

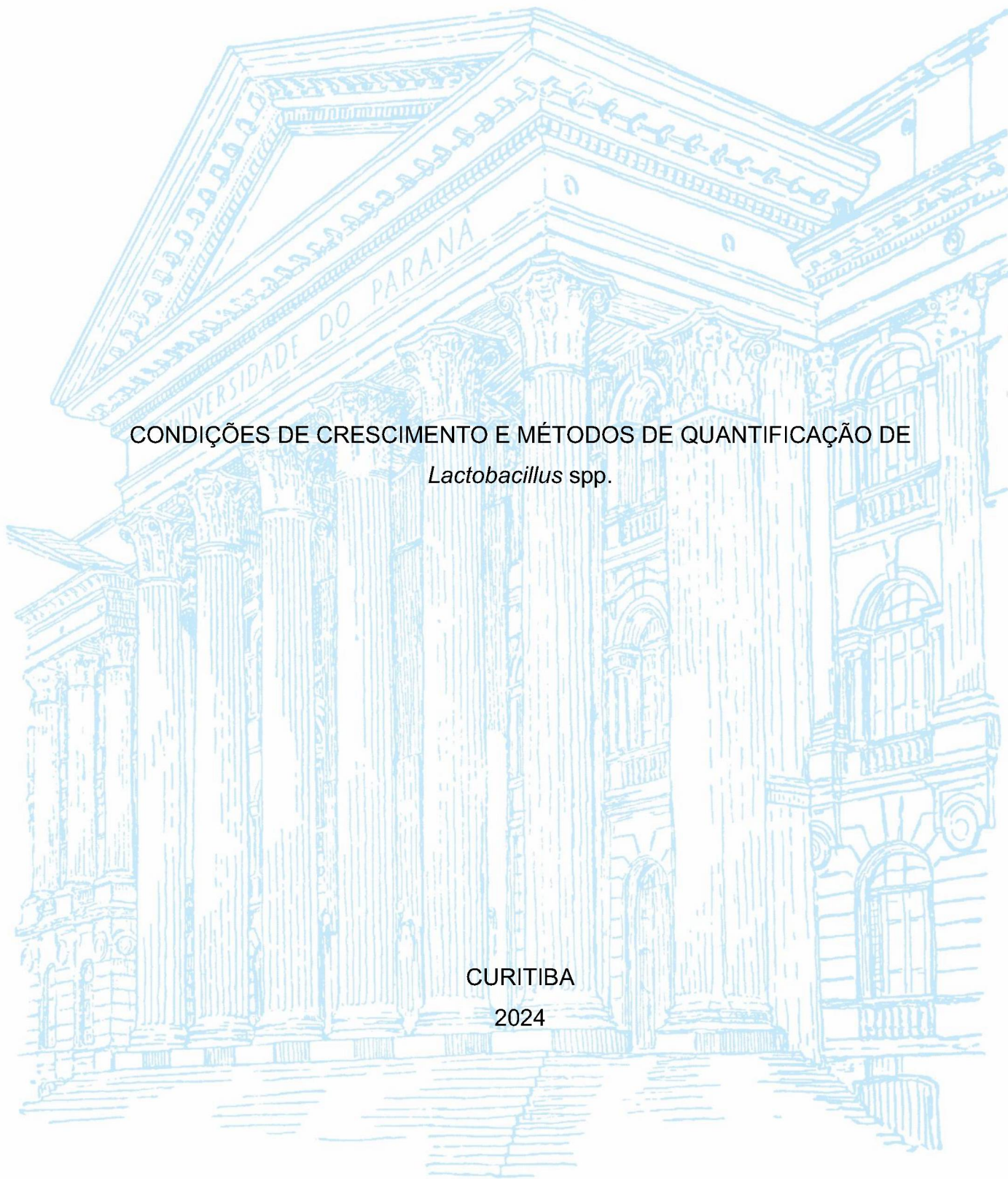
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VIVIAN HEIMBECKER

CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE  
*Lactobacillus* spp.

CURITIBA

2024



VIVIAN HEIMBECKER

CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE  
*Lactobacillus* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia e Saúde da Mulher, Setor de Ciências da Saúde, Departamento de Tocoginecologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Tocoginecologia e Saúde da Mulher.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Camila Marcon

CURITIBA

2024

H467 Heimbecker, Vivian

Condições de crescimento e métodos de quantificação de lactobacillus spp. [recurso eletrônico] / Vivian Heimbecker.  
– Curitiba, 2024.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia e Saúde da Mulher. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.  
Orientadora: Profa. Dra. Camila Marcon

1. Microbiota. 2. Disbiose. 3. Lactobacillus. I. Marcon, Camila. II. Programa de Pós-Graduação em Tocoginecologia e Saúde da Mulher. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. III. Título.



## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação TOCGINECOLOGIA E SAÚDE DA MULHER da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **VIVIAN HEIMBECKER** intitulada: **Condições de crescimento e métodos de quantificação de Lactobacillus spp.**, sob orientação da Profa. Dra. CAMILA MARCON, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 20 de Setembro de 2024.

Assinatura Eletrônica

23/09/2024 14:05:28.0

CAMILA MARCON

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

23/09/2024 16:14:10.0

LAURA LUCIA COGO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

25/09/2024 08:22:29.0

MARIANA DE CASTRO SILVA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SÃO PAULO)

Assinatura Eletrônica

25/09/2024 14:10:21.0

MERI BORDIGNON NOGUEIRA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida que permitiu dois anos de formação acadêmica de qualidade.

À minha orientadora, Camila Marcon, pela paciência, disponibilidade, amizade e por cada ensinamento nas áreas acadêmica, profissional e pessoal. Muito obrigada por guiar minha trajetória acadêmica desde projetos de iniciação científica e extensão universitária até o mestrado. Cada aprendizado nestes 5 anos foi valioso.

À minha colega de mestrado e amiga Bárbara, pelos poucos momentos de tristeza e muitos de felicidade compartilhados ao longo desta jornada. A sua amizade foi um dos maiores presentes do mestrado.

Aos familiares queridos, especialmente ao meu pai Aroldo, em quem tenho meu melhor amigo, minha mãe Eliziani, por seu amor incondicional e meu irmão Alex, por acreditar em meu potencial. Tê-los em minha vida é graça imerecida.

A Deus, por fazer infinitamente mais do que peço ou penso.

“Portanto, como povo escolhido de Deus, santo e amado, revistam-se de profunda compaixão, bondade, humildade, mansidão e paciência. Acima de tudo, porém, revistam-se do amor, que é o elo perfeito.”

Colossenses 3:12, 14

## RESUMO

A microbiota vaginal saudável é caracterizada pelo predomínio de *Lactobacillus* spp., e a sua depleção está associada à maior susceptibilidade a infecções e colonização por bactérias patogênicas. Dentre os *Lactobacillus* que predominam o ambiente vaginal, *Lactobacillus crispatus* e *Lactobacillus gasseri* têm papel protetor amplamente comprovado para esse ambiente. *Lactobacillus* spp. mantêm um pH vaginal entre 3,5 e 4,5 pela fermentação da glicose a ácido lático, protegendo a vagina da colonização por patógenos. A principal disbiose vaginal é a vaginose bacteriana, que acomete cerca de um terço da população em idade reprodutiva. O tratamento convencional da vaginose bacteriana está relacionado a altas taxas de recorrência do quadro. Desta forma, o desenvolvimento de terapias alternativas aos antimicrobianos, como os prebióticos, tem sido explorado. A padronização dos métodos de cultura para *Lactobacillus* spp. é de grande importância para a testagem de candidatos prebióticos e reprodutibilidade dos ensaios inter-centro. Portanto, este estudo objetivou comparar os métodos de cultura e quantificação de *L. crispatus* e *L. gasseri*. Cepas de referência de *L. crispatus* (ATCC 33820) e *L. gasseri* (ATCC 33323) foram cultivadas em meios de cultura MRS e LAPTg. Após cultura em LAPTg, as cepas foram novamente cultivadas em LAPTg e em LAPT (depletado de glicose) e obtidas suas curvas de crescimento nos momentos 0 h, 8 h, 12 h e 24 h. As medidas para obtenção destas curvas foram: Unidades Formadoras de Colônia (UFC), densidades ópticas a 540 nm ( $OD_{540}$ ) e do pH do meio. Finalmente, foram testados meios LAPTg com pH a 6,5 e uma versão ácida a 5,5 para o plaqueamento das culturas com a finalidade de verificar se há efeito do pH do meio na contagem de UFC. A comparação do número de UFC entre MRS e LAPTg foi realizada utilizando o teste-t, enquanto as comparações das curvas de crescimento bacteriano nas diferentes condições utilizaram análise de variância (ANOVA) em nível de significância de 5%. Os resultados deste estudo demonstraram que as curvas de crescimento para as cepas foram obtidas com sucesso utilizando as medidas de  $OD_{540}$  e de pH. Entretanto o número de UFC/mL não diferiu entre os meios LAPT e LAPTg para *L. crispatus* ( $p=0,55$ ), enquanto para *L. gasseri* foi observado menor número de UFC/mL em LAPTg em comparação ao meio sem glicose (LAPT) ( $p=0,30$ ). Com o não-sucesso da contagem de UFC/mL para quantificação de *Lactobacillus* com o método utilizado, foi realizada nova contagem de UFC utilizando o meio de cultura LAPTg acidificado. Os resultados mostraram que a contagem de UFC em meio LAPTg e LAPTg acidificado não diferiu estatisticamente para *L. crispatus* ( $p=0,385$ ) e *L. gasseri* ( $p=0,607$ ). Com base nos resultados, foi possível concluir que a contagem de UFC não se adequa como método de quantificação para *Lactobacillus* de importância vaginal utilizando os meios de cultura e condições do estudo, devendo ser substituída pelas medidas de  $OD_{540}$  ou pH. Ainda, deve-se considerar que métodos moleculares têm sido amplamente utilizados para a quantificação bacteriana e poderão ser empregados na testagem de candidatos a prebióticos, a depender de futuras padronizações.

Palavras-chave: microbiota vaginal; disbiose; *Lactobacillus* spp.



## ABSTRACT

The healthy vaginal microbiota is characterized by the dominance of *Lactobacillus* spp. The depletion of this microbial community is associated with an increased susceptibility to infections and the colonization of the vaginal environment by pathogenic bacteria. Among the *Lactobacillus* species that are predominant in the vaginal environment, *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus gasseri* have been demonstrated to play a crucial role in maintaining a healthy vaginal ecosystem. *Lactobacillus* spp. maintain a vaginal pH between 3.5 and 4.5 by fermenting glucose to lactic acid, thereby preventing the colonization of the vaginal environment by pathogens. The most prevalent vaginal dysbiosis is bacterial vaginosis, which affects approximately one-third of the population of reproductive age. The conventional treatment for bacterial vaginosis has high recurrence rates. Considering this, the development of alternative therapies to antimicrobials, such as prebiotics, has been a subject of investigation. The standardization of culture methods for *Lactobacillus* is of great importance for the testing of prebiotic candidates and the reproducibility of intercenter trials. Accordingly, the objective of this study was to compare culture methods and quantification techniques employed to *L. crispatus* and *L. gasseri* isolation. The standard strains of *L. crispatus* (ATCC 33820) and *L. gasseri* (ATCC 33323) were cultivated in MRS and LAPTg culture media. Following the successful cultivation of the strains in LAPTg, the strains were again grown in LAPTg and in LAPT (depleted of glucose), and their growth curves were obtained at 0 h, 8 h, 12 h, and 24 h. The measurements used to obtain the growth curve were as follows: Colony-Forming Units (CFU), optical densities at 540 nm ( $OD_{540}$ ), and the pH of the medium. Finally, the effects of pH on the CFU count were investigated by plating the cultures in LAPTg media with a pH of 6.5 and an acidic version at 5.5. The comparison of the number of CFUs between MRS and LAPTg was conducted using the t-test, while the comparisons of the bacterial growth curves in the different conditions were analyzed using analysis of variance (ANOVA) at a 5% significance level. The results demonstrated that there was no statistically significant difference in CFU counts between LAPTg and acidified LAPTg media for *L. crispatus* ( $p=0.385$ ) and *L. gasseri* ( $p=0.607$ ). Considering these findings, it is possible to conclude that the CFU count is an inadequate method for quantifying the *Lactobacillus* species of vaginal importance when utilizing the culture media and conditions employed in this study. It is therefore recommended this method to be replaced by  $OD_{540}$  or pH measurements. Furthermore, it should be acknowledged that molecular methods have been extensively utilized for bacterial quantification and could be employed to assess prebiotic candidates, contingent on future standardization.

Keywords: vaginal microbiota; dysbiosis; *Lactobacillus* spp.



## LISTA DE SIGLAS

APF	<i>Aggregation Promoting Factor</i>
ATCC	<i>American Typing Culture Collection</i>
BVAB	<i>Bacterial Vaginosis Associated Bacteria</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CST	<i>Community State Type</i>
CVV	Candidíase vulvovaginal
DO	Densidade Óptica
EMP	Emden-Meyerhoff-Parnas
ESP	Substância polimérica extracelular
FOS	Frutooligossacarídeos
GOS	Galactooligossacarídeos
IST	Infecção sexualmente transmissível
LAB	<i>Lactic acid bacteria</i>
LTA	Ácido lipoteicoico
MIF	Fator de inibição de migração de macrófagos
MRS	Man-Rogosa-Sharpe
Mubs	Proteínas ligadoras de mucina
SLAP	Proteína associada à camada superficial
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$
TT	Tubo teste
UFC	Unidades formadoras de colônia
VA	Vaginite aeróbia
VB	Vaginose bacteriana
VBR	Vaginose bacteriana recorrente

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1	JUSTIFICATIVA .....	14
1.2	OBJETIVOS .....	15
1.2.1	Objetivo geral .....	15
1.2.2	Objetivos específicos .....	15
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
2.1	CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA VAGINAL .....	16
2.2	<i>LACTOBACILLUS SPP.</i> .....	18
2.3	PH E GLICOGÊNIO .....	20
2.4	METABOLISMO DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ÁCIDO LÁTICO .....	22
2.5	CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E MEIOS DE CULTURA PARA <i>LACTOBACILLUS SPP.</i> .....	23
2.6	VAGINOSE BACTERIANA, CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E VAGINITE AERÓBICA .....	24
2.7	DESAFIOS PARA O TRATAMENTO DAS INFECÇÕES VAGINAIS .....	27
2.8	PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS .....	27
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>30</b>
3.1	CEPAS DE REFERÊNCIA, MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO .....	30
3.2	AVALIAÇÃO DO MEIO LAPT <sub>G</sub> .....	30
3.3	ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE DIFERENTES MEDIDAS PARA O CRESCIMENTO DE <i>LACTOBACILLUS SPP.</i> .....	31
3.4	TESTE DA UTILIZAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA ACIDIFICADOS PARA PLAQUEAMENTO .....	32
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	32
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>34</b>
4.1	AVALIAÇÃO DO MEIO LAPT <sub>G</sub> .....	34

4.2	ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE DIFERENTES MEDIDAS PARA O CRESCIMENTO DE <i>LACTOBACILLUS</i> SPP. ....	34
4.3	TESTE DA UTILIZAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA ACIDIFICADOS PARA PLAQUEAMENTO.....	36
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	37
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	40
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	41

## 1 INTRODUÇÃO

A vagina é um ambiente microecológico dinâmico, onde o equilíbrio é mantido por uma microbiota dominada por espécies de lactobacilos (RAVEL; BROTMAN, 2016). Em mulheres em idade reprodutiva, a presença deste gênero é reconhecida como sendo essencial para um ambiente vaginal saudável (RAVEL; BROTMAN, 2016). Mais de 250 espécies bacterianas já foram identificadas como colonizadores vaginais (FREDRICKS; FIEDLER; MARRAZZO, 2005; CHEN *et al.*, 2020), sendo que na vagina saudável *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners* e *Lactobacillus jensenii* são as espécies predominantes (RAVEL *et al.*, 2011; ALONZO MARTÍNEZ *et al.*, 2021).

A importância de *Lactobacillus* spp. é evidenciada pelo fato de que a depleção destes microrganismos é associada ao desenvolvimento de disbioses e infecções por bactérias patogênicas endógenas ou exógenas (RAVEL *et al.*, 2011). Desta forma, podem-se desenvolver desordens ginecológicas que afetam a saúde física e mental das mulheres, com impacto sobre sua vida cotidiana (SATINSKY *et al.*, 2012). Entre as condições desenvolvidas pelo desequilíbrio do ambiente vaginal estão vaginose bacteriana (VB), candidíase vulvovaginal (CVV), vaginose citolítica, vaginite por *Trichomonas vaginalis*, infecções do trato urinário e outras doenças infecciosas do trato geniturinário feminino (KOVACHEV, 2014; PETROVA *et al.*, 2015).

O microbioma vaginal humano mantém uma baixa diversidade em condições de pH baixo, dependendo também da disponibilidade de açúcares do hospedeiro como fontes de carbono (OLIVER *et al.*, 2020). *L. crispatus* e *L. gasseri* são associados com a manutenção de um microbioma vaginal ótimo pela produção de compostos bactericidas e bacteriostáticos, como ácido láctico (BOSKEY *et al.*, 2001; BOSKEY *et al.*, 1999) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (MARTÍN; SUÁREZ, 2010), que mantêm um pH ácido. O pH vaginal mais elevado devido a uma menor concentração de lactato já foi relacionado a pacientes com VB, *Chlamydia trachomatis* e CVV quando comparadas a mulheres saudáveis (CECCARANI *et al.*, 2019). *L. iners* já foi associado à promoção da saúde vaginal, mas seu genoma também codifica a capacidade de promover a perturbação da microbiota pelo aumento do pH vaginal e produção de fatores de virulência espécie-específicos (PETROVA *et al.*, 2017; VERSTRAELEN *et al.*, 2009). Esta mudança no pH vaginal e, conseqüentemente, das espécies colonizadoras deste ambiente, também pode levar a problemas

ginecológicos graves como perda gestacional, parto prematuro e menores taxas de concepção se não tratadas (AMABEBE; ANUMBA, 2018).

Tanto *L. crispatus* quanto *L. gasseri* têm seu papel protetor na microbiota vaginal amplamente comprovado. Microbiotas com predomínio de *L. gasseri* raramente sofrem transição para um estado em que outras bactérias predominam, demonstrando que *L. gasseri* pode conferir resistência a mudanças na microbiota (GAJER *et al.*, 2012). A proteína APF-2 (Fatores Promotores de Agregação) de *L. gasseri* foi identificada como um fator de inibição da aderência de *T. vaginalis* (PHUKAN; BROOKS; SIMOES-BARBOSA, 2018). Também, estudos *in vitro* já demonstraram que cepas de *L. gasseri* produzem substâncias antimicrobicas contra *Streptococcus agalactiae*, o que tem relevância clínica dada a associação de *S. agalactiae* com vaginite e outras infecções invasivas em adultos, além de sua relação com infecções neonatais (DE GREGORIO *et al.*, 2014). *L. crispatus* tem forte efeito inibitório sobre *C. trachomatis*, principalmente pela ação de secreção de metabólitos (NARDINI *et al.*, 2016). Ma *et al.* (2023) observaram que uma maior diversidade do microbioma com gradual depleção de *Lactobacillus* spp, especialmente *L. crispatus*, está relacionada a uma maior gravidade de doenças cervicais. Ademais, ao interagirem com colônias de *Neisseria gonorrhoeae*, *L. crispatus* e *L. gasseri* levaram ao aumento da adesão dos lactobacilos às colônias de *N. gonorrhoeae*, diminuindo sua adesão às células epiteliais vaginais (VIELFORT *et al.*, 2008).

Dentre as várias infecções que afetam as mulheres em idade reprodutiva mundialmente, a VB é a mais comum e a principal causadora de corrimento vaginal (PEEBLES *et al.*, 2019). A VB é caracterizada por uma depleção das espécies protetoras de *Lactobacillus* spp. e um aumento na composição polimicrobiana de bactérias anaeróbias facultativas e estritas, como *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia*, *Fannyhassea vaginae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Mobiluncus* spp. e outras espécies bacterianas associada à VB (*Bacterial Vaginosis-Associated Bacteria* - BVAB) (PIROTTA; FETHERS; BRADSHAW, 2009; CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2015). Sendo a disbiose vaginal mais prevalente, 23-29% das mulheres do mundo são afetadas pela VB (PEEBLES *et al.*, 2019).

Atualmente, o tratamento da VB se baseia na administração de antibióticos como metronidazol, clindamicina e tinidazol (NEAL *et al.*, 2020). Entretanto, A VB recorrente (VBR) é uma desvantagem quando se opta pelo tratamento convencional.

A VBR é definida pela ocorrência de 2 ou 3 episódios de VB por ano (COOK *et al.*, 1992). Em geral, o tratamento da VB é eficaz, e tem uma taxa de cura de 80 a 90% no primeiro mês; contudo, uma taxa de recorrência de 35% nos 3 primeiros meses também é reportada (BRADSHAW *et al.*, 2006). Em um período de 6 a 12 meses após finalizar o tratamento da VB com antimicrobianos, 50% a 80% das mulheres sofrerão com a recorrência do quadro (FAUGHT; REYES, 2019). Visto isso, evidencia-se a necessidade de desenvolver estudos com enfoque em tratamentos alternativos seguros, como probióticos e prebióticos para aliviar o sofrimento físico e psicológico das pacientes.

Apesar do predomínio do *Lactobacillus* spp. na microbiota estar relacionado à manutenção da saúde do ambiente vaginal, mulheres saudáveis de diferentes grupos étnicos têm diferentes espécies caracteristicamente dominantes em seu microbioma vaginal (RAVEL *et al.*, 2011). Não obstante, muitas mulheres saudáveis e sem sintomas de VB podem ter a microbiota vaginal dominada por microrganismos que são associados à VB (MASFARI, DUERDEN; KINGHORN, 1986), o que sugere que a taxonomia por si só é insuficiente para prever os desfechos, e que a atividade microbiana, incluindo a produção metabólica, pode oferecer uma visão mais assertiva da função do microbioma.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

A microbiota vaginal é caracterizada por uma baixa diversidade de espécies microbianas e predomínio de *Lactobacillus* spp. Mudanças na composição do ambiente vaginal podem acarretar infecção por bactérias patogênicas e o desenvolvimento de disbioses, como a vaginose bacteriana. Além disso, o tratamento das disbioses, por vezes, pode não ser eficaz, podendo até mesmo predispor a recorrência do quadro. Desta forma, torna-se relevante desenvolver terapias alternativas que favoreçam a recuperação e manutenção da microbiota vaginal saudável, entre elas, os prebióticos. *L. crispatus* e *L. gasseri* têm seu potencial protetor na microbiota vaginal bem estabelecido, sendo relevante o desenvolvimento de estudos de prebióticos que forneçam a nutrição necessária a estas bactérias. Para tornar possível a aplicação de *Lactobacillus* spp. em prebióticos e em outras análises com enfoque na microbiota vaginal, é essencial compreender as condições

necessárias ao crescimento deste gênero e avaliar métodos de quantificação das espécies.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

- Avaliar condições de crescimento e métodos de quantificação de *Lactobacillus* spp.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Analisar a adequabilidade do meio LAPTg para a cultura de *Lactobacillus* spp.;
- Comparar as curvas de crescimento de *L. crispatus* e *L. gasseri* em LAPTg e LAPT (depletado de glicose) utilizando método de contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC), medida da densidade óptica a 540 nm (DO<sub>540</sub>) e aferição do pH;
- Verificar se a diferença de pH da cultura de *Lactobacillus* spp. e o pH do meio de cultura para plaqueamento influencia na contagem de UFC.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA VAGINAL

O microbioma humano inclui microrganismos, seus genomas e o ambiente químico ao seu redor. O termo microbiota é utilizado para se referir aos microrganismos de forma isolada (MITRA *et al.*, 2024). Os tipos de microrganismos presentes dependem das condições ambientais e do indivíduo e, conseqüentemente, variam entre os sítios anatômicos (RAVEL *et al.*, 2011). Além disso, os organismos também variam entre indivíduos e ao longo do tempo (COSTELLO *et al.*, 2009). O desenvolvimento de técnicas de sequenciamento resultou em uma rápida evolução de pesquisas envolvendo o microbioma humano e o seu papel na saúde e nas doenças. Essas técnicas também trouxeram um novo olhar sobre a patofisiologia de doenças que afetam os seres humanos (MITRA *et al.*, 2024).

Além de ser passagem para o esperma, a menstruação e o feto, a vagina humana e sua microbiota podem influenciar a concepção, gravidez, a forma e momento do parto e o risco de adquirir infecções sexualmente transmissíveis (ISTs) (AMABEBE; ANUMBA, 2018). Enquanto avanços nas técnicas de sequenciamento do DNA têm demonstrado que uma alta diversidade da microbiota intestinal está geralmente relacionada a uma menor susceptibilidade a doenças, o contrário tem se demonstrado verdadeiro ao se avaliar a microbiota vaginal (RAVEL *et al.*, 2011; SANTIAGO *et al.*, 2012). Quando há aumento da diversidade da microbiota local, eleva-se também o risco de VB e de outras disbioses bacterianas vaginais (PETROVA *et al.*, 2015).

A colonização da vagina com os *Bacillus* de Döderlein, hoje conhecidos como *Lactobacillus* spp., foi primeiro descrita pelo obstetra alemão Albert Döderlein, em 1892. Anteriormente, estas bactérias anaeróbias haviam sido descobertas no leite coalhado por Scheele em 1780 e, em seguida, em humanos por Folwarczny em 1858 (DONDEERS, 2007). Döderlein também descreveu as propriedades bactericidas deste gênero relacionadas à produção de ácido láctico (BOSKEY *et al.*, 2001). Em 1921, Schroeder confirmou os achados de Döderlein e desenvolveu três graus para classificar a composição da microbiota vaginal, sendo eles: i) microbiota vaginal saudável (grau I); ii) *Lactobacillus* spp. parcialmente substituídos por outras bactérias (grau II) e iii) *Lactobacillus* spp. completamente substituídos por outras bactérias (grau III) (DONDEERS *et al.*, 2009). Após a realização de cultura e microscopia, Thomas

(1928) identificou os *Bacillus* de Döderlein como *Lactobacillus acidophilus*. Baseando-se nestas descobertas, Thomas e Schroeder sugeriram que o corrimento vaginal é associado à deficiência de lactobacilos.

A predominância de alguns *Lactobacillus* spp. como *L. crispatus*, *L. gasseri* e *L. jensenii* é uma marca da saúde vaginal (RAVEL; BROTMAN, 2016). Neste estado ótimo da microbiota, os microrganismos colonizadores têm o potencial de proteção contra a colonização e infecção por bactérias patogênicas pela produção de ácido láctico e bioprodutos antimicrobianos, além do baixo nível de ativação do sistema imune (GRAVER; WADE, 2011). A perturbação da predominância de *Lactobacillus* spp. pode aumentar o risco de aquisição de ISTs e de infecções do trato genital superior pela ascensão de bactérias patogênicas e outras bactérias anaeróbias para este ambiente (BRUNHAM *et al.*, 2015).

Além da classificação de Schroeder, outros esforços foram feitos para agrupar ou classificar os padrões da microbiota vaginal de acordo com as espécies predominantes, assim como de ligar estes padrões ou tipos de comunidades ao status de saúde vaginal. Verhelst *et al.* (2005) sugeriram a existência de diferentes categorias baseando-se em coloração de Gram, sequenciamento do rRNA 16S e cultura. De acordo com as classes estabelecidas, nos graus Ia e lab *L. crispatus* é o *Lactobacillus* spp. dominante seguido por *L. jensenii*; no grau Ib, *L. iners* e *L. gasseri* predominam. O grau II representa um estado intermediário entre os graus I e III, contando com *L. iners*, *L. gasseri*, *L. crispatus*, *Fannyhassea vaginae*, *G. vaginalis*, *Actinomyces neuui* e *Peptoniphilus* spp. O grau III tem predomínio de BVABs (*G. vaginalis*, *Aerococcus christensenii*, *F. vaginae*, *Bacteroides ureolyticus*, *Dialister* sp., *Mobiluncus curtisii*, *P. bivia*, e *Varibaculum cambriense*) e presença de *L. iners*. Explorando técnicas de sequenciamento, Hummelen *et al.* (2010) indicaram diferentes perfis de predominância de bactérias relacionados a uma microbiota saudável e à VB; estes achados foram confirmados por Ravel *et al.* (2011).

Para avaliar a composição da microbiota vaginal, Ravel *et al.* (2011) sequenciaram o gene do rRNA 16S de mulheres em idade reprodutiva. Com isso, foram descritas 5 comunidades bacterianas, as “CSTs” (do inglês, *Community State Types*), nomeadas I, II, III, IV e V. O que caracteriza cada CST é a espécie de *Lactobacillus* spp. predominante, onde: *L. crispatus* (CST I), *L. gasseri* (CST II), *L. iners* (CST III) e *L. jensenii* (CST V). Por outro lado, na CST IV há uma depleção de *Lactobacillus* spp. e uma composição polimicrobiana que conta com anaeróbios

facultativos e estrictos como *G. vaginalis*, *Prevotella* spp., *F. vaginae*, entre outros (RAVEL *et al.*, 2011). Dessa forma, tem-se atribuído à CST IV a condição de “VB molecular” (MUZNY *et al.*, 2020). Detalhando a prevalência de cada CST em diferentes grupos populacionais, Ravel *et al.* (2011) encontraram as CSTs I, II, III, IV e V em 26,2%, 6,3%, 34,1%, 27% e 5,3% das mulheres, respectivamente. No Brasil, estudo da prevalência das CSTs indicou a CST III como a mais prevalente (36,5%), seguida pela CST IV (27,4%) (MARCONI *et al.*, 2020).

Ainda, a CST III é considerada uma microbiota intermediária ou de transição; contando com o predomínio de *L. iners*, já foi sugerido que esta microbiota pode não ser ótima à saúde reprodutiva feminina (BROTMAN *et al.*, 2014). Já foi demonstrado que a CST III está associada a mudanças para uma microbiota CST IV e vice-versa (BROTMAN *et al.*, 2014), sugerindo que *L. iners* pode oferecer uma proteção subótima contra a colonização vaginal por outros organismos, entre eles, *Candida* sp. (NOVAK *et al.*, 2020). A detecção de *L. iners* tanto em mulheres saudáveis quanto nas com VB, assim como as diferenças das características genômicas e fenotípicas em comparação a outras espécies de lactobacilos (MACKLAIM *et al.*, 2010), traz o questionamento do seu papel ativo no estabelecimento da disbiose assim como na recuperação de um quadro de disbiose (PETROVA *et al.*, 2017).

## 2.2 LACTOBACILLUS SPP.

O gênero *Lactobacillus* pertence ao filo Firmicutes, classe Bacilli, ordem II Lactobacillales e família *Lactobacillaceae* (IBRAHIM, 2016), e conta com mais de 200 espécies e subespécies (ZOTTA, T.; PARENTE, E.; RICCIARDI, A, 2017). Este gênero é composto por microrganismos altamente heterogêneos e é o maior entre o grupo de bactérias produtoras de ácido láctico (LAB - *lactic acid bacteria*) (IBRAHIM, 2016). Eles são anaeróbios facultativos, gram-positivos, catalase negativos, não-móveis, não-esporulados e com morfologia de bacilo, tendo também um conteúdo de G+C de 33-55% mol (AXELSSON, 1993). *Lactobacillus* spp. têm variadas aplicações na indústria, incluindo o uso em probióticos e para a produção de ácido láctico (MEJIA-GOMEZ; BALCÁZAR, 2020). O ácido láctico pode ser utilizado com foco em indústrias de alimentos, farmacêutica e química (MEJIA-GOMEZ; BALCÁZAR, 2020).

A microbiota com predomínio de *L. crispatus* (CST I) está associada a um ambiente vaginal saudável, enquanto a maior população de *L. iners* (CST III) é mais

propensa a disbioses vaginais (VERSTRAELEN *et al.*, 2009). Vários estudos demonstraram que o efeito protetor de *L. crispatus* contra ISTs, VB e CVV é intrinsecamente associado à sua capacidade de produzir ácido láctico e bacteriocinas que mantêm a saúde vaginal (BRESHEARS *et al.*, 2015; FUOCHI *et al.*, 2019). Em contrapartida, a falta de síntese de aminoácidos essenciais de *L. iners* faz com que esta espécie consuma aminoácidos exógenos derivados do hospedeiro (FRANCE *et al.*, 2016).

Algumas cepas de lactobacilos vaginais liberam H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que atua protegendo a mucosa contra mudanças ocasionadas por bactérias oportunistas. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é um agente oxidante potente que consome bactérias catalase-negativas e que é apontado como agente protetor contra a invasão de patógenos (ANTONIO *et al.*, 1999). Cerca de 80% das cepas de *Lactobacillus* spp. de origem vaginal geram H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e foi demonstrado que 95% de *L. crispatus* e 94% de *L. jensenii* produzem esta molécula (ARAOUTCHEVA *et al.*, 2001; ASLIM; KILIC, 2006; MATU *et al.*, 2010).

*L. crispatus* tem sido associado à proteção contra vários agentes de infecções vaginais, incluindo VB e CVV. Ao controlar a função das células epiteliais, *L. crispatus* protege a barreira epitelial contra a inflamação e o dano (ANTON *et al.*, 2018). Niu *et al.* (2017) demonstraram que esta espécie aumenta *in vitro* a resposta imunológica de células VK2/E6E7, modula a liberação de citocinas e quimiocinas e diminui a virulência de *C. albicans*. Mulheres com a microbiota vaginal colonizada por *Candida* costumam ter a microbiota com o predomínio de microrganismos diferentes de *L. crispatus* (OLIVER *et al.*, 2020). Outra espécie comumente encontrada na microbiota vaginal saudável é *L. jensenii*; esta espécie libera H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ajudando a manter o ambiente vaginal equilibrado e atuando na defesa contra patógenos. *L. jensenii* pode ser suscetível a mudanças ambientais, alteração de pH e produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, variando entre indivíduos (PETROVA *et al.*, 2015). *L. gasseri* tem conhecida produção de ácido láctico e papel de manutenção da acidez vaginal (PAGAR *et al.*, 2024).

A colonização da microbiota vaginal por lactobacilos relaciona-se a distintos padrões inflamatórios que contribuem para a distinção das CSTs. A presença de *L. iners* nas CSTs III e IV foi associada maiores taxas basais de fatores pró-inflamatórios como fator de inibição da migração de macrófagos (MIF), interleucina-1 $\alpha$ , interleucina 18 e o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), que são responsáveis pela ativação de resposta inflamatórias na vagina (DE SETA *et al.*, 2019). Inicialmente, a espécie foi descrita por Falsen *et al.* (1999) como bacilos gram-positivos; contudo, *L. iners* nem

sempre se apresenta claramente como gram-positivo (YOSHIMURA; OGAWA; SAITO, 2020), e em alguns casos tem forma de cocobacilo. Esta variação faz com que ele não seja devidamente identificado na coloração de Gram em todas as ocasiões em que se faz presente (DE BACKER *et al.*, 2007). Esta ambiguidade morfológica e de coloração deve ser considerada, visto que algumas análises diagnósticas da microbiota vaginal dependem destas características. O escore de Nugent, por exemplo, é baseado no método de Gram e na identificação dos lactobacilos como presumidamente bacilos gram-positivos (NUGENT; KROHN; HILLIER, 1991).

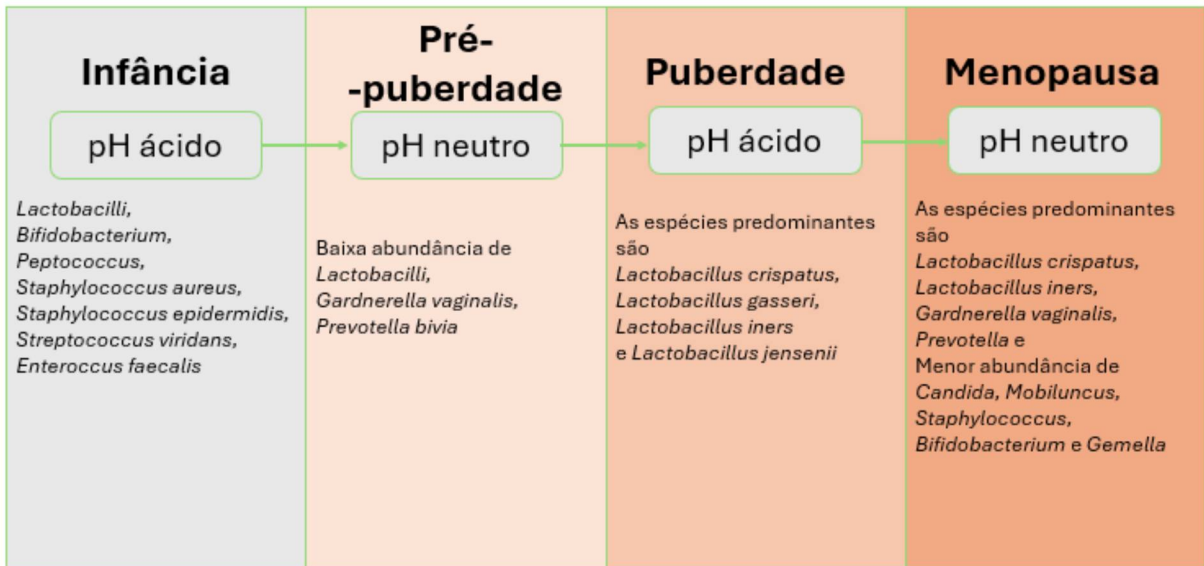
### 2.3 pH E GLICOGÊNIO

Devido à capacidade de *Lactobacillus* spp. de produzir ácido láctico, a colonização da mucosa vaginal com estes microrganismos ajuda a manter um pH baixo, que pode chegar a 3,5 (RAVEL *et al.*, 2011; O'HANLON *et al.*, 2013). Além do pH baixo, *Lactobacillus* spp. protegem a vagina e promovem a saúde vaginal pela produção de outros fatores como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, bacteriocinas e biosurfactantes, além de adesinas que permitem que estas bactérias eliminem outras por competição (AMABEBE; ANUMBA, 2018; PETROVA *et al.*, 2015). *Lactobacillus* spp. possuem mecanismos de defesa contra a queda do pH intracelular, envolvendo a fluidez da membrana, adaptação metabólica (metabolismo de aminoácidos livres) e expressão de proteínas induzidas pelo estresse (WU; HUANG; ZHOU, 2014).

O glicogênio é uma molécula que consiste em cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  com cerca de 13 resíduos de glicose cada. Essas cadeias são ligadas em fileiras consistindo em cerca de 53.000 resíduos de glicose para formar uma molécula de glicogênio (DENG *et al.*, 2016). O estrogênio é um fator do hospedeiro essencial à manutenção do microbioma vaginal. Ele promove o espessamento do epitélio vaginal e a geração de glicogênio intracelular (HICKEY *et al.*, 2012). Com a puberdade, o aumento dos níveis de estrogênio promove a maturação, proliferação e depósito de glicogênio nas células epiteliais cervicais e vaginais (Figura 1) (ANDERSON; MARATHE; PUDNEY, 2014; FARAGE; MAIBACH, 2005). À medida que os níveis de estrogênio aumentam, o pH do trato genital feminino é acidificado e a microbiota vaginal se torna mais estável e mais propensa ao predomínio de *Lactobacillus* spp. (KAUR *et al.*, 2020; FARAGE; MAIBACH, 2005; FARAGE; MILLER; SOBEL, 2010) (Figura 1). O glicogênio é

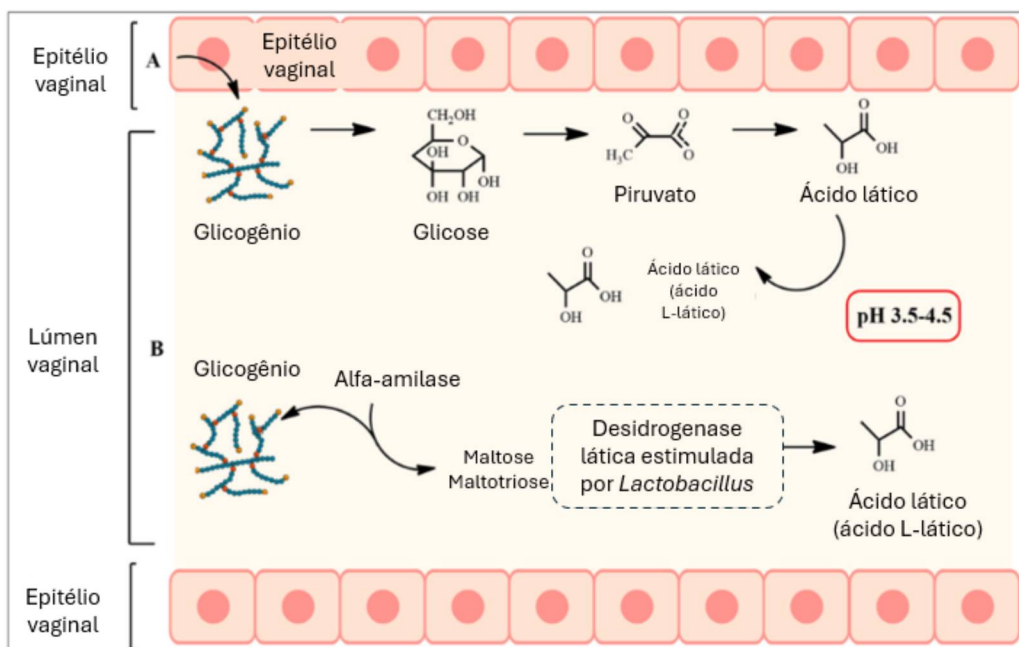
convertido em glicose, que então é metabolizada em condições anaeróbicas para produzir energia, um processo que eventualmente produz ácido láctico (AMABEBE; ANUMBA, 2018). A metabolização do glicogênio extracelular assim como a fermentação da glicose produz ácido láctico, o que diminui o pH do ambiente vaginal e previne a superpopulação de BVABs (O'HANLON *et al.*, 2013) (Figura 2).

FIGURA 1- COMPOSIÇÃO DO MICROBIOMA VAGINAL NA INFÂNCIA, PRÉ-PUBERDADE, PUBERDADE E MENOPAUSA



FONTE: Modificada de PAGAR *et al.* (2024)

FIGURA 2 – SÍNTESE DE ÁCIDO LÁCTICO A PARTIR DA QUEBRA DO GLICOGÊNIO



FONTE: Modificada de PAGAR *et al.* (2024)

## 2.4 METABOLISMO DAS BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ÁCIDO LÁTICO

O grupo das bactérias LAB inclui organismos ambientais, membros da microbiota de plantas, comensais humanos e animais e organismos patogênicos oportunistas ou obrigatórios (HOLZAPFEL; WOOD, 2014). Atualmente, bactérias produtoras de ácido láctico (LAB) são definidas como bactérias não-esporuladas, anaeróbias, mas aerotolerantes e gram-positivas que fermentam uma variedade de açúcares ao produto final ácido láctico (HOLZAPFEL; WOOD, 2014). Filogeneticamente, apenas bactérias da ordem *Lactobacillales* são LAB, apesar de organismos de outros gêneros terem características fisiológicas semelhantes (HOLZAPFEL; WOOD, 2014). As LAB são classificadas em três grupos: homofermentadoras obrigatórias, heterofermentadoras obrigatórias e heterofermentadoras facultativas (GÄNZLE, 2015). De forma geral, o ATP é gerado pela oxidação do açúcar a piruvato. O piruvato então precisa ser reduzido para remover os elétrons e ser balanceado; a redução do piruvato gera ácido láctico (SAUER *et al.*, 2017).

Nas LAB fermentadoras de glicose pela via de Emden-Meyerhoff-Parnas (EMP), o piruvato é o principal ponto de ramificação do metabolismo e a frutose é exclusivamente utilizada como fonte de carbono (AXELSSON, 1993). Ao diferenciar *Lactobacillus* spp. entre heterofermentativos obrigatórios e facultativos, os facultativos, em condições em que há limitação da disponibilidade de glicose, fermentam hexoses a ácido láctico, ácido acético, etanol e ácido fórmico, além de também degradarem pentoses (IBRAHIM, 2016). Os heterofermentativos obrigatórios fermentam hexoses a ácido láctico, CO<sub>2</sub>, ácido acético e/ou etanol pela via 6-fosfogluconato (IBRAHIM, 2016). Lactobacilos homofermentativos produzem exclusivamente ácido láctico como o produto final do metabolismo de hexose pela via EMP (MEJIA-GOMEZ, BALCÁZAR, 2020). Tanto *L. crispatus* quanto *L. gasseri* são homofermentativos (CHANG *et al.*, 2001; ZUNAR *et al.*, 2020).



## 2.5 CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO E MEIOS DE CULTURA PARA *LACTOBACILLUS* SPP.

Os lactobacilos são caracterizados pelas altas exigências nutricionais, devido à sua baixa habilidade de sintetizar aminoácidos e vitaminas do complexo B (WANG *et al.*, 2019). Sendo assim, estas espécies necessitam ser cultivadas em meios enriquecidos, que incluam carboidratos fermentáveis, fontes de aminoácidos e ácidos nucleicos, vitaminas do complexo B e outros minerais (PALLIN *et al.*, 2016). Para a cultura de LAB em laboratório, extrato de levedura ou de carne são comumente utilizados como fonte de nitrogênio, porém, estes compostos elevam os custos do MRS (HAYEK *et al.*, 2019), meio mais utilizado para a cultura de *Lactobacillus* spp. O crescimento deste gênero também pode ser influenciado por fatores como temperatura, pH, concentração de oxigênio ou atividade de água (ŚLIŻEWSKA; CHLEBICZ-WÓJCIK, 2020). Considera-se 30 a 40 °C e 5,5 a 6,2 como temperaturas e pH ótimos para o crescimento de *Lactobacillus* spp., mas algumas espécies podem crescer entre 2 a 53 °C e em pH entre 4,5 e 6,5 (ŚLIŻEWSKA; CHLEBICZ-WÓJCIK, 2020). Além dos fatores mencionados, a composição do meio de cultura e as condições de crescimento podem influenciar a cinética do crescimento e a duração da fase lag de *Lactobacillus* spp. (BERTRAND, 2019).

Até 1960, os meios de cultura mais utilizados para *Lactobacillus* spp. eram os meios de Briggs (1953) e de Cox; Briggs (1954), entretanto, várias cepas deste gênero não apresentavam crescimento adequado nestes meios (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960). Estes meios também possuíam suco de tomate em sua composição, elemento de preparo variável e inconveniente. Desta forma, De Man; Rogosa e Sharpe (1960) buscaram por um novo meio de cultura para *Lactobacillus* spp. que permitisse o crescimento de uma gama maior de espécies e que não levasse suco de tomate em sua formulação. Desta forma, chegou-se à composição (por litro): peptona, 10 g; Lab-Lemco, 10 g; extrato de levedura, 5 g; glicose, 20 g; mono-oleato de polioxietileno sorbitano (Tween 80), 1 ml; fosfato dipotássico ( $K_2HPO_4$ ), 2 g; acetato de sódio triidratado ( $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ ), 5 g; citrato de triamônio ( $HOC(CO_2NH_4)(CH_2CO_2NH_4)_2$ ), 2 g; sulfato de magnésio heptahidratado ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), 200 mg; sulfato de manganês tetra hidratado ( $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ ), 50 mg. Recomendou-se o preparo em pH 6,2 a 6,5 e a esterilização por 15 min a 120 °C (DE

MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960). Hoje, o MRS é comumente utilizado para a cultura de *Lactobacillus* spp.

Outro meio de cultura aplicável a *Lactobacillus* spp. é o LAPTg. Em 1983, Pavlova *et al.* (1983) utilizaram este meio para comparar alterações da ultraestrutura de *Lactobacillus* spp. cultivados em MRS e em LAPTg; o crescimento em ágar de ambos os meios gerou o mesmo número de UFC. Na ocasião, a composição utilizada foi: peptona 1,5%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, glicose 1% e Tween 80 0,1%; preparo em pH final 6,2 (PAVLOVA *et al.*, 1983). Em relação a outros estudos que envolveram *Lactobacillus* spp. e o uso de LAPTg, também já foi analisada a produção de peróxido de hidrogênio (TOMÁS *et al.*, 2003) e testes de susceptibilidade a antimicrobianos (OCAÑA; SILVA; NADER-MACÍAS, 2006), por exemplo. Nos estudos de Tomás *et al.* (2003) e de Ocaña; Silva e Nader-Macías (2006), o uso de LAPTg foi comparável ao de MRS.

Um elemento de destaque da composição do LAPTg é a peptona proteose nº3, que fornece vários benefícios nutricionais às bactérias anaeróbias fastidiosas, como nitrogênio, carbono, aminoácidos e outros fatores essenciais ao crescimento (ROSCA; CASTRO; CERCA, 2020). Apesar da composição semelhante, ainda não existem trabalhos que comparem diferentes medidas de crescimento (contagem de UFC, DO e pH) de *Lactobacillus* spp. entre estes meios.

## 2.6 VAGINOSE BACTERIANA, CANDIDÍASE VULVOVAGINAL E VAGINITE AERÓBICA

A VB é identificada como uma disbiose vaginal polimicrobiana grave, em que há uma diminuição ou desaparecimento dos considerados *Lactobacillus* spp. “saudáveis” e um crescimento excessivo de várias espécies anaeróbias estritas ou facultativas (FREDRICKS; FIEDLER; MARRAZZO, 2005; MUZNY *et al.*, 2018). Nesta condição clínica há presença de corrimento vaginal e odor desagradável de peixe; a queixa mais comum entre as pacientes é a coceira na região perianal (KHEDKAR; PAJAI, 2022). No Brasil, a prevalência da VB é de cerca 27% (MARCONI *et al.*, 2020). Também sendo comum entre gestantes, a prevalência varia de 12% a 49% neste grupo (PEEBLES *et al.*, 2019). Entretanto, em populações em alto risco para a aquisição de ISTs esta taxa pode chegar a 70% (SCHWEBKE; DESMOND, 2005). Em estudo baseado apenas no diagnóstico clínico, a prevalência da VB foi de 4% entre

mulheres em idade universitária, enquanto 61% das frequentadoras de uma clínica de ISTs apresentaram esta disbiose (MEAD, 1993).

Detalhando a patogênese da VB, Muzny *et al.* (2019) trouxeram um modelo conceitual do desenvolvimento desta disbiose. Quando ocorre a exposição sexual a cepas virulentas de *G. vaginalis*, *Lactobacillus* spp. presentes na mucosa vaginal saudável são substituídas por outras bactérias anaeróbias, como *P. bivia* e *F. vaginae*. O biofilme polimicrobiano formado, que origina as “clue cells” (SWIDSINKSKI, *et al.*, 2005) é capaz de resistir a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ácido láctico secretados por *Lactobacillus* spp., tornando-o difícil de ser “quebrado”. Realizando a proteólise, *G. vaginalis* produz aminoácidos que favorecem o crescimento de *P. bivia*, que passa a produzir amônia e estimular a propagação de *G. vaginalis*; desta forma, há um sinergismo entre as espécies (MUZNY *et al.*, 2019) (Figura 3).

FIGURA 3 - MODELO DO DESENVOLVIMENTO DO BIOFILME POLIMICROBIANO NA VAGINOSE BACTERIANA



FONTE: Modificada de SOUSA; PEREIRA; CERCA (2023)

Assim, como *G. vaginalis*, *P. bivia* também é produtora de sialidase (ROBINSON *et al.*, 2019). Esta enzima é capaz de degradar a camada de muco presente sobre as células epiteliais, aumentando a susceptibilidade à adesão de outras bactérias. Entre as bactérias anaeróbias estritas que passam a se aderir a este epitélio, está *F. vaginae*. Apesar de mulheres com *G. vaginalis* e *F. vaginae* apresentarem maiores taxas de recorrência de VB, nem todas as mulheres com VB recorrente apresentam *F. vaginae* (BRADSHAW *et al.*, 2006).

Apesar da vaginite aeróbia (VA) e a VB possuírem características semelhantes, como a depleção de *Lactobacillus* spp., o aumento do conteúdo vaginal (com odor de peixe na VB e, em casos severos de VA, de podridão) e aumento do pH (mais acentuado na VA) (DONDEERS *et al.*, 2017), a VA difere em alguns aspectos. Na VA há aumento de cocos gram-positivos, como *Streptococcus agalactiae* e gram-

negativos, especialmente *E. coli* (DONDEERS *et al.*, 2002; KUEBRICH *et al.*, 2004). Do ponto de vista clínico, além da basificação do pH e do odor fétido associado, na VA há presença de leucócitos tóxicos e células parabasais, secreção amarelada, vermelhidão, coceira, queimação e dispareunia (DONDEERS *et al.*, 2002; KUEBRICH *et al.*, 2004; DONDEERS *et al.*, 2007). Um dos antibióticos mais importantes utilizados no tratamento da VA é a fluoroquinolona ciprofloxacina, capaz de manter estável a microbiota “boa” em relação à patogênica (TEMPERA *et al.*, 2006; TEMPERA *et al.*, 2009; TEMPERA; FURNERI, 2010).

A CVV é uma infecção causada por cepas do gênero *Candida*. Mais de 20% das mulheres saudáveis, assintomáticas e não-gestantes durante uma visita ginecológica mostraram o trato vaginal colonizado por *Candida ssp.*, e *C. albicans* foi a espécie isolada com maior frequência (cerca de 68,3%) (BAUTERS *et al.*, 2002), seguida por *C. glabrata* (ACHKNAR; FRIES, 2010). O aumento da incidência da candidíase é atribuído a fatores como o uso excessivo de antibióticos e contraceptivos orais, assim como a tratamentos terapêuticos inadequados (SOBEL, 1985).

É bem estabelecido que após dias ou semanas do tratamento com antimicrobianos de um episódio sintomático de VB é comum o desenvolvimento da CVV, sendo ambas as infecções vaginais mais comuns (SOBEL; VAMPATI, 2024). A explicação aceita é de que os agentes antibacterianos impactam na microbiota já alterada pela VB e removem bactérias residuais que funcionam como “barreiras”, facilitando a proliferação de leveduras no ambiente vaginal e levando à CVV sintomática (SOBEL; VEMPATI, 2024). Em estudo com mulheres argentinas com CVV recorrente, uma associação com a VB foi encontrada em 35% dos casos e uma microbiota vaginal intermediária caracterizava outras 33% das mulheres (ARECHAVALA *et al.*, 2021). Porém, o desenvolvimento da CVV de forma subsequente ao tratamento da VB é complexo, e se relaciona às mudanças no microbioma, incluindo uma alta colonização por *Candida ssp.* anterior ao tratamento com antibióticos e uma perda de *Lactobacillus ssp.* (SOBEL; VEMPATI, 2024).

Desta forma, a patogênese de VB, VA e CVV está relacionada à depleção de *Lactobacillus ssp.* componentes da vagina (FUOCHI *et al.*, 2019). A redução destes microrganismos interfere na saúde vaginal pela redução da produção de elementos protetores por eles sintetizados, tornando a microbiota vaginal mais suscetível ao estabelecimento de infecções (FUOCHI *et al.*, 2019).

## 2.7 DESAFIOS PARA O TRATAMENTO DAS INFECÇÕES VAGINAIS

Para o tratamento das infecções vaginais bacterianas, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) recomenda agentes antimicrobianos como metronidazol, tinidazol, secnidazol e clindamicina, que atuam sobre a síntese de DNA bacteriano (REITER; SPADT, 2019; VERSTRAELEN; SWIDSINSKI, 2019; CDC, 2021). Entretanto, o metronidazol, primeira droga de escolha, tem diversos efeitos colaterais associados, como problemas gastrointestinais, náusea e vômito (PAGAR *et al.*, 2024). Não obstante, biofilmes bacterianos, presentes em várias infecções vaginais, podem sobreviver ao tratamento com estas drogas (HAY, 2017; JUNG *et al.*, 2017). Estes biofilmes são tolerantes à terapia antimicrobiana e às defesas do hospedeiro devido à sua multicelularidade intrínseca. Os microrganismos presentes no biofilme atuam de maneira sinérgica para proteger o biofilme da ação antimicrobiana (SOTO, 2013; STEWART; COSTERTON, 2001).

A penetração dos antimicrobianos é impedida pela produção de substâncias poliméricas extracelulares (ESPs) pelas bactérias formadoras do biofilme (ORTEGA-PEÑA; HERNÁNDEZ-ZAMORA, 2018). Outros mecanismos de resistência desta estrutura envolvem uma penetração insuficiente das células imunes dentro da matriz do biofilme, alterações fenotípicas das células do biofilme (semelhante à formação de esporos), a criação de bombas de efluxo que removem solutos, como os antibióticos, para fora das células, assim como as “células persistentes”, que são frações microscópicas de bactérias que podem tolerar dosagens destas drogas muito maiores do que a concentração inibitória mínima (MATHÉ; VAN DIJCK, 2013; MUZNY; SCHWEBKE, 2015). Estes mecanismos e outros em conjunto são responsáveis pela falha na terapia antimicrobiana. De forma importante, os agentes antimicrobianos também exercem efeitos adversos na saúde da microbiota vaginal resultando em disbiose, o que é associado às altas taxas de recorrência das infecções vaginais (CASTRO; CERCA, 2015).

## 2.8 PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS

Em situações em que ocorrem mudanças na microbiota ocasionada pelas disbioses vaginais e pelo tratamento subsequente, o uso de probióticos, microrganismos vivos que, quando administrados em quantidade adequada,

promovem benefícios à saúde do hospedeiro (WHO, 2001), como suplementos ou ainda na forma vaginal, tem sido explorado como uma terapia substituta. Vários trabalhos já demonstraram que os probióticos estimulam a recuperação da microbiota nativa do hospedeiro após a terapia antimicrobiana (JOHNNSTON *et al.*, 2006). *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 foram os primeiros probióticos aplicados à saúde vaginal (CHAN *et al.*, 1984; REID *et al.*, 1987). *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, gêneros frequentemente empregados em forma de probióticos, apresentam componentes de superfície que interagem com o muco, como o ácido lipoteicóico (LTA), proteínas associadas à camada superficial (SLAPs) e proteínas ligadoras de mucina (Mubs) que permitem uma ligação preferencial destas bactérias ao muco, induzindo a formação de biofilme (LEBEER *et al.*, 2010). Os fatores e mecanismos de adesão e agregação foram estudados para várias espécies de LAB (VÉLEZ *et al.*, 2007; SENGUPTA *et al.*, 2013), e as proteínas de superfície, como as SLAPs e SLAP-like, conhecidas como fatores promotores de agregação (APF), são envolvidas na adesão e agregação das LAB (HYNÖNEN; PALVA, 2013). SLAPs já foram reportadas em *L. crispatus*, e APF são conhecidas como proteínas secretadas que causam a autoagregação de *L. gasseri* e de outras espécies (BORIS; SUÁREZ, BARBÉS, 1997). Ao avaliar a associação da agregação de *L. brevis* com a diminuição do pH pela fermentação da glicose, Saito *et al.* (2019) encontraram que a agregação desta espécie acontece pelo descolamento parcial de SLAP causada pela queda do pH em decorrência da fermentação; este fenômeno foi tido como uma resposta de autoagregação em resposta a mudanças no ambiente. A formação de um biofilme complexo por estas bactérias probióticas cria um ambiente hostil aos patógenos, restringindo sua entrada e adesão às células epiteliais (PAGAR *et al.*, 2024).

Probióticos com *Lactobacillus* spp. podem ser benéficos no manejo da VB ao prevenir a VB recorrente pela recolonização da microbiota vaginal (ABBE; MITCHELL, 2023). O mecanismo de ação dos probióticos orais, os mais utilizados, permanece desconhecido, mas é proposto que eles sejam capazes de enriquecer a microbiota vaginal pelo trato gastrointestinal (ABBE; MITCHELL, 2023). Um ensaio clínico randomizado demonstrou que pessoas com VB utilizando probióticos orais tiveram uma maior recolonização da microbiota vaginal por *Lactobacillus* spp. após 6 semanas do que as que estavam no grupo placebo (61% vs. 27%) (VUJIC *et al.*, 2013). Entretanto, o que se sugere é que os probióticos orais trariam benefícios quando combinados aos antibióticos (SENOK *et al.*, 2009). Ao se comparar os efeitos do

tratamento com antibióticos em relação ao tratamento com probióticos vaginais, o grupo tratado com probióticos teve uma maior taxa de cura em 30 dias do que o grupo tratado com antibióticos (96% vs. 70%), e o primeiro grupo também apresentou menor taxa de recorrência da VB (LING *et al.*, 2012).

Prebióticos fornecem nutrição às bactérias benéficas da microbiota vaginal, especialmente, a *Lactobacillus* spp. (ROUSSEAU *et al.*, 2005), também tendo papel de preservar a saúde do ambiente vaginal ao promover o crescimento destas bactérias. Prebióticos são fibras insolúveis que incluem oligossacarídeos,  $\beta$ -glucanos, frutooligossacarídeos (FOS), galactooligossacarídeos (GOS) e inulina (PANJIAR *et al.*, 2017; RODRÍGUEZ-PASTÉN *et al.*, 2022B; YADAV *et al.*, 2019). Eles também podem reforçar o sistema imune no trato vaginal ao estimular componentes imunes, incluindo citocinas e peptídeos antimicrobianos que ajudam a prevenir infecções e que mantêm a saúde vaginal (GIORDANI *et al.*, 2023).

Prebióticos são fermentáveis pelos lactobacilos e produzem ácidos graxos de cadeia curta como o ácido láctico, criando um ambiente ácido que inibe patógenos (PARVEZ *et al.*, 2006). Considerando o pH vaginal ácido, os prebióticos de uso tópico devem ser resistentes a condições ácidas e manter a sua integridade e propriedades mesmo em ambiente ácido (DAVANI-DAVARI *et al.*, 2019). Para avaliar as características prebióticas de oligossacarídeos variados, incluindo dois FOS e dois glicooligossacarídeos, foram avaliadas cepas de *L. crispatus*, *L. jensenii* e *Lactobacillus vaginalis*. O estudo avaliou o potencial dos oligossacarídeos em estimular o crescimento das cepas probióticas. Encontrou-se que dois oligossacarídeos (FOS Actilight e  $\alpha$ -1,6/a-1,4 GOS) foram consumidos cerca de 80% pelos lactobacilos, enquanto cepas patogênicas como *G. vaginalis*, *E. coli* e *C. albicans* não hidrolizaram os oligossacarídeos de forma efetiva (ROUSSEAU *et al.*, 2005). As cepas de *Lactobacillus* spp. selecionadas foram capazes de crescer, reduzindo o pH e aumentando níveis de lactato após 48h de incubação (ROUSSEAU *et al.*, 2005). Entre as análises comumente utilizadas para a avaliação de potenciais prebióticos, estão os métodos de contagem de UFC e de aferição do pH (normalmente, aplicado para o acompanhamento da fermentação realizada por *Lactobacillus* spp.) (RANA *et al.*, 2024; ŠERTOVIĆ *et al.*, 2019).



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 CEPAS DE REFERÊNCIA, MEIOS DE CULTURA E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO

Foram estudadas as seguintes cepas da *American Typing Culture Collection* (ATCC): *Lactobacillus crispatus* (ATCC 33820) e *Lactobacillus gasseri* (ATCC 33323). As bactérias foram cultivadas em dois meios de cultura: (i) Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (Difco, Detroit, MI, Estados Unidos): peptona proteose 1%, extrato de carne 1%, extrato de levedura 0,5%, dextrose 2%, polissorbatato 80 0,1%, citrato de amônio 0,2%, acetato de sódio 0,5%, sulfato de magnésio 0,01%, sulfato de manganês 0,005% e fosfato dipotássico 0,2%; (ii) LAPTg (preparo *in-house*): peptona proteose nº3 1,5%, triptona 1%, extrato de levedura 1%, glicose 1% e Tween 80 0,1%. As bactérias foram incubadas em jarra com uso de sachê gerador de anaerobiose (GasPak, BD) a 37 °C. Apenas cepas de referência de bactérias foram utilizadas neste estudo, dispensando a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

#### 3.2 AVALIAÇÃO DO MEIO LAPTg

Para verificar a adequabilidade do uso de LAPTg para cultura de *Lactobacillus* spp., foi realizada a comparação da cultura de *L. crispatus* e *L. gasseri* em MRS, meio comumente utilizado para a cultura destas espécies (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960) e LAPTg, ambos em pH final 6,5. Para tanto, partiu-se de cultura de 24 h (placa MRS para inóculo MRS e placa LAPTg para inóculo LAPTg) para a preparação de inóculo a 0,5 na escala de McFarland. Após isso, 100 µL do crescimento bacteriano foram submetidos a diluição seriada em volume total de 1000 µL ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) em solução salina estéril. 100 µL das diluições  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  foram dispostas em meio sólido e plaqueadas em triplicata utilizando alças em “L”. Houve contagem do número de UFC após incubação das placas em anaerobiose por 24 h a 35 °C.

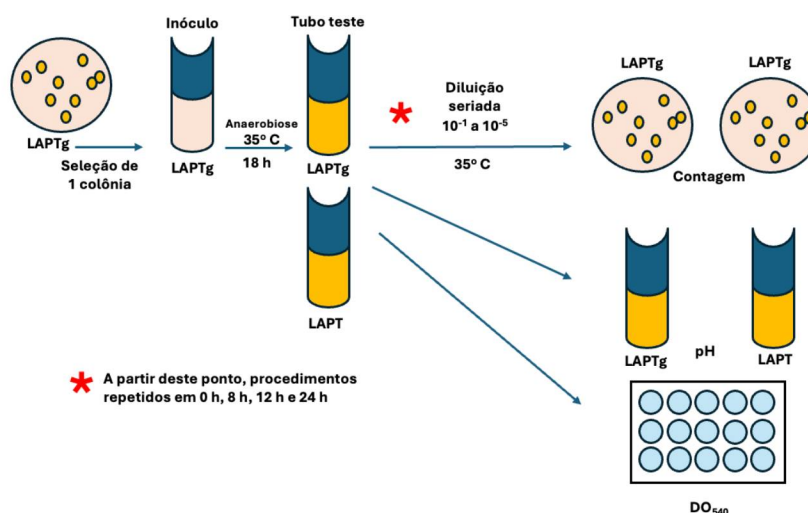
### 3.3 ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE DIFERENTES MEDIDAS PARA O CRESCIMENTO DE *LACTOBACILLUS* spp.

A obtenção da curva de crescimento de *L. crispatus* e *L. gasseri* em LAPTg e LAPT (depletado de glicose) também foi realizada. Para a preparação do inóculo, uma colônia (obtida em placa de LAPTg incubada em anaerobiose por 24 h) de cada cepa foi transferida para 5 mL de caldo de cada meio (sempre na formulação acrescida de glicose e no pH original 6,5) e incubada em anaerobiose a 35° C por 18 h (Figura 4). MRS é convencionalmente utilizado para a cultura de *Lactobacillus* spp., por isso foi utilizado como um controle em relação ao LAPTg.

A curva contou com os pontos de 0 h, 8 h, 12 h e 24 h. Foram adicionados 100 µL de inóculo a um tubo teste (TT) com volume de 5mL de cada meio (LAPT e LAPTg); os tubos testes foram incubados em anaerobiose a 35° C por 24 h. Em cada ponto da curva, foram analisados em triplicata: contagem de colônias, pH do TT e DO<sub>540</sub>. Para a contagem, 100 µL da suspensão do TT foram submetidos à diluição seriada em volume total de 1000 µL (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-5</sup>); as diluições 10<sup>-3</sup> a 10<sup>-5</sup> foram plaqueadas nos meios de interesse.

Para a leitura da DO<sub>540</sub>, 100 µL do TT foram depositados em placas de 96 poços; para se obter os dados da DO<sub>540</sub>, utilizou-se leitor de microplacas LMR FLEX UV-VIS i (Loccus, BR). Para verificar o pH do TT, fitas de pH (Macherey-Nagel, GE) na escala 3,6 - 6,1 (graduação 0,5) foram utilizadas.

FIGURA 4 – PROCEDIMENTOS REALIZADOS PARA A COMPARAÇÃO DO MEIO LAPTg NAS VERSÕES DEPLETADAS DE GLICOSE (LAPT) E CONVENCIONAL (LAPTg)

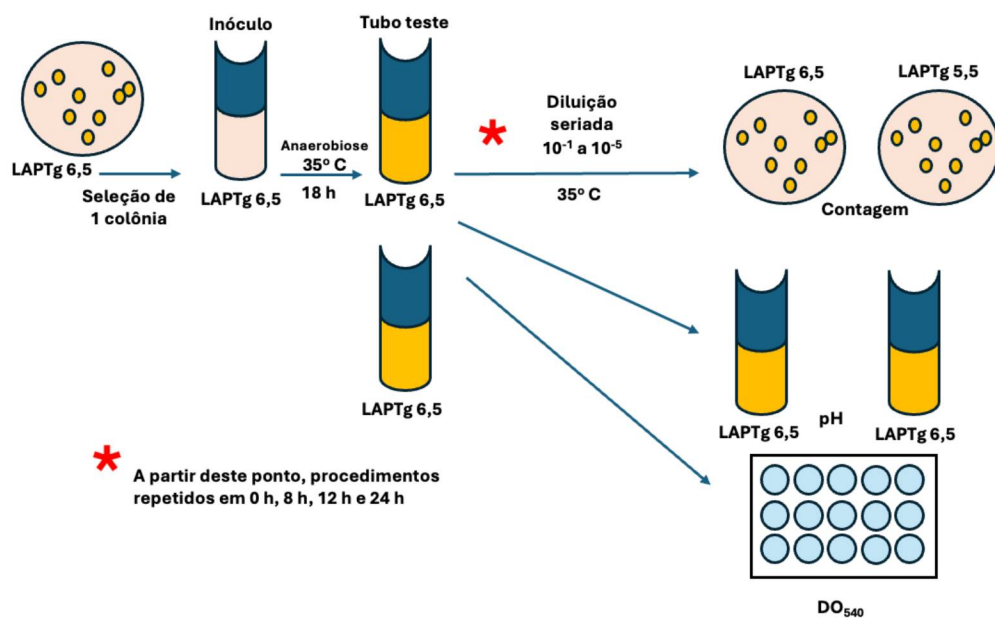


FONTE: O AUTOR (2024)

### 3.4 TESTE DA UTILIZAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA ACIDIFICADOS PARA PLAQUEAMENTO

A fim de avaliar o efeito da acidificação do meio sólido (em que há plaqueamento) em comparação ao TT sobre o crescimento de *L. crispatus* e *L. gasseri*, LAPTg teve duas variações de pH analisadas: LAPTg a pH 6,5 (pH original) e a pH 5,5. Nos pontos 0 h, 8 h, 12 h e 24 h, alíquotas de 100 µL do TT foram submetidas a diluição seriada de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ; 100 µL das diluições  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  foram espalhadas em placas de LAPTg pH 6,5 e LAPTg pH 5,5 (Figura 5). Em cada ponto também foi aferido o pH e realizada a leitura de  $DO_{540}$ .

FIGURA 5 – PROCEDIMENTOS REALIZADOS PARA A COMPARAÇÃO ENTRE LAPTg EM pH ORIGINAL E EM pH ACIDIFICADO



FONTE: O AUTOR (2024)

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram feitas com o auxílio do *software* GraphPad Prism (GraphPad versão 10, GraphPad Software LLC, La Jolla, CA). O teste-t não pareado foi utilizado para comparar o número de UFC em MRS e em LAPTg. Para avaliar, tanto para *L. crispatus* quanto para *L. gasseri*, a variação do número de UFC/mL entre LAPTg e LAPT e os valores de pH dos meios de cultura, utilizou-se análise de variância (ANOVA). Também foi utilizado ANOVA a fim de comparar a contagem de colônias de

*L. crispatus* e *L. gasseri* em LAPTg 6,5 e LAPTg 5,5. Em todas as análises adotou-se  $p < 0,05$  como significativo.

## 4 RESULTADOS

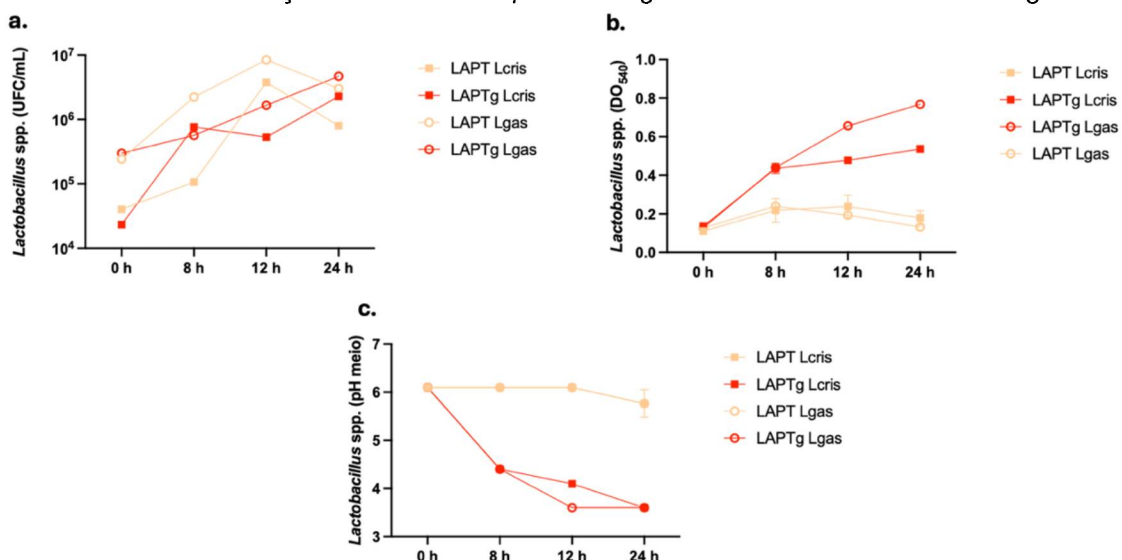
### 4.1 AVALIAÇÃO DO MEIO LAPTg

Para confirmar a adequabilidade da substituição do MRS pelo meio LAPTg, realizamos uma comparação inicial entre tais meios na recuperação das cepas de *L. crispatus* e *L. gasseri* a partir de plaqueamento realizado em triplicata. Não houve diferença estatística ( $p = 0.847$ ) entre o número de UFC/mL recuperadas em MRS ( $3,8 \times 10^6 \pm 4,6 \times 10^6$ ) e em LAPTg ( $3,5 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^6$ ). Com isso, asseguramos que as cepas de *Lactobacillus* spp. incluídas no estudo apresentam crescimento adequado em LAPTg.

### 4.2 ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE DIFERENTES MEDIDAS PARA O CRESCIMENTO DE *LACTOBACILLUS* spp.

Foram realizadas culturas para obtenção da curva de crescimento de *L. crispatus* e *L. gasseri* em LAPTg e LAPT (depletado de glicose) para obtenção do crescimento basal das cepas e comparação com o crescimento ideal na presença de glicose. A fase estacionária do crescimento foi observada entre 12 e 24 h. Conforme as curvas de crescimento representadas na Figura 6a, não houve variação no número de UFC/mL entre os meios de cultura LAPTg e LAPT para *L. crispatus* ( $p = 0,63$ ).

FIGURA 6 – COMPARAÇÃO ENTRE *L. crispatus* E *L. gasseri* CULTIVADOS EM LAPTg E LAPT



FONTE: O AUTOR (2024)

Nota: Os gráficos se referem às medidas de a) número de UFC/mL; b) DO<sub>540</sub> e c) pH. Em c), há sobreposição das curvas de LAPT Lcris e LAPT Lgas.

Já a análise da curva de crescimento de *L. gasseri* demonstrou que não houve diferença significativa entre o número de UFC/mL recuperado em LAPTg e em LAPT ( $p = 0,16$ ) (Figura 7). Tais dados baseados em número de UFC/mL não estão de acordo com as curvas de crescimento baseadas na leitura de DO das culturas (Figura 6b), visto que os dados da leitura de DO demonstraram que o crescimento bacteriano foi estatisticamente superior no meio LAPTg tanto para *L. crispatus* ( $p = 0,002$ ) quanto para *L. gasseri* ( $p < 0,0001$ ).

Considerando que a produção de ácido láctico é realizada por *Lactobacillus* spp. a partir da glicose, foram aferidos os valores de pH dos meios de cultura para obtenção de uma curva baseada nos diferentes momentos da aferição. Conforme observado na Figura 6c, os valores de pH foram significativamente menores para *L. crispatus* ( $p < 0,0001$ ) e de *L. gasseri* ( $p < 0,0001$ ) quando cultivados em LAPTg, em comparação ao crescimento em LAPT.

FIGURA 7 - CRESCIMENTO DAS DILUIÇÕES  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  DE *L. gasseri* EM PLACA DE LAPTg E LAPT



FONTE: O AUTOR (2024)

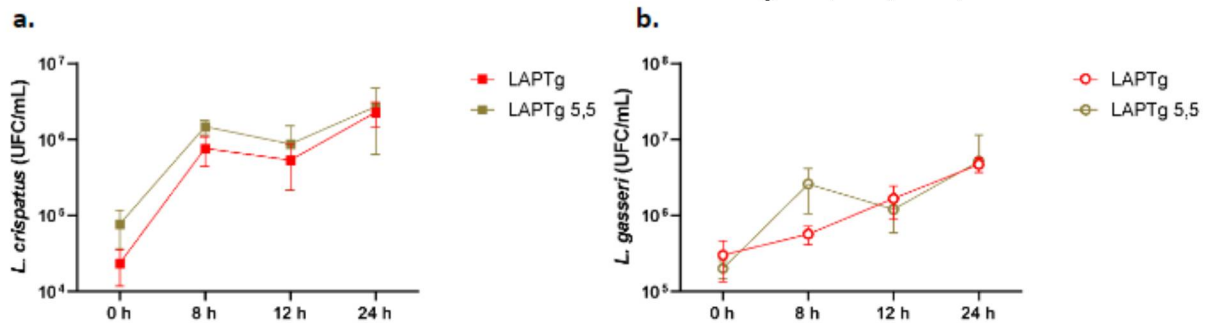
Nota: Placas referentes ao crescimento após 24h de incubação.



#### 4.3 TESTE DA UTILIZAÇÃO DE MEIOS DE CULTURA ACIDIFICADOS PARA PLAQUEAMENTO

Para testar se a diferença entre o pH da cultura de *Lactobacillus* spp. e o pH do meio utilizado para plaqueamento das diluições seriadas influencia na contagem de UFC, foram realizadas culturas de *L. crispatus* e *L. gasseri* em caldo LAPTg e LAPTg acidificado em pH 5,5. Conforme observado na Figura 8a, não houve diferença estatística entre a contagem de colônias de *L. crispatus* entre placas com LAPTg e LAPTg 5,5 ( $p = 0,385$ ). Achado semelhante pode ser observado na Figura 8b para *L. gasseri*, cuja contagem de UFC não diferiu entre os meios ( $p = 0,607$ ).

FIGURA 8 - NÚMERO DE UFC/mL EM LAPTg EM pH 6,5 E 5,5



FONTE: O AUTOR (2024)

Nota: Os gráficos se referem a a) *L. crispatus* e b) *L. gasseri*.



## 5 DISCUSSÃO

*Lactobacillus* spp. dependem de fontes exógenas de aminoácidos, precursores de ácido nucleicos e vitaminas para seu crescimento, sendo considerados microrganismos fastidiosos (SAUER *et al.*, 2017). Tradicionalmente, o meio de cultura utilizado para o cultivo de *Lactobacillus* spp. é o MRS (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960). No presente trabalho, foi demonstrado que o meio LAPTg também pode ser aplicado para a cultura de *Lactobacillus* spp. sem prejuízo ao seu crescimento. Em sua composição, além da peptona proteose, fonte de elementos nutricionais para *Lactobacillus* spp., o MRS possui extrato de levedura, que contém vitaminas e aminoácidos que são elementos-chave no metabolismo de *Lactobacillus* spp. (DE MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960). O meio LAPTg conta com uma formulação mais simples do que o MRS, tornando-o mais acessível ao preparo. Contudo, apesar de conter menos componentes em sua formulação, possui concentrações semelhantes de compostos em comum (peptona, extrato de levedura, glicose) (PAVLOVA *et al.*, 1983), demonstrando sua composição equivalente e, com base nos dados obtidos, aplicação para a cultura de *Lactobacillus* spp. Ambos os meios também têm preparo a pH semelhante (entre 6,2 e 6,5). Considerando os fatores acima mencionado, o preparo de LAPTg é simplificado em metodologia e tempo de preparo, quando preparado *in-house*, além de ser econômico em relação ao MRS.

De acordo com a leitura da  $DO_{540}$  de *L. crispatus* e *L. gasseri* em LAPTg e LAPT, houve maior crescimento bacteriano no meio acrescido de glicose. Também é importante considerar que dados de pH mostraram uma maior acidificação após crescimento em LAPTg em relação a LAPT. Desta forma, é possível atestar que há maior crescimento bacteriano em meio de cultura formulado com glicose. Este fato pode ser relacionado à formação de ácido láctico que é realizada durante a fermentação deste açúcar (TACHEDJIAN *et al.*, 2017). Quanto à formulação dos meios utilizados, LAPTg possui 1% do açúcar, a metade em comparação ao MRS, que contém 2%.

O trabalho de Yoshimura; Ogawa e Saito (2020) avaliou características *in vitro* de cepas de *Lactobacillus* spp. vaginais, incluindo *L. gasseri* e *L. crispatus*. Baseando-se em dados de  $DO_{660}$ , foram geradas curvas de crescimento das espécies analisadas. Quando avaliado o crescimento em meio MRS preparado em pH 6,0, houve crescimento acelerado com 3 h de incubação e a fase estacionária começou

em cerca de 12 h (YOSHIMURA; OGAWA; SAITO, 2020). No presente trabalho, a fase estacionária do crescimento foi observada entre 12 h e 24 h. Yoshimura; Ogawa e Saito (2020) também demonstraram que as espécies de lactobacilos diminuíram o pH do meio até pH por volta de 3,0 (YOSHIMURA; OGAWA; SAITO, 2020); na presente análise, o menor pH observado por meio das fitas de pH foi 3,6 (limite de leitura da fita de pH utilizada), e a acidificação mais acentuada aconteceu a partir das 12 h de incubação.

A curva de crescimento de *L. crispatus* e *L. gasseri* foi obtida com sucesso ao se basear apenas nas medidas de DO<sub>540</sub> e aferição de pH; o mesmo não aconteceu utilizando-se os dados de contagem de UFC em placa com meio sólido. O método de contagem de UFC em placa é amplamente utilizado para diferentes finalidades, mas quando aplicado a *Lactobacillus* spp. de importância vaginal não foi concordante às análises de DO<sub>540</sub> e pH; desta forma, este método não foi considerado adequado à obtenção da curva de crescimento. Isso pode ser justificado devido ao metabolismo fermentativo de *Lactobacillus* spp., que reduzem o pH acentuadamente (O'HANLON *et al.*, 2013), fator que pode interferir na recuperação das colônias em meio sólido.

Ainda assim, houve crescimento de *Lactobacillus* spp. em LAPT mesmo na ausência de glicose. Yu *et al.* (2018) realizaram uma análise integrativa genômica e proteômica da resposta de *Lactobacillus casei* à restrição de glicose. As proteínas avaliadas foram induzidas pela depleção de glicose a se expressarem diferentemente em relação a quando a glicose está presente (YU *et al.*, 2018). Em sua maioria, estas proteínas estavam relacionadas ao metabolismo de frutose e manose, processos metabólicos de carboidratos, atividade de liase e atividade ATPase de transporte de aminoácidos (YU *et al.*, 2018). A realização de análises genômicas e proteômicas para *L. crispatus* e *L. gasseri* cultivados em LAPT permitirá avaliar quais rotas metabólicas foram utilizadas pelas bactérias durante seu crescimento. Também tornará possível indicar quais fontes alternativas de açúcar serão utilizadas pelas células.

O estudo de Yoshimura; Ogawa e Saito (2020) também avaliou o efeito de alterações do pH do meio sobre o crescimento de cepas de *Lactobacillus* spp. Ao comparar o crescimento em MRS a pH 3,0 e 6,0, no primeiro as bactérias cresceram em ordem 1/100 em relação ao segundo (YOSHIMURA; OGAWA; SAITO, 2020). Considerando o pH vaginal varia em torno de 3,4 e 4,5 (BOSKEY *et al.*, 2001), a demonstração da redução do pH do meio induzida pelo metabolismo de *Lactobacillus* spp., e os achados de Yoshimura; Ogawa e Saito (2020), para investigar se a

alteração do pH tem influência sobre a contagem de UFC, foi realizado o experimento de acidificação do meio sólido. Foi suposto que, após o crescimento em caldo e acidificação deste meio (pH em 24 h próximo a 3,6 em LAPTg), o plaqueamento em meio sólido com pH 5,5 poderia favorecer o crescimento das cepas, devido à maior proximidade dos valores de pH entre as formas de caldo e ágar. Contudo, não foi observada diferença no número de colônias recuperadas, possibilitando concluir que a diminuição do pH de 6,5 para pH 5,5 não é efetiva para viabilizar a quantificação de *Lactobacillus* spp. por meio da contagem de UFC em placa.

## 6 CONCLUSÃO

O uso de LAPTg com glicose adicionada leva a uma maior acidificação do meio e a um maior crescimento de *L. crispatus* e *L. gasseri*, sugerindo a preferência pelo uso de meios que contenham glicose em sua composição para a recuperação destas espécies. O método de contagem de UFC não foi considerado adequado para o fim de quantificação de *Lactobacillus* spp., fazendo com que leitura de DO<sub>540</sub> e aferição de pH sejam métodos preferíveis. A cultura de *L. crispatus* e *L. gasseri* em meios com o pH reduzido em relação à preparação original não interferiu no crescimento das cepas; contudo, a testagem do crescimento em meios com pH inferior a 5,5 pode ser explorada. Análises de proteômica e genômica também são relevantes de serem aplicadas para melhor compreensão do metabolismo de *Lactobacillus* spp. e para a sua quantificação.

## REFERÊNCIAS

- ABBE, C.; MITCHELL, C. M. Bacterial vaginosis: a review of approaches to treatment and prevention. **Frontiers in Reproductive Health**, v. 5, 2023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10264601/>>.
- ALONZO MARTÍNEZ, M. C.; CAZORLA, E.; CÁNOVAS, E.; *et al.* Study of the Vaginal Microbiota in Healthy Women of Reproductive Age. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, p. 1069, 2021.
- AMABEBE, E.; ANUMBA, D. O. C. The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of Lactobacilli. **Frontiers in Medicine**, v. 5, n. 181, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2018.00181/full>>.
- ANDERSON, D. J.; MARATHE, J.; PUDNEY, J. The Structure of the Human Vaginal Stratum Corneum and its Role in Immune Defense. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 71, n. 6, p. 618–623, 2014. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/aji.12230>>.
- ANTON, L.; SIERRA, L.-J.; DEVINE, A.; *et al.* Common Cervicovaginal Microbial Supernatants Alter Cervical Epithelial Function: Mechanisms by Which *Lactobacillus crispatus* Contributes to Cervical Health. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2018. Frontiers Media.
- ANTONIO, MAY A. D.; HAWES, STEPHEN E.; HILLIER, SHARON L. The Identification of Vaginal *Lactobacillus* Species and the Demographic and Microbiologic Characteristics of Women Colonized by These Species. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 6, p. 1950–1956, 1999. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jid/article/180/6/1950/871356>>.
- ARECHAVALA, A.; NEGRONI, R.; SANTISO, G.; DEPARDO, R.; BONVEHÍ, P. Chronic recurrent vulvovaginitis is not only due to *Candida*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 38, n. 3, p. 132–137, 2021. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1130140621000243>>.
- ASLIM, B.; KILIC, E. Some Probiotic Properties of Vaginal *Lactobacilli* Isolated from Healthy Women. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 59, n. 4, p. 249–253, 2006. National Institute of Infectious Diseases.
- AXELSSON, L. T. Lactic acid bacteria: classification and physiology. p. 1–63, 1993.
- BAUTERS, T. G. M.; DHONT, M. A.; TEMMERMAN, M. I. L.; NELIS, H. J. Prevalence of vulvovaginal candidiasis and susceptibility to fluconazole in women. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 187, n. 3, p. 569–574, 2002.
- BERTRAND, R. L. Lag Phase Is a Dynamic, Organized, Adaptive, and Evolvable Period That Prepares Bacteria for Cell Division. **Journal of Bacteriology**, v. 201, n. 7, 2019.

BORIS, S.; SUÁREZ, J.; BARBÉS, C. Characterization of the aggregation promoting factor from *Lactobacillus gasseri*, a vaginal isolate. **J Appl Microbiol**, v. 83, n. 4, p. 413–420, 1997.

BOSKEY, E. R.; CONE, R. A.; WHALEY, K. J.; MOENCH, T. R. Origins of vaginal acidity: high d/l lactate ratio is consistent with bacteria being the primary source. **Human Reproduction**, v. 16, n. 9, p. 1809–1813, 2001.

BOSKEY, E. R.; TELSCH, K. M.; WHALEY, K. J.; MOENCH, T. R.; CONE, R. A. Acid Production by Vaginal Flora In Vitro Is Consistent with the Rate and Extent of Vaginal Acidification. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 10, p. 5170–5175, 1999.

BRADSHAW, C. S.; TABRIZI, S. N.; FAIRLEY, C. K.; *et al.* The Association of Atopobium vaginae and Gardnerella vaginalis with Bacterial Vaginosis and Recurrence after Oral Metronidazole Therapy. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 194, n. 6, p. 828–836, 2006.

BRADSHAW, CATRIONA S.; MORTON, ANNA N.; HOCKING, J.; *et al.* High Recurrence Rates of Bacterial Vaginosis over the Course of 12 Months after Oral Metronidazole Therapy and Factors Associated with Recurrence. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 11, p. 1478–1486, 2006.

BRESHEARS, L. M.; EDWARDS, V. L.; RAVEL, J.; PETERSON, M. L. Lactobacillus crispatus inhibits growth of Gardnerella vaginalis and Neisseria gonorrhoeae on a porcine vaginal mucosa model. **BMC Microbiology**, v. 15, n. 1, 2015.

BRIGGS, M. An improved medium for lactobacilli. **Journal of Dairy Research**, v. 20, n. 1, p. 36–40, 1953.

BROTMAN, R. M.; SHARDELL, M. D.; GAJER, P.; *et al.* Interplay Between the Temporal Dynamics of the Vaginal Microbiota and Human Papillomavirus Detection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 11, p. 1723–1733, 2014.

BRUNHAM, R. C.; GOTTLIEB, S. L.; PAAVONEN, J. Pelvic Inflammatory Disease. (E. W. Campion, Org.) **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 21, p. 2039–2048, 2015.

CASTRO, J.; CERCA, N. BV and non-BV associated Gardnerella vaginalis establish similar synergistic interactions with other BV-associated microorganisms in dual-species biofilms. **Anaerobe**, v. 36, p. 56–59, 2015.

CECCARANI, C.; FOSCHI, C.; PAROLIN, C.; *et al.* Diversity of vaginal microbiome and metabolome during genital infections. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 14095, 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-019-50410-x>>.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2015. Estados Unidos da América, 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Sexually Transmitted Diseases Treatment Guidelines, 2021. Estados Unidos da América, 2021.

CHAN, R. C. Y.; BRUCE, A. W.; REID, G. 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. **Journal of Urology**, v. 131, n. 3, p. 596–601, 1984.

CHANG, C. E.; KIM, S.-C.; SO, J.-S.; YUN, H. S. Cultivation of *Lactobacillus crispatus* KLB46 isolated from human vagina. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 6, n. 2, p. 128–132, 2001.

CHEN, Y.; QIU, X.; WANG, W.; *et al.* Human papillomavirus infection and cervical intraepithelial neoplasia progression are associated with increased vaginal microbiome diversity in a Chinese cohort. **BMC Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, 2020.

COOK, R. L.; REDONDO-LOPEZ, V.; SCHMITT, C.; MERIWETHER, C.; SOBEL, J. D. Clinical, microbiological, and biochemical factors in recurrent bacterial vaginosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 870–877, 1992.

COSTELLO, E. K.; LAUBER, C. L.; HAMADY, M.; *et al.* Bacterial community variation in human body habitats across space and time. **Science (New York, N.Y.)**, v. 326, n. 5960, p. 1694–7, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19892944>>.

COX, P.; BRIGGS, M. EXPERIMENTS ON GROWTH MEDIA FOR LACTOBACILLI. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 17, n. 1, p. 18–26, 1954.

DAVANI-DAVARI, D.; NEGAHDARIPOUR, M.; KARIMZADEH, I.; *et al.* Prebiotics: Definition, Types, Sources, Mechanisms, and Clinical Applications. **Foods**, v. 8, n. 3, p. 92, 2019.

DE BACKER, E.; VERHELST, R.; VERSTRAELEN, H.; *et al.* Quantitative determination by real-time PCR of four vaginal *Lactobacillus* species, *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* indicates an inverse relationship between *L. gasseri* and *L. iners*. **BMC Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 115, 2007.

DE GREGORIO, P. R.; TOMÁS, M. S. J.; TERRAF, M. C. L.; NADER-MACÍAS, M. E. F. In vitro and in vivo effects of beneficial vaginal lactobacilli on pathogens responsible for urogenital tract infections. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 685–696, 2014.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A MEDIUM FOR THE CULTIVATION OF LACTOBACILLI. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, n. 1, p. 130–135, 1960.

DE SETA, F.; CAMPISCIANO, G.; ZANOTTA, N.; RICCI, G.; COMAR, M. The Vaginal Community State Types Microbiome-Immune Network as Key Factor for Bacterial Vaginosis and Aerobic Vaginitis. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

DENG, B.; SULLIVAN, M. A.; CHEN, C.; *et al.* Molecular Structure of Human-Liver Glycogen. (A. Caporali, Org.) **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0150540, 2016. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4775040/#pone.0150540.ref011>>.

DONDERS, G. G. G.; BELLEN, G.; GRINCEVICIENE, S.; RUBAN, K.; VIEIRA-BAPTISTA, P. Aerobic vaginitis: no longer a stranger. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 9-10, p. 845–858, 2017.

DONDERS, G. G. G. Definition and classification of abnormal vaginal flora. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 21, n. 3, p. 355–373, 2007.

DONDERS, G. G. G.; VEREECKEN, A.; BOSMANS, E.; *et al.* Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 109, n. 1, p. 34–43, 2002.

DONDERS, G.; VAN CALSTEREN, K.; BELLEN, G.; *et al.* Predictive value for preterm birth of abnormal vaginal flora, bacterial vaginosis and aerobic vaginitis during the first trimester of pregnancy. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 116, n. 10, p. 1315–1324, 2009.

FALSEN, E.; PASCUAL, C.; SJODEN, B.; OHLEN, M.; COLLINS, M. D. Phenotypic and phylogenetic characterization of a novel *Lactobacillus* species from human sources: description of *Lactobacillus iners* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, n. 1, p. 217–221, 1999.

FARAGE, M. A.; MILLER, K. W.; SOBEL, J. D. Dynamics of the Vaginal Ecosystem—Hormonal Influences. **Infectious Diseases: Research and Treatment**, v. 3, p. IDRT.S3903, 2010.

FARAGE, M.; MAIBACH, H. Lifetime changes in the vulva and vagina. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 273, n. 4, p. 195–202, 2005.

FAUGHT, B. M.; REYES, S. Characterization and Treatment of Recurrent Bacterial Vaginosis. **Journal of Women's Health**, v. 28, n. 9, p. 1218–1226, 2019.

FRANCE, M. T.; MENDES-SOARES, H.; FORNEY, L. J. Genomic Comparisons of *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus iners* Reveal Potential Ecological Drivers of Community Composition in the Vagina. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 24, p. 7063–7073, 2016. Disponível em:  
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5118917/#:~:text=iners%20has%20a%20most%20exclusively%20been>>.

FREDRICKS, D. N.; FIEDLER, T. L.; MARRAZZO, J. M. Molecular Identification of Bacteria Associated with Bacterial Vaginosis. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 18, p. 1899–1911, 2005.



FUOCHI, V.; CARDILE, V.; GIULIO PETRONIO PETRONIO; PIO MARIA FURNERI. Biological properties and production of bacteriocins-like-inhibitory substances by *Lactobacillus* sp. strains from human vagina. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 5, p. 1541–1550, 2019. Oxford University Press.

GAJER, P.; BROTMAN, R. M.; BAI, G.; *et al.* Temporal Dynamics of the Human Vaginal Microbiota. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 132, p. 132ra52–132ra52, 2012.

GÄNZLE, M. G. Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 106–117, 2015.

GIORDANI, B.; ABRUZZO, A.; PAROLIN, C.; *et al.* Prebiotic Activity of Vaginal Lactobacilli on Bifidobacteria: from Concept to Formulation. (P. Albuquerque, Org.) **Microbiology Spectrum**, 2023.

GRAVER, M. A.; WADE, J. J. The role of acidification in the inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by vaginal lactobacilli during anaerobic growth. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 10, n. 1, p. 8, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186%2F1476-0711-10-8>>.

HAY, P. Bacterial vaginosis. **F1000Research**, v. 6, p. 1761, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5621139/pdf/f1000research-6-12327.pdf>>.

HAYEK, S. A.; GYAWALI, R.; ALJALOUD, S. O.; KRASTANOV, A.; IBRAHIM, S. A. Cultivation media for lactic acid bacteria used in dairy products. **Journal of Dairy Research**, v. 86, n. 4, p. 490–502, 2019.

HICKEY, R. J.; ZHOU, X.; PIERSON, J. D.; RAVEL, J.; FORNEY, L. J. Understanding vaginal microbiome complexity from an ecological perspective. **Translational Research**, v. 160, n. 4, p. 267–282, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3444549/>>.

HOLZAPFEL, W. H.; WOOD, B. J. B. **Lactic Acid Bacteria**. John Wiley & Sons, 2014.

HUMMELEN, R.; FERNANDES, A. D.; MACKLAIM, J. M.; *et al.* Deep Sequencing of the Vaginal Microbiota of Women with HIV. (S. Bereswill, Org.) **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, p. e12078, 2010.

HYNÖNEN, U.; PALVA, A. Lactobacillus surface layer proteins: structure, function and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, n. 12, p. 5225–5243, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3666127/>>.

IBRAHIM, S. A. Lactic Acid Bacteria: Lactobacillus spp.: Other Species. **Reference Module in Food Science**, 2016.

- JUNG, H.-S.; EHLERS, M. M.; LOMBAARD, H.; REDELINGHUYNS, M. J.; KOCK, M. M. Etiology of bacterial vaginosis and polymicrobial biofilm formation. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 651–667, 2017. Disponível em: <[https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/62287/Jung\\_Etiology\\_2017.pdf](https://repository.up.ac.za/bitstream/handle/2263/62287/Jung_Etiology_2017.pdf)>.
- KAUR, H.; MERCHANT, M.; HAQUE, M. M.; MANDE, S. S. Crosstalk Between Female Gonadal Hormones and Vaginal Microbiota Across Various Phases of Women's Gynecological Lifecycle. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.
- KHEDKAR, R.; PAJAI, S. Bacterial Vaginosis: A Comprehensive Narrative on the Etiology, Clinical Features, and Management Approach. **Cureus**, v. 14, n. 11, 2022.
- KOVACHEV, S. M. Obstetric and Gynecological Diseases and Complications Resulting from Vaginal Dysbacteriosis. **Microbial Ecology**, v. 68, n. 2, p. 173–184, 2014.
- KUEBRICH, C. T. Chronic Vulvovaginal Candidiasis. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 24, p. 2554–2556, 2004.
- LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 171–184, 2010. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrmicro2297>>.
- LING, Z.; LIU, X.; CHEN, W.; *et al.* The Restoration of the Vaginal Microbiota After Treatment for Bacterial Vaginosis with Metronidazole or Probiotics. **Microbial Ecology**, v. 65, n. 3, p. 773–780, 2012. Acesso em: 9/8/2020.
- MA, Y.; LI, Y.; LIU, Y.; *et al.* Vaginal Microbiome Dysbiosis is Associated with the Different Cervical Disease Status. **Journal of microbiology**, v. 61, n. 4, p. 423–432, 2023. Springer Science+Business Media. Acesso em: 24/7/2024.
- MACKLAIM, J. M.; GLOOR, G. B.; ANUKAM, K. C.; CRIBBY, S.; REID, G. At the crossroads of vaginal health and disease, the genome sequence of *Lactobacillus iners* AB-1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. supplement\_1, p. 4688–4695, 2010.
- MARCONI, C.; EL-ZEIN, M.; RAVEL, J.; *et al.* Characterization of the vaginal microbiome in women of reproductive age from five regions in Brazil. **Sexually Transmitted Diseases**, v. Publish Ahead of Print, 2020.
- MARTÍN, R.; SUÁREZ, J. E. Biosynthesis and Degradation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by Vaginal Lactobacilli. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 2, p. 400–405, 2010. American Society for Microbiology.
- MASFARI, A. N.; DUERDEN, B. I.; KINGHORN, G. R. Quantitative studies of vaginal bacteria. **Sexually Transmitted Infections**, v. 62, n. 4, p. 256–263, 1986.
- MATHÉ, L.; VAN DIJCK, P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. **Current Genetics**, v. 59, n. 4, p. 251–264, 2013.

MATU, M. N.; ORINDA, G. O.; NJAGI, E. N. M.; COHEN, C. R.; BUKUSI, E. A. In vitro inhibitory activity of human vaginal lactobacilli against pathogenic bacteria associated with bacterial vaginosis in Kenyan women. **Anaerobe**, v. 16, n. 3, p. 210–215, 2010.

MEAD, P. B. Epidemiology of bacterial vaginosis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 169, n. 2, p. 446–449, 1993.

MEJIA-GOMEZ, C. E.; BALCÁZAR, N. Isolation, characterisation and continuous culture of *Lactobacillus* spp. and its potential use for lactic acid production from whey. **Food Science and Technology**, v. 40, n. 4, 2020.

MITRA, A.; GULTEKIN, M.; BURNEY ELLIS, L.; *et al.* Genital tract microbiota composition profiles and use of prebiotics and probiotics in gynaecological cancer prevention: review of the current evidence, the European Society of Gynaecological Oncology prevention committee statement. **The Lancet. Microbe**, p. S2666-5247(23)002574, 2024. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38141634/>>.

MUZNY, C. A.; BLANCHARD, E.; TAYLOR, C. M.; *et al.* Identification of Key Bacteria Involved in the Induction of Incident Bacterial Vaginosis: A Prospective Study. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 218, n. 6, p. 966–978, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29718358/>>.

MUZNY, C. A.; ŁANIEWSKI, P.; SCHWEBKE, J. R.; HERBST-KRALOVETZ, M. M. Host–vaginal microbiota interactions in the pathogenesis of bacterial vaginosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 33, n. 1, p. 59–65, 2020.

MUZNY, C. A.; SCHWEBKE, J. R. Biofilms: An Underappreciated Mechanism of Treatment Failure and Recurrence in Vaginal Infections: Table 1. **Clin. Infect. Dis.**, v. 61, n. 4, p. 601–606, 2015.

MUZNY, C. A.; TAYLOR, C. M.; SWORDS, W. E.; *et al.* An Updated Conceptual Model on the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 220, n. 9, p. 1399–1405, 2019.

NARDINI, P.; ÑAHUI PALOMINO, R. A.; PAROLIN, C.; *et al.* *Lactobacillus crispatus* inhibits the infectivity of *Chlamydia trachomatis* elementary bodies, in vitro study. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016.

NEAL, C. M.; KUS, L. H.; ECKERT, L. O.; PEIPERT, J. F. Noncandidal vaginitis: a comprehensive approach to diagnosis and management. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 222, n. 2, p. 114–122, 2020.

NIU, X.-X.; LI, T.; ZHANG, X.; WANG, S.-X.; LIU, Z.-H. *Lactobacillus crispatus* Modulates Vaginal Epithelial Cell Innate Response to *Candida albicans*. **Chinese Medical Journal**, v. 130, n. 3, p. 273–279, 2017.

NOVAK, J.; RAVEL, J.; MA, B.; *et al.* Characteristics associated with *Lactobacillus iners*-dominated vaginal microbiota. **Sexually Transmitted Infections**, v. 98, n. 5, p. 353–359, 2021. BMJ.

NUGENT, R. P.; KROHN, M. A.; HILLIER, S. L. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 297–301, 1991.

O'HANLON, D. E.; MOENCH, T. R.; CONE, R. A. Vaginal pH and Microbicidal Lactic Acid When Lactobacilli Dominate the Microbiota. (A. Landay, Org.) **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e80074, 2013. Disponible em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3819307/>>.

OCAÑA, V.; SILVA, C.; NADER-MACÍAS, M. E. Antibiotic Susceptibility of Potentially Probiotic Vaginal Lactobacilli. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 2006, p. 1–6, 2006.

OLIVER, A.; LAMERE, B.; WEIHE, C.; *et al.* Cervicovaginal Microbiome Composition Is Associated with Metabolic Profiles in Healthy Pregnancy. (M. J. Blaser, Org.) **mBio**, v. 11, n. 4, 2020.

ORTEGA-PEÑA, S.; HERNÁNDEZ-ZAMORA, E. Biopelículas microbianas y su impacto en áreas médicas: fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. **Boletín Médico del Hospital Infantil de México**, v. 75, n. 2, 2019. Disponible em: <<http://www.scielo.org.mx/pdf/bmim/v75n2/1665-1146-bmim-75-02-79.pdf>>.

PAGAR, R.; DESHKAR, S.; MAHORE, J.; *et al.* The Microbial Revolution: Unveiling the Benefits of Vaginal Probiotics and Prebiotics. **Microbiological Research**, v. 286, p. 127787, 2024. Disponible em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944501324001885>>.

PALLIN, A.; AGBACK, P.; JONSSON, H.; ROOS, S. Evaluation of growth, metabolism and production of potentially bioactive components during fermentation of barley with *Lactobacillus reuteri*. **Food Microbiology**, v. 57, p. 159–171, 2016.

PANJIAR, N.; MISHRA, S.; YADAV, A. N.; VERMA, P. Functional Foods from Cyanobacteria. **Microbial Functional Foods and Nutraceuticals**, p. 21–37, 2017.

PARVEZ, S.; MALIK, K. A.; AH KANG, S.; KIM, H.-Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 6, p. 1171–1185, 2006.

PAVLOVA, S. I.; MITEVA, V. I.; MIHAILOVA, L. I.; RADOEVSKA, S. A.; TZONA TZ. STEFANOVA. Effect of medium composition on the ultrastructure of *Lactobacillus* strains. **Archives of microbiology**, v. 160, n. 2, p. 132–136, 1993. Springer Science+Business Media.

PEEBLES, K.; VELLOZA, J.; BALKUS, J. E.; MCCLELLAND, R. S.; BARNABAS, R. V. High Global Burden and Costs of Bacterial Vaginosis. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 46, n. 5, p. 304–311, 2019b.

PETROVA, M. I.; LIEVENS, E.; MALIK, S.; IMHOLZ, N.; LEBEER, S. Lactobacillus species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. **Frontiers in Physiology**, v. 6, 2015.

PETROVA, M. I.; REID, G.; VANEECHOUTTE, M.; LEBEER, S. Lactobacillus iners: Friend or Foe? **Trends in Microbiology**, v. 25, n. 3, p. 182–191, 2017.

PHUKAN, N.; BROOKS, A. E. S.; SIMOES-BARBOSA, A. A Cell Surface Aggregation-Promoting Factor from Lactobacillus gasseri Contributes to Inhibition of Trichomonas vaginalis Adhesion to Human Vaginal Ectocervical Cells. **Infection and Immunity**, v. 86, n. 8, p. e00907-17, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29784856/>>.

PIROTTA, M.; FETHERS, K. A.; BRADSHAW, C. S. Bacterial vaginosis - More questions than answers. **PubMed**, v. 38, n. 6, p. 394–7, 2009. National Institutes of Health.

RANA, A.; TANEJA, N. K.; RAPOSO, A.; *et al.* Exploring prebiotic properties and its probiotic potential of new formulations of soy milk-derived beverages. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, 2024. Frontiers Media.

RAVEL, J.; BROTMAN, R. M. Translating the vaginal microbiome: gaps and challenges. **Genome Medicine**, v. 8, n. 1, 2016. Acesso em: 28/12/2020.

RAVEL, J.; GAJER, P.; ABDO, Z.; *et al.* Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. Supplement\_1, p. 4680–4687, 2010. Disponível em: <<https://europepmc.org/backend/ptpmcrender.fcgi?accid=PMC3063603&blobtype=pdf>>.

REID, G.; COOK, R. L.; BRUCE, A. W. Examination of Strains of Lactobacilli for Properties that May Influence Bacterial Interference in the Urinary Tract. **Journal of Urology**, v. 138, n. 2, p. 330–335, 1987.

REITER, S.; KELLOGG SPADT, S. Bacterial vaginosis: a primer for clinicians. **Postgraduate Medicine**, v. 131, n. 1, p. 8–18, 2018.

ROBINSON, L. S.; SCHWEBKE, J.; LEWIS, W. G.; LEWIS, A. L. Identification and characterization of NanH2 and NanH3, enzymes responsible for sialidase activity in the vaginal bacterium Gardnerella vaginalis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 14, p. 5230–5245, 2019.

RODRÍGUEZ-PASTÉN, A.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, N.; AÑORVE-MORGA, J.; *et al.* The Activity of Prebiotics and Probiotics in Hepatogastrointestinal Disorders and Diseases Associated with Metabolic Syndrome. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 13, p. 7229, 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1422-0067/23/13/7229>>.

ROSCA, A. S.; CASTRO, J.; CERCA, N. Evaluation of different culture media to support in vitro growth and biofilm formation of bacterial vaginosis-associated anaerobes. **PeerJ**, v. 8, p. e9917, 2020.

ROUSSEAU, V.; LEPARGNEUR, J. P.; ROQUES, C.; REMAUD-SIMEON, M.; PAUL, F. Prebiotic effects of oligosaccharides on selected vaginal lactobacilli and pathogenic microorganisms. **Anaerobe**, v. 11, n. 3, p. 145–153, 2005.

SAITO, K.; TOMITA, S.; NAKAMURA, T. Aggregation of *Lactobacillus brevis* associated with decrease in pH by glucose fermentation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 83, n. 8, p. 1523–1529, 2019.

SANTIAGO, G. L. DOS S.; TENCY, I.; VERSTRAELEN, H.; *et al.* Longitudinal qPCR Study of the Dynamics of *L. crispatus*, *L. iners*, *A. vaginae*, (Sialidase Positive) *G. vaginalis*, and *P. bivia* in the Vagina. (P. M. Schlievert, Org.) **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. e45281, 2012.

SATINSKY, S.; REECE, M.; DENNIS, B.; SANDERS, S.; BARDZELL, S. An assessment of body appreciation and its relationship to sexual function in women. **Body Image**, v. 9, n. 1, p. 137–144, 2012.

SAUER, M.; RUSSMAYER, H.; GRABHERR, R.; PETERBAUER, C. K.; MARX, H. The Efficient Clade: Lactic Acid Bacteria for Industrial Chemical Production. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 8, p. 756–769, 2017. Disponível em: <[https://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799\(17\)30106-3?\\_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0167779917301063%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/biotechnology/fulltext/S0167-7799(17)30106-3?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0167779917301063%3Fshowall%3Dtrue)>.

SCHWEBKE, J. R.; DESMOND, R. Risk Factors for Bacterial Vaginosis in Women at High Risk for Sexually Transmitted Diseases. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 32, n. 11, p. 654–658, 2005.

SENGUPTA, R.; ALTERMANN, E.; ANDERSON, R. C.; *et al.* The Role of Cell Surface Architecture of Lactobacilli in Host-Microbe Interactions in the Gastrointestinal Tract. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 1–16, 2013.

SENOK, A. C.; VERSTRAELEN, H.; TEMMERMAN, M.; BOTTA, G. A. Probiotics for the treatment of bacterial vaginosis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2009.

ŠERTOVIĆ, E.; SARIĆ, Z.; BARAĆ, M.; *et al.* Physical, Chemical, Microbiological and Sensory Characteristics of a Probiotic Beverage Produced from Different Mixtures of Cow's Milk and Soy Beverage by *Lactobacillus acidophilus* La5 and Yoghurt Culture. **Food technology and biotechnology**, v. 57, n. 4, p. 461–467, 2019.

ŚLIŻEWSKA, K.; CHLEBICZ-WÓJCIK, A. Growth Kinetics of Probiotic *Lactobacillus* Strains in the Alternative, Cost-Efficient Semi-Solid Fermentation Medium. **Biology**, v. 9, n. 12, p. E423, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33260858/>>.

SOBEL, J. D. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 152, n. 7 Pt 2, p. 924–935, 1985. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3895958>>.

SOBEL, J. D.; VEMPATI, Y. S. Bacterial Vaginosis and Vulvovaginal Candidiasis Pathophysiologic Interrelationship. **Microorganisms**, v. 12, n. 1, p. 108, 2024. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2627096>>.

SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 223–229, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3711980/>>.

SOUSA, V.; PEREIRA, S. A.; N. CERCA. Fighting polymicrobial biofilms in bacterial vaginosis. **Microbial biotechnology**, v. 16, n. 7, p. 1423–1437, 2023. Wiley.

STEWART, P. S.; WILLIAM COSTERTON, J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. **The Lancet**, v. 358, n. 9276, p. 135–138, 2001.

SWIDSINSKI, A.; LOENING-BAUCKE, V.; MENDLING, W.; *et al.* Infection through structured polymicrobial Gardnerella biofilms (StPM-GB). **Histology and Histopathology**, v. 29, n. 5, p. 567–587, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24327088/>>.

SWIDSINSKI, A.; MENDLING, W.; LOENING-BAUCKE, V.; *et al.* Adherent Biofilms in Bacterial Vaginosis. **Obstetrics & Gynecology**, v. 106, n. 5, Part 1, p. 1013–1023, 2005. Acesso em: 17/9/2019.

TACHEDJIAN, G.; ALDUNATE, M.; BRADSHAW, C. S.; CONE, R. A. The role of lactic acid production by probiotic Lactobacillus species in vaginal health. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 9-10, p. 782–792, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250817300839>>.

TEMPERA, G.; ABBADESSA, G.; BONFIGLIO, G.; *et al.* Topical kanamycin: an effective therapeutic option in aerobic vaginitis. **Journal of Chemotherapy (Florence, Italy)**, v. 18, n. 4, p. 409–414, 2006. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17024797/>>.

TEMPERA, G.; FURNERI, P. M. Management of Aerobic Vaginitis. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 70, n. 4, p. 244–249, 2010.

TEMPERA, G.; FURNERI, P. M.; CIANCI, A.; *et al.* The Impact of Prulifloxacin on Vaginal Lactobacillus Microflora: An *In Vivo* Study. **Journal of chemotherapy**, v. 21, n. 6, p. 646–650, 2009. Taylor & Francis.

THOMAS, S. Doderlein's Bacillus: Lactobacillus Acidophilus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 43, n. 3, p. 218–227, 1928.

TOMÁS, M. S. J.; BRU, E.; NADER-MACÍAS, M. E. Comparison of the growth and hydrogen peroxide production by vaginal probiotic lactobacilli under different culture

conditions. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 188, n. 1, p. 35–44, 2003.

VÉLEZ, M. P.; DE KEERSMAECKER, S. C. J.; VANDERLEYDEN, J. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. **FEMS Microbiology Letters**, v. 276, n. 2, p. 140–148, 2007.

VERHELST, R.; VERSTRAELEN, H.; CLAEYS, G.; *et al.* Comparison between Gram stain and culture for the characterization of vaginal microflora: definition of a distinct grade that resembles grade I microflora and revised categorization of grade I microflora. **BMC Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 61, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1266370/>>. Acesso em: 20/6/2019.

VERSTRAELEN, H.; SWIDSINSKI, A. The biofilm in bacterial vaginosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 32, n. 1, p. 38–42, 2019.

VERSTRAELEN, H.; VERHELST, R.; CLAEYS, G.; *et al.* Longitudinal analysis of the vaginal microflora in pregnancy suggests that *L. crispatus* promotes the stability of the normal vaginal microflora and that *L. gasseri* and/or *L. iners* are more conducive to the occurrence of abnormal vaginal microflora. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 1, p. 116, 2009.

VIELFORT, K.; SJÖLINDER, H.; ROOS, S.; JONSSON, H.; ARO, H. Adherence of clinically isolated lactobacilli to human cervical cells in competition with *Neisseria gonorrhoeae*. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 12-13, p. 1325–1334, 2008.

VUJIC, G.; JAJAC KNEZ, A.; DESPOT STEFANOVIĆ, V.; KUZMIĆ VRBANOVIĆ, V. Efficacy of orally applied probiotic capsules for bacterial vaginosis and other vaginal infections: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 168, n. 1, p. 75–79, 2013.

WANG, T.; LU, Y.; YAN, H.; *et al.* Fermentation optimization and kinetic model for high cell density culture of a probiotic microorganism: *Lactobacillus rhamnosus* LS-8. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 3, p. 515–528, 2019.

WU, C.; HUANG, J.; ZHOU, R. Progress in engineering acid stress resistance of lactic acid bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, n. 3, p. 1055–1063, 2013.

YADAV, A. N.; KOUR, D.; RANA, K. L.; *et al.* Metabolic Engineering to Synthetic Biology of Secondary Metabolites Production. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, p. 279–320, 2019.

YOSHIMURA, K.; OGAWA, M.; SAITO, M. In vitro characteristics of intravaginal *Lactobacilli*; why is *L. iners* detected in abnormal vaginal microbial flora? **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 302, n. 3, p. 671–677, 2020.



YU, J.; HUI, W.; CAO, C.; *et al.* Integrative Genomic and Proteomic Analysis of the Response of *Lactobacillus casei* Zhang to Glucose Restriction. **Journal of proteome research**, v. 17, n. 3, p. 1290–1299, 2018. American Chemical Society.

ZOTTA, T.; PARENTE, E.; RICCIARDI, A. Aerobic metabolism in the genus *Lactobacillus*: impact on stress response and potential applications in the food industry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 857–869, 2017.

ŽUNAR, B.; TRONTEL, A.; MIKLENIĆ, M. S.; *et al.* Metabolically engineered *Lactobacillus gasseri* JCM 1131 as a novel producer of optically pure L- and D-lactate. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 36, n. 8, 2020. Springer Science+Business Media.