition. *Current Conceptions*, Pullman, WA.
- Silva, A.P.S.P., Santos, D.V., Jr, I.K., Machado, G., Hein, H.E., Vidor, A.C.M., Corbellini, L.G., 2013. Sheep industry in the State of Rio Grande do Sul, Brazil: description of the production system and the main health and reproductive aspects. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33, 6.
- Sirota, I., Zarek, S.M., Segars, J.H., 2014. Potential influence of the microbiome on infertility and assisted reproductive technology. *Semin Reprod Med* 32, 35-42.

Strehlow, K., Rotter, S., Wassmann, S., Adam, O., Grohe, C., Laufs, K., Bohm, M., Nickenig, G., 2003. Modulation of antioxidant enzyme expression and function by estrogen. *Circ Res* 93, 170-177.

Vasconcelos, S.M.L., Goulart, M.O.F., Moura, J.B.d.F., Manfredini, V., Benfato, M.d.S., Kubota, L.T., 2007. Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: main analytical methods for their determination. *Química Nova* 30.

Wagenmaker, E.R., Breen, K.M., Oakley, A.E., Tilbrook, A.J., Karsch, F.J., 2010. The Estrous Cycle of the Ewe Is Resistant to Disruption by Repeated, Acute Psychosocial Stress1. *Biol Reprod* 82, 1206-1215.

Wypych, T.P., Marsland, B.J., 2017. Diet Hypotheses in Light of the Microbiota Revolution: New Perspectives. *Nutrients* 9.

Zarate, G., Nader-Macias, M.E., 2006. Influence of probiotic vaginal lactobacilli on in vitro adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells. *Lett Appl Microbiol* 43, 174-180.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Censo. Agropecuário 2017. IBGE, 2017. Disponível em: https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html?localidade=0&tema=75674

APÊNDICE

A. Apêndice I: Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em meio ágar sangue (bactérias gerais) e meio MRS (*Lactobacillus spp.*). Análise qualitativa em duplicatas comparando amostras do dia D-2.5 (60h antes da injeção de 1mg de benzoato de estradiol – BE; D0), D0.5 (12h após injeção de BE) e D2.5 (60h pós-injeção de BE).

COLETA	ANIMAL	UFC			
		Ágar Sangue		MRS	
		10	10	10	10
D-2.5	508 vermelho	incontáveis	incontáveis	incontáveis	incontáveis
	506 vermelho	incontáveis	incontáveis	incontáveis	incontáveis
	14 vermelho	incontáveis	incontáveis	incontáveis	incontáveis
	120 verde	13	4	0	0

	16 vermelho	incontáveis	incontáveis	0	0
	508 vermelho	25	29	87	91
	506 vermelho	64	86	72	76
D0.5	14 vermelho	30	11	0 (mancha)	21
	120 verde	1	1	0	0
	16 vermelho	incontáveis	incontáveis	incontáveis	incontáveis
	508 vermelho	incontáveis	incontáveis	62	65
	506 vermelho	incontáveis	incontáveis	incontáveis	incontáveis
D2.5	14 vermelho	incontáveis	incontáveis	18	16
	120 verde	incontáveis	incontáveis	0	0
	16 vermelho	incontáveis	incontáveis	incontáveis	incontáveis

B. Apêndice II: Identificação inicial de colônias por coloração de Gram em meio ágar. Análise qualitativa comparando amostras do dia D-2.5 (60h antes da injeção de 1mg de benzoato de estradiol – BE; D0), D0.5 (12h após injeção de BE) e D2.5 (60h pós-injeção de BE). CAT: atividade catalase (ausente/presente), OXID: atividade oxidase (ausente/presente), ID: identificação estrutural.

COLETA	ANIMAL	GRAM				
		Ágar Sangue				
		Descrição	CAT	OXID	ID	Gram
D-2.5	16 vermelho	Nuvem cinza	+	-	Bacilo	-
		Colônia cinza	+	-	Bacilo	-
	508 vermelho	Colônia amarela	+	-	Cocos	+
		Colônia branca	+	-	Cocos	+
	14 vermelho	Colônia branca	+	-	Cocobacilo	+
		Colônia amarela	+	-	Bacilo	+
		Colônia creme	+	-	Cocos	+
	120 verde	Colônia branca	-	-	Cocos	+
		Colônia amarela	+	-	Bacilo	ambos
	506 vermelho	Colônia branca	+	-	Cocobacilo	+
		Colônia amarela	+	-	Cocobacilo	+
		Colônia creme	+	-	Cocos	+

D0.5	506 vermelho	Colônia amarela pequena	+	-	Bacilo	-
		Colônia branca grande	+	-	Cocos	+
	120 verde	Colônia amarela pequena	+	-	Cocos	+
		Colônia branca grande	-	-	Cocos	+
	16 vermelho	Nuvem cinza	+	-	Bacilo	-
	14 vermelho	Colônia amarela pequena	+	-	Bacilo	-
		Colônia branca grande	+	-	Cocos	+
		Colônia branca grande turva	+	+	Bacilo	-
	508 vermelho	Colônia amarela pequena	+	-	Cocos	+
		Colônia branca grande	+	-	Cocos	+
		Colônia branca grande turva	+	-	Bacilo	-
	16 vermelho	Nuvem cinza	+	-	Bacilo	-
	14 vermelho	Nuvem cinza/prata	+	-	Bacilo	-
	120 verde	Nuvem cinza	-	-	Cocos	+
	D2.5	508 vermelho	Nuvem amarela	+	-	Cocos
Colônia amarela pequena			+	-	Bacilo	-
506 vermelho		Colônia branca grande	+	-	Bacilo	-
		Mancha amarela	+	-	Streptobacilo	+

C: Apêndice III: Identificação inicial de colônias por coloração de Gram em meio MRS. Análise qualitativa comparando amostras do dia D-2.5 (60h antes da injeção de 1mg de benzoato de estradiol – BE; D0), D0.5 (12h após injeção de BE) e D2.5 (60h pós-injeção de BE). CAT: atividade catalase (ausente/presente), OXID: atividade oxidase (ausente/presente), ID: identificação estrutural.

COLETA	ANIMAL	GRAM				
		MRS				
		Descrição	CAT	OXID	ID	Gram
D-2.5	506 vermelho	Controle 1	-	-	Cocos	+
		Controle 2	-	-	Cocos	+
	508 vermelho	Controle 1	-	-	Cocos	+
		Controle 2	-	-	Cocos	+

	14 vermelho	Controle 1	-	-	Cocos	+
		Controle 2	-	-	Cocos	+
	16 vermelho	Colônia branca	-	-	Estreptococos	-
	506 vermelho	Colônia branca	-	-	Cocos	+
D0.5	508 vermelho	Colônia branca	-	-	Cocos	-
	14 vermelho	Colônia branca	-	-	Cocos	-
		Nuvem/Mancha	-	-	Estreptobacilos	+
	14 vermelho	Colônia branca	-	-	Cocos	+
	16 vermelho	Colônia branca pequena	-	-	Estreptococos	+
D2.5		Colônia branca mais claras	-	-	Estreptococos	+
	508 vermelho	Colônia branca	-	-	Estreptococos	+
		Colônia branca grande	-	-	Bacilo	-
	506 vermelho	Colônia branca pequena	-	-	Bacilo	-