

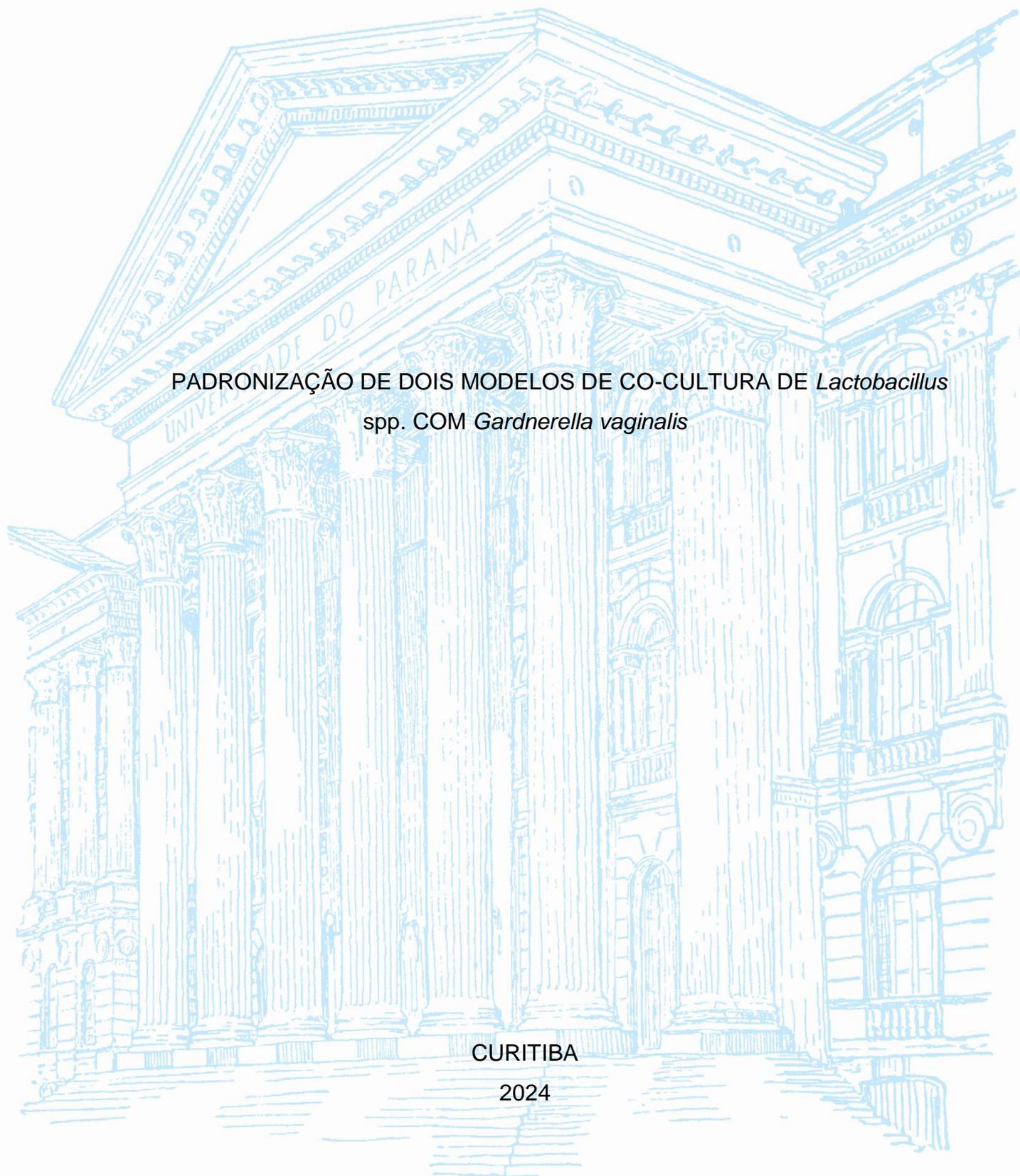
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOÃO VICTOR DE SOUZA DA ROSA

PADRONIZAÇÃO DE DOIS MODELOS DE CO-CULTURA DE *Lactobacillus*  
spp. COM *Gardnerella vaginalis*

CURITIBA

2024



JOÃO VICTOR DE SOUZA DA ROSA

PADRONIZAÇÃO DE DOIS MODELOS DE CO-CULTURA DE *Lactobacillus*  
spp. COM *Gardnerella vaginalis*

TCC apresentado ao curso de Graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dr(a). Camila Marcon

CURITIBA

2024

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela melhora da minha saúde e que me possibilitou concluir esse trabalho.

Agradeço a minha família que me apoiou durante todo o curso de Biomedicina e me deram forças que permitiram chegar até aqui.

Agradeço à Lívia, minha namorada, e meus amigos que me apoiaram e estiveram ao meu lado durante o trajeto. A companhia de vocês deixou o percurso mais leve e fácil de ser concluído.

Agradeço à minha orientadora Camila Marcon e a doutoranda Vivian por todos os ensinamentos, por toda a ajuda e paciência.

Agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para que esse trabalho pudesse ser concluído.

## RESUMO

A microbiota vaginal saudável é composta predominantemente por *Lactobacillus* spp., como o *Lactobacillus crispatus* e o *Lactobacillus gasseri*. Esses microrganismos são responsáveis pela inibição de bactérias associadas a vaginose bacteriana (VB), como a *Gardnerella vaginalis*, através da produção de compostos bactericidas e através da produção de ácido láctico, que diminui o pH do meio. Entretanto, na VB ocorre uma depleção de *Lactobacillus* spp., e crescimento de bactérias anaeróbicas, como a *G. vaginalis*. O tratamento para VB consiste no uso de antimicrobianos, porém é pouco eficaz e há recorrência de mais de 50% dos casos. Com isso, métodos alternativos de combate a VB são necessários, como o uso de prebióticos e probióticos, que têm se mostrado cada vez mais promissores por estudos baseados em co-cultura bacteriana. O objetivo deste trabalho consiste na padronização de dois modelos de co-cultura envolvendo bactérias associadas a microbiota vaginal saudável - *L. crispatus* (ATCC 33820) ou *L. gasseri* (ATCC 33323), com a bactéria associada a VB - *G. vaginalis* (ATCC 14018), a fim de contribuir para futuros ensaios destinados a novas opções terapêuticas. Foi realizado um modelo de co-cultura com inóculo em dois momentos, consistindo em realizar a monocultura de uma das cepas em meio caldo por 24 horas seguida da adição da segunda cepa e novo período de incubação por 35°C por 48 horas em anaerobiose. Além disso, foi realizado um modelo de co-cultura com inóculos simultâneos de duas cepas, que consistiu em adicionar o *Lactobacillus* spp. em conjunto com *G. vaginalis*. Neste último modelo, foram testadas 5 diferentes diluições do inóculo de *G. vaginalis*. Tais culturas foram realizadas com incubação a 35°C por 48 horas em anaerobiose. A análise de ambos os modelos de co-cultura foi realizada pela observação microscópica após coloração de Gram, a fim de detectar os morfotipos resultantes das co-culturas. Os resultados mostraram que no modelo de co-cultura com inóculo em dois momentos, o *L. crispatus* foi capaz de inibir completamente a *G. vaginalis*, enquanto o *L. gasseri* não foi capaz de inibir a *G. vaginalis* após 48 horas de incubação. Os resultados do modelo de co-cultura com inóculos simultâneos mostraram que ambos os *Lactobacillus* spp. só conseguiram inibir a *G. vaginalis* quando os inóculos iniciais dos mesmos estavam a 0,5 na escala de McFarland, enquanto a *G. vaginalis* estava diluída  $10^{-5}$ . Tais resultados demonstram o sucesso de dois modelos de co-cultura para espécies de importância para a microbiota vaginal e podem contribuir para a padronização de um modelo *in vitro* para estudo da VB e contribuir também para a descoberta de novas estratégias terapêuticas baseadas em prebióticos e probióticos.

Palavras-chave: Microbiota vaginal; Vaginose bacteriana; *Lactobacillus* spp; *Gardnerella vaginalis*; Co-cultura.

## ABSTRACT

The healthy vaginal microbiota is predominantly composed of *Lactobacillus* spp., such as *Lactobacillus crispatus* and *Lactobacillus gasseri*. These microorganisms are responsible for inhibiting bacteria associated with bacterial vaginosis (BV), such as *Gardnerella vaginalis*, through the production of bactericidal compounds and through the production of lactic acid, which decreases the pH of the medium. However, in BV there is a depletion of *Lactobacillus* spp., and growth of anaerobic bacteria, such as *G. vaginalis*. Treatment for BV consists of the use of antimicrobials, but it is not very effective and there is recurrence in more than 50% of cases. Therefore, alternative methods of combating BV are necessary, such as the use of prebiotics and probiotics, which have shown increasing promise in studies based on bacterial co-culture. The objective of this study was to standardize two co-culture models involving bacteria associated with healthy vaginal microbiota - *L. crispatus* or *L. gasseri*, with the bacterium associated with BV - *G. vaginalis*, in order to contribute to future trials aimed at new therapeutic options. A co-culture model was performed with inoculum in two times, consisting of performing the monoculture of one of the strains in broth medium for 24 hours, followed by the addition of the second strain and a new incubation period at 35°C for 48 hours in anaerobiosis. In addition, a co-culture model with simultaneous inoculums of two strains was performed, which consisted of adding *Lactobacillus* spp. together with *G. vaginalis*. In this model, 5 different dilutions of the *G. vaginalis* inoculum were tested. These cultures were performed with incubation at 35°C for 48 hours in anaerobiosis. The analysis of both co-culture models was performed by microscopic observation after Gram staining, in order to detect the morphotypes resulting from the co-cultures. The results showed that in the co-culture model with inoculum at two times, *L. crispatus* was able to completely inhibit *G. vaginalis*, while *L. gasseri* was not able to inhibit *G. vaginalis* after 48 hours of incubation. The results of the co-culture model with simultaneous inoculums showed that both *Lactobacillus* spp. were only able to inhibit *G. vaginalis* when their initial inoculum were at 0.5 on the McFarland scale, while *G. vaginalis* was diluted  $10^{-5}$ . These results demonstrate the success of two co-culture models for species of importance for the vaginal microbiota and may contribute to the standardization of an *in vitro* model for the study of BV and also contribute to the discovery of new therapeutic strategies based on prebiotics and probiotics.

Keywords: Vaginal microbiota; Bacterial vaginosis; *Lactobacillus* spp; *Gardnerella vaginalis*; Co-culture.

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

CST	- Estados Comunitários
DSTs	- Doenças Sexualmente Transmissíveis
<i>F. vaginae</i>	- <i>Fannyhessea vaginae</i>
<i>G. vaginalis</i>	- <i>Gardnerella vaginalis</i>
Gv	- <i>Gardnerella vaginalis</i>
GvLc	- Co-cultura de <i>Gardnerella vaginalis</i> com <i>Lactobacillus crispatus</i>
GvLg	- Co-cultura de <i>Gardnerella vaginalis</i> com <i>Lactobacillus gasseri</i>
IST's	- Infecções sexualmente transmissíveis
<i>L. crispatus</i>	- <i>Lactobacillus crispatus</i>
Lc	- <i>Lactobacillus crispatus</i>
LcGv	- Co-cultura de <i>Lactobacillus crispatus</i> com <i>Gardnerella vaginalis</i>
<i>L. gasseri</i>	- <i>Lactobacillus gasseri</i>
Lg	- <i>Lactobacillus gasseri</i>
LgGv	- Co-cultura de <i>Lactobacillus gasseri</i> com <i>Gardnerella vaginalis</i>
<i>P. bivia</i>	- <i>Prevotella bivia</i>
spp.	- Espécies
VB	- Vaginose Bacteriana

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>8</b>
1.2	OBJETIVOS	9
1.2.1	Objetivo geral	9
1.2.2	Objetivos específicos	10
1.3	JUSTIFICATIVA	10
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>12</b>
2.1	MICROBIOTA SAUDÁVEL	12
2.2	VAGINOSE BACTERIANA	15
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>19</b>
3.1	LOCAL DE ESTUDO	19
3.2	INGREDIENTES E MODO DE PREPARO DO MEIO NYC III	19
3.3	CEPAS BACTERIANAS E OBTENÇÃO DO INÓCULO INICIAL	20
3.4	MODELO DE CO-CULTURA COM INÓCULO EM DOIS MOMENTOS	21
3.5	MODELO DE CO-CULTURA COM INÓCULO SIMULTÂNEO	22
3.6	PREPARO DOS ESFREGAÇOS E DA COLORAÇÃO DE GRAM	25
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>27</b>
4.1	MODELO DE CO-CULTURA COM INÓCULO EM DOIS MOMENTOS	27
4.2	MODELO DE CO-CULTURA COM INÓCULO SIMULTÂNEO	29
4.3	DISCUSSÃO	33
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES</b>	<b>36</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>37</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A microbiota vaginal contém uma grande variedade de microrganismos residentes que podem variar de acordo com diversos fatores atrelados à saúde da mulher. A microbiota vaginal saudável contém predominantemente populações de *Lactobacillus* spp., que apresentam um papel essencial na defesa do organismo contra bactérias prejudiciais (PENDHARKAR, 2023). Dentre as várias espécies de *Lactobacillus* spp. presentes, o *Lactobacillus crispatus* e o *Lactobacillus gasseri* destacam-se por serem importantes microrganismos na defesa do indivíduo, através da produção de compostos como bacteriocinas (CHEE, 2020) e peróxido de hidrogênio (ARGENTINI, 2022), que apresentam atividade bactericida, e ácido lático, que diminui o pH do meio (O'HANLON, 2019). Esses mecanismos impedem a colonização de bactérias prejudiciais e auxiliam na manutenção da população de *Lactobacillus* spp. (ARGENTINI, 2022). Entretanto, quando ocorre uma depleção de *Lactobacillus* spp., algumas bactérias anaeróbias e anaeróbias facultativas podem crescer nesse ambiente, causando um desequilíbrio da microbiota ou disbiose vaginal (PENDHARKAR, 2023).

A vaginose bacteriana (VB) é a disbiose vaginal mais comum do trato genital inferior, entre mulheres em idade reprodutiva. (BRASIL. Ministério da Saúde, 2018). Estima-se que a prevalência de VB no Brasil foi de 25,4% em um estudo realizado em 2021, seguindo os critérios da Amsel (CAMARGO, 2023). Os sintomas característicos dessa disbiose incluem corrimento vaginal de cor branca-acinzentada, além da sensação de queimação, coceira na região, desconforto ao urinar e um odor característico de peixe (LACHYAN, 2024). O diagnóstico da VB é realizado clinicamente através de critérios da Amsel (1983) ou por meio de critérios microbiológicos, através do método de score do NUGENT (BRASIL. Ministério da Saúde, 2018). Normalmente o tratamento da VB consiste no uso de antibióticos como metronidazol ou clindamicina (VODSTRCIL, 2021), porém apenas 50% das mulheres conseguem eliminar a VB após tratamento convencional (LACHYAN, 2024). Além disso, mesmo depois do tratamento eficaz, há uma recorrência de mais de 50% da VB em 6 meses após o tratamento (VODSTRCIL, 2021).

Dentre os microrganismos causadores da VB, a *Gardnerella vaginalis* é a maior responsável por essa condição, presente em 95% dos casos de VB (MUZNY, 2019). As cepas virulentas de *G. vaginalis* conseguem resistir ao ambiente inóspito criado pelos *Lactobacillus* spp. e incorporar outras bactérias em biofilmes (SCHWEBKE, 2014). Há diversas condições na vida da mulher que podem influenciar no aparecimento das disbioses vaginais, como a higiene, alterações hormonais e uso de antibióticos (PENDHARKAR, 2023). Essas condições podem desencadear uma diminuição na população de *Lactobacillus* spp. e um aumento de bactérias oportunistas (MUZNY, 2019).

Diante desse cenário, vários estudos têm sido realizados a fim de encontrar métodos alternativos para o tratamento da VB. Um método bastante promissor atualmente consiste no uso de probióticos, que são bactérias vivas que podem reverter o quadro de disbiose (PENDHARKAR, 2023). Uma forma de estudar os probióticos é através da padronização de modelos de co-cultura (VONGSA et al., 2016). Modelos de co-cultura permitem avaliar a interação entre os microrganismos presentes. No caso do estudo da VB, um modelo de co-cultura pode ser realizado para observar se alguma cepa de *Lactobacillus* spp. pode ser um candidato a probiótico, através da inibição da cepa patogênica. Entretanto, atualmente há poucos estudos relacionados a padronização de modelos de co-cultura para a VB, utilizando *Lactobacillus* spp. cultivados com *Gardnerella vaginalis*.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Padronizar dois modelos de co-cultura de bactérias benéficas da microbiota vaginal, *Lactobacillus crispatus* e *Lactobacillus gasseri*, com a espécie *Gardnerella vaginalis*, associada à vaginose bacteriana, visando avaliar a interação entre esses microrganismos em condições controladas de cultivo.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Padronizar dois modelos de co-cultura distintos a partir do cultivo de *Lactobacillus crispatus* com *Gardnerella vaginalis* e *Lactobacillus gasseri* com *Gardnerella vaginalis*;
- Identificar os morfotipos encontrados nas co-culturas depois de 48 horas de incubação, através da análise de lâminas de microscopia coradas pelo método de Gram;
- Verificar se o *Lactobacillus crispatus* e o *Lactobacillus gasseri* apresentam a mesma capacidade de inibição das cepas de *Gardnerella vaginalis* nos dois métodos de co-cultura.

## 1.2 JUSTIFICATIVA

A VB apresenta riscos para a saúde da mulher, pois elas são responsáveis por complicações como aumento significativo de doenças inflamatórias pélvicas, infecções do trato urinário, infertilidade, aumento da suscetibilidade a IST's, abortos espontâneos, partos prematuros, entre outras (ROSCA, 2019). O tratamento para a VB apresenta apenas 50% de eficácia e apresenta uma alta taxa de recorrência (VODSTRCIL, 2021). Um dos fatores associados à dificuldade de tratamento é a formação de biofilmes bacterianos (LACHYAN, 2024). Outro problema relacionado ao uso de antibióticos é que eles são capazes de induzir resistência bacteriana a longo prazo (ALGBURI, 2017). Com isso, métodos alternativos como probióticos e prebióticos tem sido estudados atualmente para o tratamento da VB (PENDHARKAR, 2023). Entretanto, o *Lactobacillus crispatus* e o *Lactobacillus gasseri*, que são importantes bactérias na manutenção da homeostase da microbiota vaginal, não são utilizados como probióticos (ARGENTINI, 2022).

A realização de co-culturas de *Lactobacillus* spp. com *G. vaginalis* é uma abordagem importante para o entendimento tanto da VB como da interação desses microrganismos, bem como para a descoberta de novas estratégias terapêuticas. Porém, atualmente não há muitos estudos relacionados a co-cultura de *Lactobacillus* spp. com *G. vaginalis*, seja pela falta de condições precisas de quantificação de cada espécie dentro da co-cultura após incubação, seja por conta da dificuldade de simular

condições *in vitro* de um modelo associado à VB. Dessa forma, tanto o entendimento das relações bacterianas presentes na microbiota vaginal como a testagem de novos candidatos a prebióticos e probióticos dependem do estabelecimento de modelos robustos e reprodutíveis de co-cultura bacteriana envolvendo *Lactobacillus* spp. e a principal espécie associada à vaginose bacteriana – a *G. vaginalis*. (PENDHARKAR, 2023).

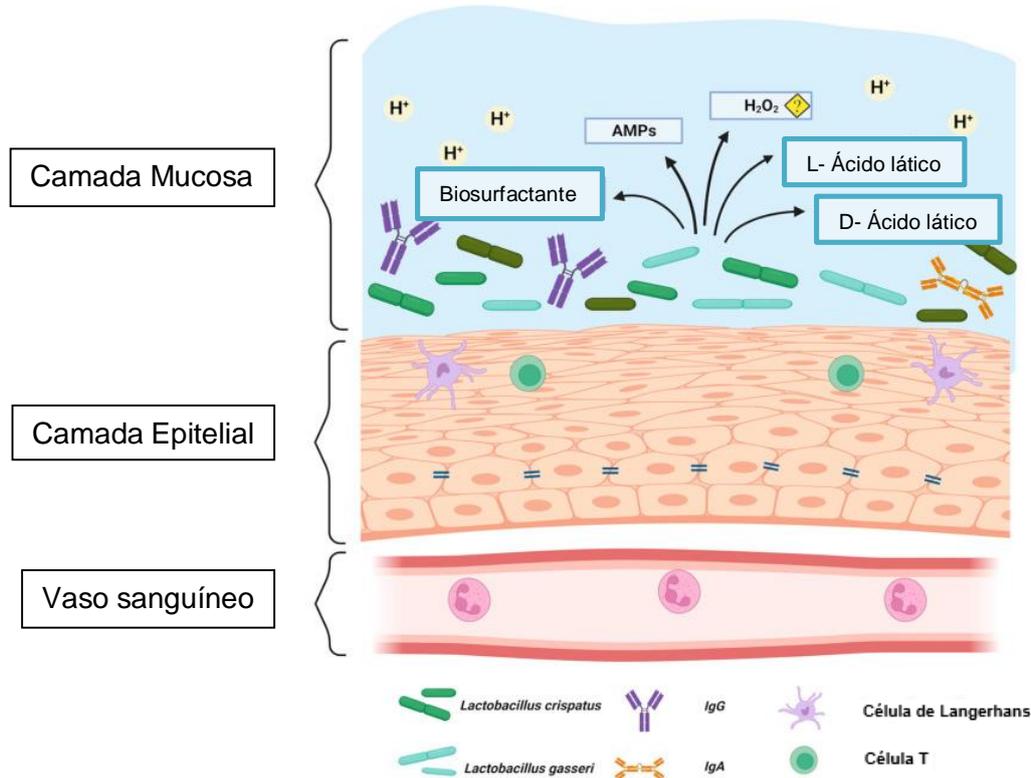
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MICROBIOTA SAUDÁVEL

A microbiota vaginal tem sido alvo de diversos estudos recentes por conta do seu impacto na saúde da mulher. A microbiota vaginal saudável apresenta vários benefícios na saúde da mulher, pois as bactérias que colonizam o trato vaginal conseguem interagir com o sistema imune, de modo a garantir um controle do crescimento de populações bacterianas potencialmente patogênicas como a *Gardnerella vaginalis* e *Prevotella bivia*, que são as principais bactérias associadas à vaginose bacteriana (ARGENTINI, 2022). Normalmente, a composição de uma microbiota vaginal saudável apresenta várias espécies de *Lactobacillus* spp., como por exemplo o *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus iners* e *Lactobacillus jensenii* (ARGENTINI, 2022). Os *Lactobacillus* spp. são responsáveis pela produção de substâncias protetoras como as bacteriocinas, ácido lático e peróxido de hidrogênio, que acarretam na diminuição da população dessas bactérias patogênicas (FIGURA 1) (PENDHARKAR, 2023). O ácido lático é considerado o principal mecanismo de defesa estudado. A produção de ácido lático resulta na diminuição do pH  $\leq 4,5$ , o que torna o ambiente hostil para bactérias patogênicas (ROSCA, 2019). O ácido lático produzido pelos *Lactobacillus* spp. permeia através das membranas dessas bactérias e induzem um estresse osmótico, desestabilizando a membrana de bactérias Gram negativas (O'HANLON, 2011). Os *Lactobacillus* spp. também são responsáveis pela produção de bacteriocinas, que são peptídeos antimicrobianos de amplo espectro (AMP's), que podem apresentar atividade bactericida ou bacteriostática. Essas bacteriocinas são importantes na defesa contra patógenos, pois atuam rompendo as membranas celulares de algumas bactérias de Gram variáveis (PENDHARKAR, 2023). Além disso, um estudo evidenciou outro mecanismo de defesa importante produzido pelo *L. crispatus* e *L. gasseri*, que são os biosurfactantes emulsificantes. Esses biosurfactantes foram eficazes em reduzir a aderência de cândida nas células epiteliais vaginais (DE GREGORIO, 2020). Outra substância importante é o peróxido de hidrogênio, que também possui atividade bactericida *in vitro* (PENDHARKAR, 2023). Entretanto, o papel protetor *in vivo* do peróxido de hidrogênio é controverso por conta da baixa disponibilidade de oxigênio

no ambiente vaginal (KALIA, 2020). Além disso, os *Lactobacillus* spp. também conseguem se aderir a células epiteliais vaginais, competindo com outras bactérias patogênicas para a colonização do ambiente vaginal (TAKADA, 2018).

FIGURA 1 - PRODUÇÃO DE COMPOSTOS PROTETORES PELOS *Lactobacillus* spp.



FONTE: Adaptado de Pendharkar (2023). LEGENDA: Interação da microbiota vaginal com o sistema imune e com as células epiteliais. O epitélio escamoso vaginal é conectado por junções estreitas que impedem os patógenos de entrarem nas camadas epiteliais basais. Além disso, o epitélio também possui células apresentadoras de antígenos, bem como células T. Na camada de muco, há um pH ácido  $\leq 4,5$ , devido ao ácido láctico produzido pelos *Lactobacillus* spp. Outros mecanismos de defesa importantes são os peptídeos antimicrobianos (AMPs) e biossurfactantes. O papel do peróxido de hidrogênio é questionável *in vivo*, pois depende da existência de oxigênio.

A composição da microbiota vaginal é alterada ao longo da vida da mulher. Logo após o parto, os microrganismos que habitam a microbiota da mãe passam a colonizar o trato vaginal da filha. Inicialmente, a composição da microbiota vaginal é bem diversificada, apresentando poucos *Lactobacillus* spp (KALIA, 2020). Entretanto, com o passar dos anos, os *Lactobacillus* spp. passam a ser o organismo mais prevalente na microbiota vaginal saudável, principalmente na fase da puberdade, representando cerca de 95% da composição (RAVEL, 2010). Essa alta composição de *Lactobacillus* spp. pode ser explicada pelo aumento dos níveis dos hormônios estrogênio e progesterona, pois esses hormônios interagem diretamente com as

células epiteliais vaginais (PENDHARKAR, 2023). Esse processo desencadeia a produção de glicogênio, que é utilizado no metabolismo de *Lactobacillus* spp., causando aumento na população desses microrganismos (SPEAR, 2014). Os produtos da degradação do glicogênio em condições de anaerobiose do ambiente vaginal permitem a produção de ácido láctico (PENDHARKAR, 2023). Por esse motivo, a queda do nível de estrogênio em mulheres que entram na menopausa causam uma diminuição do armazenamento de glicogênio e, conseqüentemente, uma diminuição na população de *Lactobacillus* spp. Essa diminuição de *Lactobacillus* spp. pode ser uma das causas da VB em mulheres adultas. (MEI, 2022).

De acordo com o sequenciamento genético, a microbiota de mulheres em idade fértil possuem 5 tipos de estados comunitários (CST), aos quais predominam algum *Lactobacillus* spp. ou alguma outra bactéria residente. O CST I possui predominantemente *Lactobacillus crispatus*, o CST II é dominado por *Lactobacillus gasseri*, o CST III apresenta *Lactobacillus iners*, o CST V possui predominantemente *Lactobacillus jensenii*, enquanto o CST IV é composto por bactérias anaeróbias estritas e anaeróbias facultativas como *Gardnerella vaginalis*, *Prevotella bivia*, *Atopobium*, *Mobiluncus*, etc (ROSCA, 2019). Quando as mulheres apresentam grupo CST IV com poucos *Lactobacillus* spp., elas são mais suscetíveis a infecções por HIV, Herpes e *Chlamydia trachomatis* (MARTIN, 1999) (WIESENFELD, 2003). O CST I está associado a menor suscetibilidade a DSTs pois os *Lactobacillus crispatus* são ótimos produtores de ácido láctico e são modelos de microbiota saudável. O CST III corresponde normalmente a um fenótipo de transição para o CST IV, enquanto o CST II e CST V são poucos comuns e são considerados uma microbiota oportunista (SAVICHEVA, 2023).

Estudos recentes demonstraram que o *L. crispatus* está fortemente associado a uma microbiota vaginal saudável por ser um ótimo produtor de ácido láctico (ARGENTINI, 2022). O *L. crispatus* também está relacionado a manutenção da homeostase do microambiente vaginal, pois produz bacteriocinas e peróxido de hidrogênio (PENDHARKAR, 2023). Além disso, o *L. crispatus* consegue interagir com o sistema imune sem causar inflamação local e diminui a quantidade de citocinas inflamatórias presentes, que normalmente estão aumentadas em disbioses como a VB (ROSE, 2012). Por último, o *L. crispatus* também está associado a uma diminuição

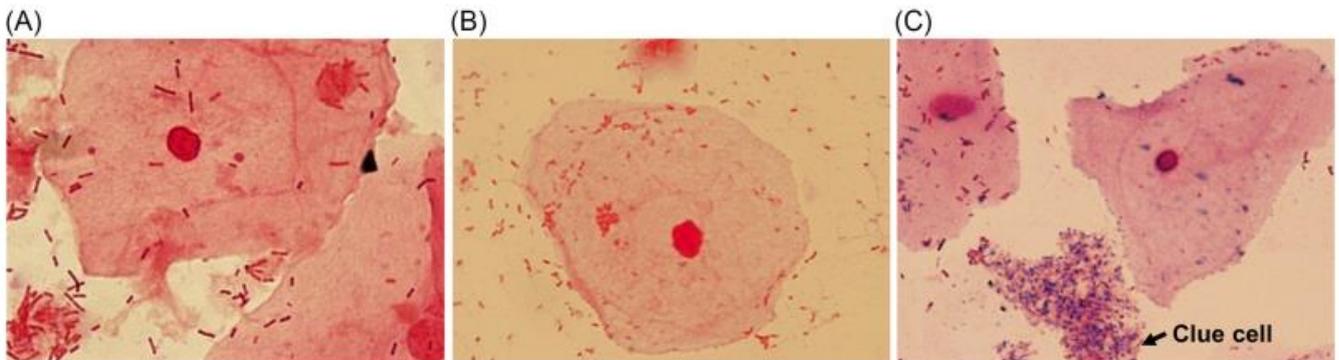
da susceptibilidade a infecções sexualmente transmissíveis (IST's), confirmando seu papel protetor na microbiota vaginal (SAVICHEVA, 2023).

O *Lactobacillus gasseri* também apresenta potencial de inibição da *Gardnerella vaginalis*, segundo um estudo publicado recentemente por Zhang J. *et al* (2024). Nesse estudo, o autor demonstra que a cepa *L. gasseri* VHProbi E09 foi capaz de inibir o crescimento da *G. vaginalis* em cerca de 99%, quando ambas foram inoculadas em co-cultura em uma placa de ágar sangue. Esse estudo confirma que o *L. gasseri* possui mecanismos inibitórios contra a *G. vaginalis*, dependendo do tipo de cepa isolada. Portanto, o *L. gasseri* pode estar envolvido na proteção do microambiente vaginal contra bactérias associadas à VB.

## 2.2 VAGINOSE BACTERIANA

A vaginose bacteriana (VB) é uma disbiose vaginal que afeta principalmente mulheres na idade reprodutiva. Os sintomas característicos dessa disbiose incluem corrimento vaginal de cor branca-acinzentada, além da sensação de queimação, coceira na região, desconforto ao urinar e um odor característico de peixe (LACHYAN, 2024). Entretanto, aproximadamente 50% das mulheres são assintomáticas (COUDRAY, 2020). A VB é caracterizada por um desequilíbrio de bactérias benéficas e prejudiciais que habitam a microbiota vaginal (LACHYAN, 2024). O aumento de microrganismos prejudiciais se deve a algumas bactérias anaeróbias e anaeróbias facultativas, como *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Prevotella bivia*, entre outras. Esse crescimento da população de bactérias prejudiciais normalmente é acompanhado por uma depleção de *Lactobacillus* spp. saudáveis, que conseqüentemente acarreta na diminuição de compostos produzidos e um aumento de pH, desencadeando um ambiente suscetível a infecções e ao crescimento de bactérias anaeróbias prejudiciais (FIGURA 2) (CHACRA, 2022).

FIGURA 2 - TRANSIÇÃO DA MICROBIOTA SAUDÁVEL PARA CONDIÇÃO DE VB.

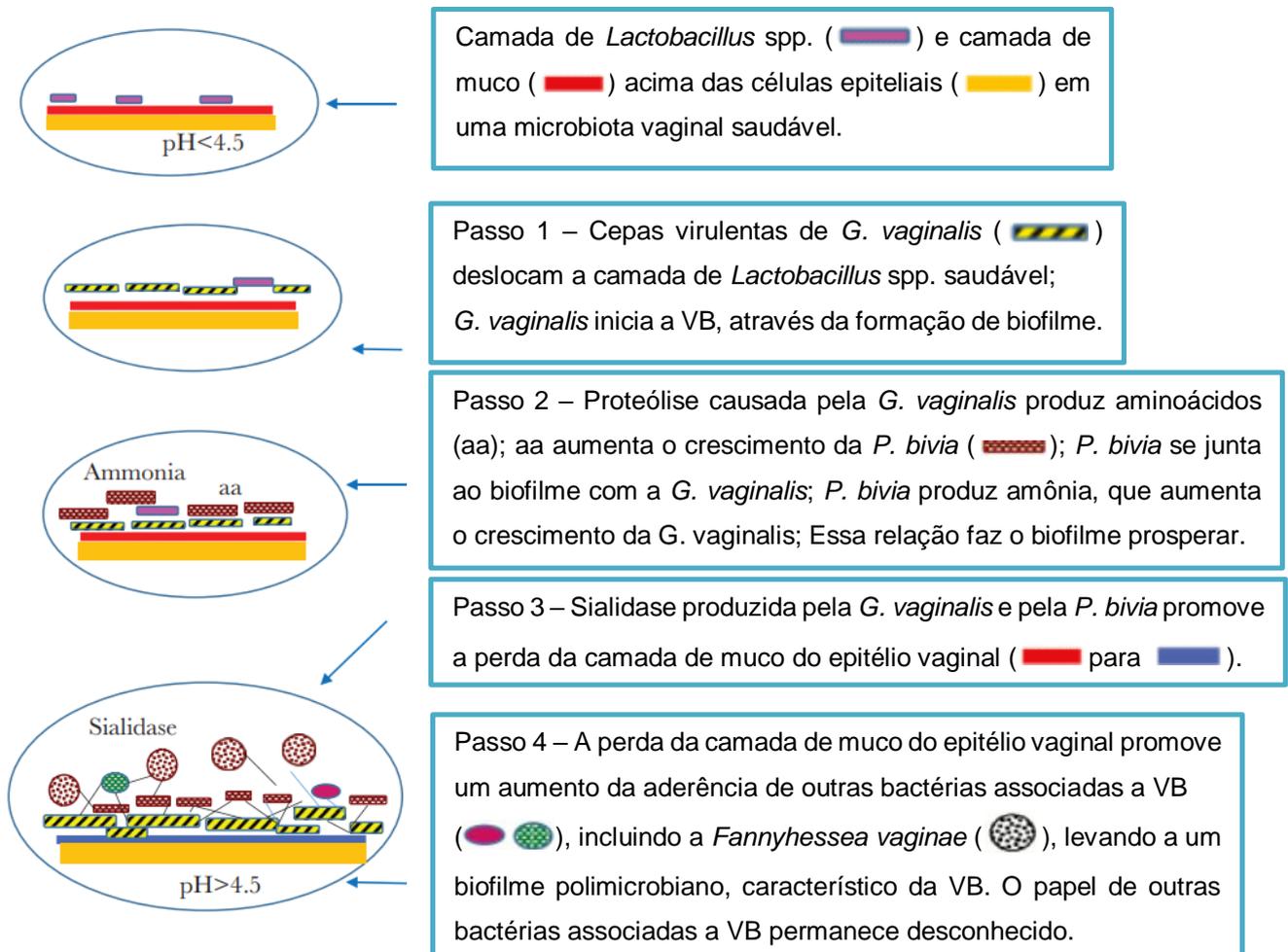


FONTE: Rosca (2020). LEGENDA: (A) - Microbiota saudável, (B) - Condição intermediária, (C) - Condição de VB.

O crescimento de bactérias anaeróbias pode ser influenciado por diversas condições que afetam o microbioma vaginal, entre elas podemos citar a alteração hormonal, prática sexual e o uso excessivo de antibióticos. A VB é a causa mais comum de corrimento vaginal em mulheres de idade fértil (30% de todas as causas) e nem sempre a antibioticoterapia apresenta sucesso no controle da VB (CHACRA, 2022). Isso ocorre pois as bactérias prejudiciais formam biofilmes que resistem ao tratamento de antibióticos (LACHYAN, 2024). Os biofilmes são definidos como um acúmulo de microrganismos em uma matriz, produzida pelos próprios microrganismos, que apresenta capacidade de adesão em superfícies (UMER, 2023). Além disso, mesmo após um tratamento eficaz com antibióticos, a VB é recorrente de 15 a 30% após 30 - 90 dias da antibioticoterapia, enquanto 70% dos pacientes apresentam casos de recorrência após 9 meses do tratamento com antibióticos, demonstrando uma alta taxa de recorrência (BRASIL. Ministério da Saúde, 2018, p. 106). Na VB a *G. vaginalis* está presente em cerca de 95% dos casos e é responsável pela produção de vaginolisina, uma toxina que é capaz de formar poros (atividade citotóxica) (MUZNY, 2019). Entretanto, nem sempre a *G. vaginalis* está associada ao surgimento de disbiose, isso porque outros fatores preponderantes estão atrelados à VB. Um fator indicativo disso, é que a *G. vaginalis* pode ser encontrada na microbiota vaginal de mulheres saudáveis (HICKEY, 2014). Além disso, um outro estudo realizado conseguiu identificar 13 genótipos de *G. vaginalis* e descobriram que nem todas estão associadas ao surgimento da VB (VANEECHOUTTE, 2019).

Os fatores que contribuem para a VB causada pela *G. vaginalis* são vários. Inicialmente, a *G. vaginalis* consegue deslocar os *Lactobacillus* spp. protetores, através da diminuição do potencial redox na microbiota vaginal, que normalmente está aumentada por conta dos *Lactobacillus* spp. (MUZNY, 2019). Uma vez que ela consegue sobreviver e diminuir o potencial redox, a *G. vaginalis* é capaz de se aderir a mucosa vaginal e formar biofilmes, criando um ambiente favorável para seu crescimento. Após a formação de biofilmes, outras bactérias podem acabar se incorporando à microbiota vaginal, como por exemplo a *Prevotella bivia*, *Fannyhessea vaginae*, *Mobiluncus mulieris*, *Corynebacterium amycolatum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Enterococcus faecalis*, entre outros. A interação dessas bactérias com a *G. vaginalis* cria uma relação cooperativa e única, culminando no desenvolvimento e proliferação do biofilme (CASTRO, 2019). Conseqüentemente, essa proliferação pode desencadear a perda da mucosa vaginal protetora, principalmente pelo fato da *P. bivia* e *G. vaginalis* produzirem sialidase (FIGURA 3). A desagregação da camada protetora deixa o ambiente favorável a entrada de bactérias patogênicas, levando ao aparecimento de outras bactérias como a *F. vaginae* (MUZNY, 2019).

FIGURA 3 - ESQUEMA DE PROGRESSÃO DA VAGINOSE BACTERIANA



FONTE: Adaptado de Muzny (2019).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DE ESTUDO

A recuperação das cepas bacterianas, preparo dos meios de cultura e realização das co-culturas foram efetuadas no Laboratório de Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia Básica, do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

#### 3.2 INGREDIENTES E MODO DE PREPARO DO MEIO NYC III

Para o preparo do meio NYC III em caldo, foram utilizados ingredientes como: HEPES, peptona, cloreto de sódio, resazurina e água destilada em quantidades detalhadas na TABELA 1.

TABELA 1 - INGREDIENTES UTILIZADOS PARA O PREPARO DO MEIO NYC III (CALDO)

<b>Ingredientes</b>	<b>Número no catálogo</b>	<b>Quantidade por Litro</b>
HEPES	Fisher: FLBP3101	4g
Peptona proteose	BD: 211693	15g
Cloreto de sódio	Sigma: 59888	5g
Água destilada (ddH <sub>2</sub> O)		866 mL
Resazurina	Sigma: 05040	4 mL

FONTE: O autor (2024).

Depois da mistura dos ingredientes com água destilada e mudança do pH do meio para 7,5, o meio foi submetido a autoclave por 15 minutos. Após a autoclavagem,

foram adicionadas glicose, soro de cavalo e extrato de levedura ao meio em um ambiente estéril, como detalhado na TABELA 2.

TABELA 2 - INGREDIENTES PARA O PREPARO DO MEIO NYC III (CALDO), APÓS A AUTOCLAVE.

<b>Ingredientes</b>	<b>Número no catálogo</b>	<b>Quantidade por Litro</b>
Glicose (25% de solução em ddH <sub>2</sub> O)	Fisher: BP350-1	20 mL
Soro de cavalo (15% solução em ddH <sub>2</sub> O)	Gibco: 26050088	100 mL
Extrato de levedura	BD: 212750	25 mL

FONTE: O autor (2024).

Para o preparo do meio NYC III sólido em placa de petri, os ingredientes utilizados foram os mesmos, porém foi adicionado 15 gramas de ágar 1,5% na mistura antes da autoclavagem. Após a mistura dos ingredientes e a autoclavagem, os meios foram plaqueados e solidificados em temperatura ambiente, e posteriormente armazenados em geladeira devidamente identificados até o momento do uso.

### 3.3 CEPAS BACTERIANAS E OBTENÇÃO DO INÓCULO INICIAL

Para os experimentos, foram utilizadas cepas padrão de *Lactobacillus crispatus* (ATCC 33820), *Lactobacillus gasseri* (ATCC 33323) e *Gardnerella vaginalis* (ATCC 14018), seguindo os protocolos de recuperação de cada cepa (ATCC BACTERIOLOGY CULTURE GUIDE).

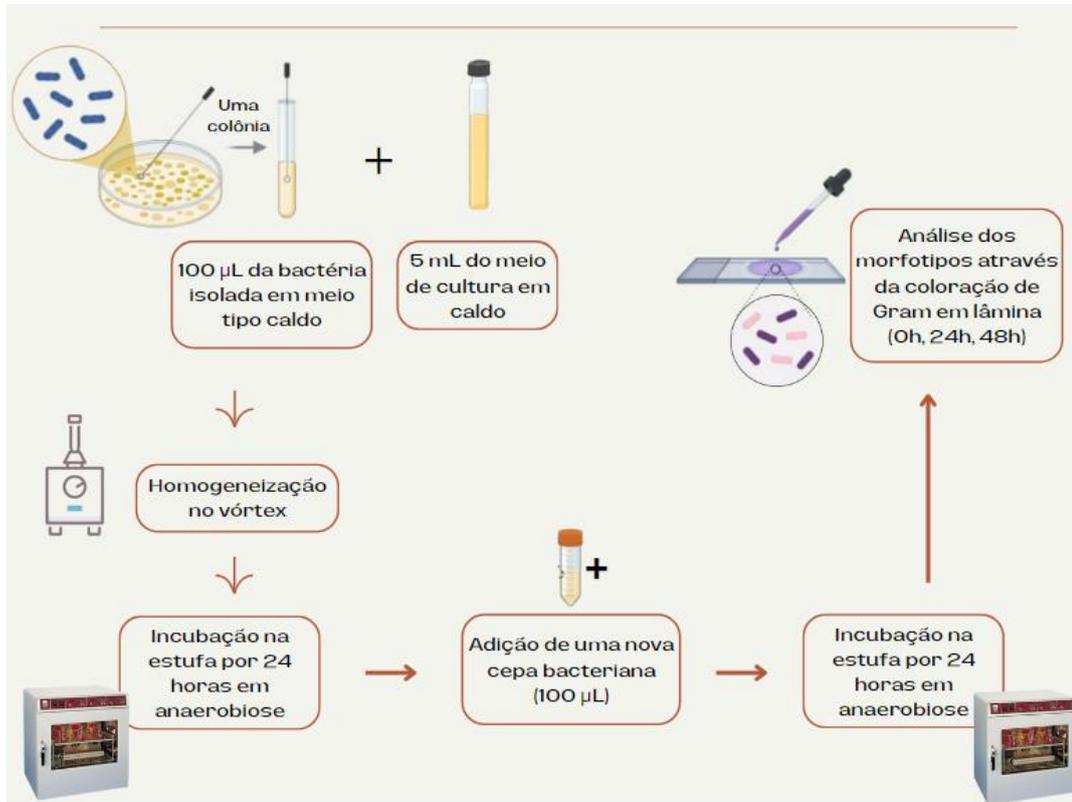
Para a realização do inóculo inicial, as cepas foram descongeladas à temperatura ambiente. Depois, cada cepa foi transferida para tubos contendo 5 mL de meio NYC III tipo caldo e em seguida, foram inseridos dentro de uma jarra de anaerobiose junto com um gerador de anaerobiose, mantidos à 37°C por 24 horas.

Após o crescimento em meio NYC III tipo caldo, as cepas foram repicadas para o meio NYC III em placas de ágar, através de estrias por esgotamento, utilizando alças calibradas de 10 µl. As placas de ágar NYC III foram incubadas nas mesmas condições do caldo mencionado acima por 48 horas. Em seguida, uma colônia foi selecionada utilizando uma alça calibrada de 10 µl e transferida para 5 mL de meio NYC III em caldo. A incubação ocorreu por 24 horas em anaerobiose. Após todo o procedimento descrito, as cepas foram imediatamente utilizadas para os experimentos de co-cultura.

### 3.4 MODELO DE CO-CULTURA COM INÓCULO EM DOIS MOMENTOS

Nesse modelo de co-cultura, o *L. crispatus* e *L. gasseri* foram inoculados com a *G. vaginalis* em tubos contendo meio NYC III em caldo. Inicialmente, 100 µl de uma das cepas de *Lactobacillus* spp. foram misturadas em 5 mL de meio NYC III e incubada por 24 horas em anaerobiose. Em seguida, 100 µl de *G. vaginalis* foi adicionada à co-cultura na seguinte relação: LcGv (*L. crispatus* + *G. vaginalis*), LgGv (*L. gasseri* + *G. vaginalis*), GvLc (*G. vaginalis* + *L. crispatus*) e GvLg (*G. vaginalis* + *L. gasseri*). As co-culturas foram ajustadas a 0,5 na escala de McFarland e incubadas em anaerobiose por 48h. Após o crescimento, foram feitas lâminas para coloração de Gram nos momentos 0h, 24h e 48h de todas as co-culturas. Além disso, foram realizadas as monoculturas de cada cepa como controle positivo. As monoculturas também foram ajustadas para 0,5 na escala de McFarland. Um esquema simplificado dos procedimentos realizados na pesquisa estão descritos na FIGURA 4.

FIGURA 4 - FLUXO DE TRABALHO DA CO-CULTURA COM INÓCULO EM DOIS MOMENTOS.



FONTE: O autor (2024).

O cultivo inicial da primeira cepa em monocultura por 24 horas permitiu com que a cepa tivesse a capacidade de se proliferar e tentar formar biofilmes antes da adição da segunda cepa (MACHADO, 2013). Com isso, foi possível simular um modelo de co-cultura em que já havia uma cepa bacteriana estabelecida no ambiente. Depois da adição da segunda cepa, foi observado se ocorreu a predominância de uma das cepas na co-cultura. (VONGSA et al., 2016).

### 3.5 MODELO DE CO-CULTURA COM INÓCULO SIMULTÂNEO

Para realização desse modelo de co-cultura, as suspensões dos inóculos de cada cepa bacteriana foram padronizadas utilizando a escala 0,5 de McFarland, em tubos falcon contendo 9 mL de meio NYC III. Após o ajuste da escala de McFarland de cada cepa bacteriana, foram realizadas diluições subsequentes em outros 5 tubos

contendo 9 mL de meio NYC III cada, para todas as cepas. Para o processo de diluição, 1 mL foi retirado do tubo inicial (0,5 McFarland) e transferido para um segundo tubo contendo 9 mL de meio NYC III. Depois, 1 mL do tubo 2 foi transferido para o tubo 3 que também continha 9 mL de meio NYC III, e assim por diante, até chegar no tubo 6, onde 1 mL foi descartado, como demonstrado na FIGURA 5.

FIGURA 5 - AJUSTE DA ESCALA DE McFarland E DILUIÇÕES REALIZADAS

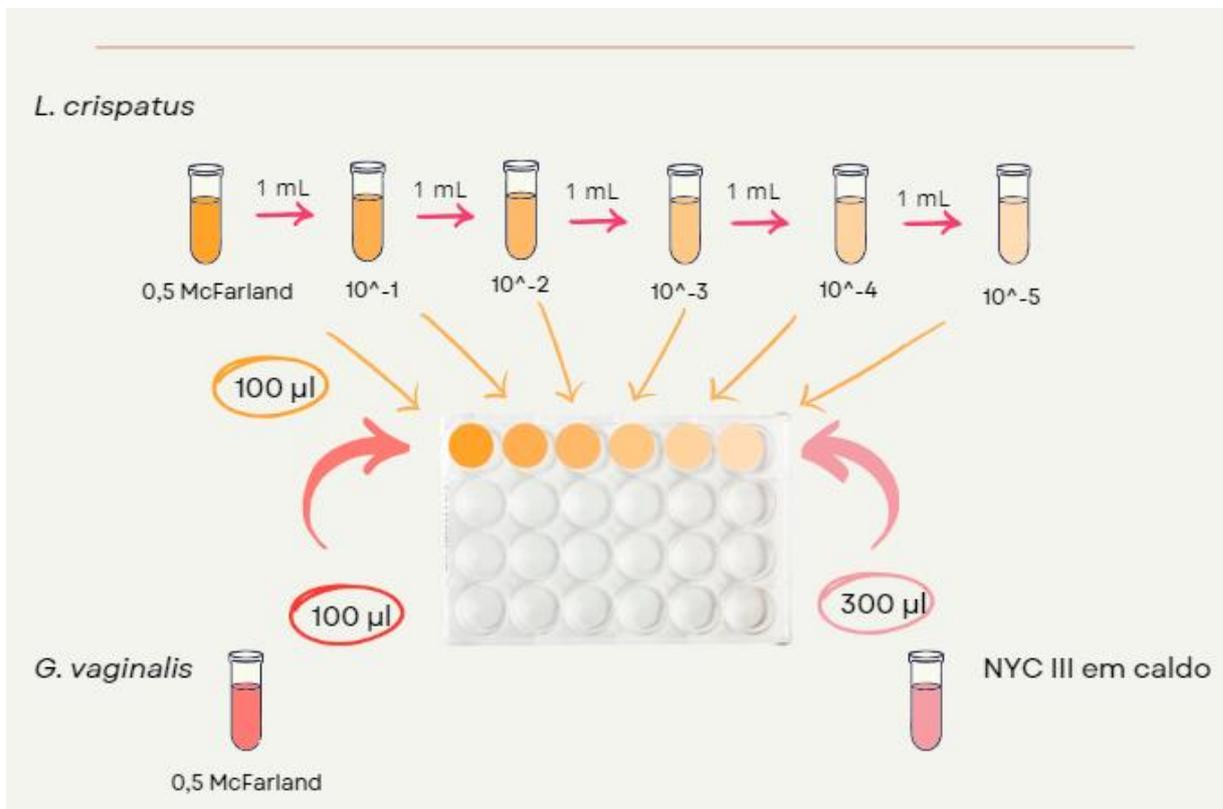


FONTE: O autor (2024).

Para esse modelo de co-cultura, foi utilizado uma placa de 24 poços. Em cada poço foi transferido 300 µl de meio de cultura NYC III em caldo, 100 µl de uma cepa bacteriana e 100 µl da segunda cepa bacteriana. Em cada linha da placa foram cultivadas diferentes cepas, associando sempre uma bactéria de ambiente vaginal saudável (*L. crispatus* ou *L. gasseri*) com uma bactéria associada a VB (*G. vaginalis*). Na primeira e segunda linha foram cultivadas *Lactobacillus crispatus* com *Gardnerella vaginalis* (GvLc e LcGv), enquanto na terceira e quarta linha foram cultivados *Lactobacillus gasseri* com *Gardnerella vaginalis* (GvLg e LgGv). Na primeira coluna,

as cepas permaneceram com a quantidade de inóculo do primeiro tubo, que está ajustado na escala 0,5 de McFarland. Nas colunas subsequentes, uma das cepas permaneceu com quantidade de inóculo ajustada de 0,5 na escala de McFarland em todos os poços, enquanto a outra cepa foi diluída sucessivamente e transferida a cada poço, como mostrado na FIGURA 6.

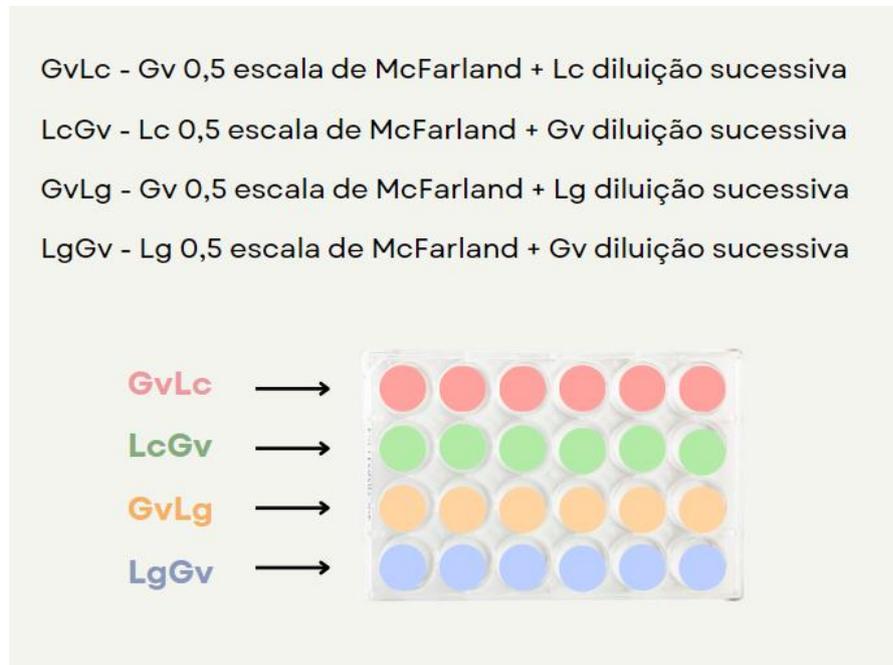
FIGURA 6 - FLUXO DE TRABALHO DA CO-CULTURA COM INÓCULO SIMULTÂNEO.



FONTE: O autor (2024).

Na primeira linha da placa de 24 poços, foram cultivados *G. vaginalis* e *L. crispatus* (GvLc). Em cada poço da primeira linha, foi adicionado 100 µl da *G. vaginalis* ajustada na escala de McFarland 0,5. Para a adição de *L. crispatus* nos mesmos poços, primeiramente a cepa foi diluída sucessivamente em tubos e depois 100 µl de cada tubo foi transferido para cada poço da primeira linha. Dessa forma, uma cepa se mantém na mesma quantidade inicial, enquanto a outra cepa fica gradativamente com menor quantidade de inóculo. O mapa do experimento de co-cultura está resumido na FIGURA 7.

FIGURA 7 - MAPA DO EXPERIMENTO DE CO-CULTURA COM INÓCULO SIMULTÂNEO EM UMA PLACA DE 24 POÇOS



FONTE: O autor (2024). LEGENDA: Gv - *Gardnerella vaginalis*, Lc - *Lactobacillus crispatus*, Lg - *Lactobacillus gasseri*. As co-culturas são definidas por duas bactérias, como por exemplo GvLc, que representa uma co-cultura de *G. vaginalis* com *L. crispatus*.

Após a adição das culturas diluídas em cada poço, as placas de 24 poços foram incubadas em anaerobiose a 37°C por 48 horas. Depois do tempo de incubação, 10 µl de cada poço foi transferido para lâminas previamente identificadas, em duplicatas. As lâminas foram deixadas secar à temperatura ambiente e depois foi realizada a coloração de Gram. A análise das lâminas ocorreu através da identificação da presença ou ausência de cada morfotipo presente, considerando os bacilos longos e Gram positivos compatíveis com *Lactobacillus spp.* e os bacilos curtos e Gram negativos compatíveis com *G. vaginalis*.

### 3.6 PREPARO DOS ESFREGAÇOS E DA COLORAÇÃO DE GRAM

Após os ensaios de co-cultura e do tempo de incubação, as lâminas foram identificadas e separadas para o esfregaço e coloração de Gram. Para o esfregaço,

as co-culturas foram homogeneizadas suavemente com uma micropipeta e 10  $\mu$ l foram transferidas para a lâmina previamente identificada. As lâminas foram deixadas secando em temperatura ambiente. A coloração de Gram foi realizada em quatro etapas, conforme o manual do Ministério da Saúde (BRASIL. Ministério da Saúde, 2001). Inicialmente, o esfregaço foi recoberto por corante cristal violeta e deixado agir por 1 minuto. Em seguida, o excesso de cristal violeta foi escorrido e lavado em um filete de água corrente, e adicionado lugol, deixando agir novamente por 1 minuto. A etapa de descoloração com álcool foi realizada seguida da lavagem com água. Finalmente, foi aplicado o corante fucsina por 40 segundos e o excesso foi retirado com água. Logo em seguida, as lâminas foram deixadas secando ao ar livre e depois observadas em um microscópio óptico, utilizando a objetiva de imersão 100 vezes. Para a identificação dos morfotipos, foi utilizado o critério presente ou ausente nos dois modelos de co-cultura. Para o modelo de co-cultura com inóculo simultâneo, foi também utilizado o critério predominante, ou seja, qual morfotipo predominou na cultura após 48 horas de incubação.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 RESULTADO DO MODELO DE CO-CULTURA COM INÓCULO EM DOIS MOMENTOS

Os resultados obtidos do modelo de co-cultura com inóculo em dois momentos estão resumidos no QUADRO 1 abaixo.

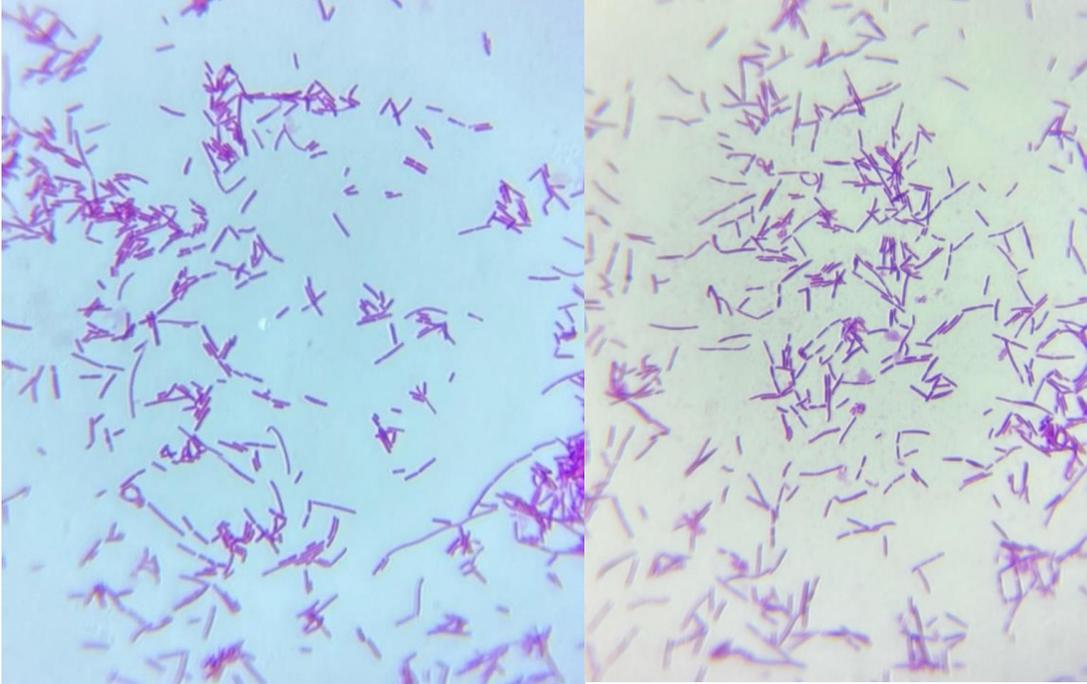
QUADRO 1 - RESULTADOS OBTIDOS DO MODELO DE CO-CULTURA COM INÓCULO EM DOIS MOMENTOS DE *Lactobacillus* spp. COM *G. vaginalis*

Combinação	Inóculo inicial	Segundo inóculo (após 24h)	Resultado microscopia 48h	
			Presença de <i>Lactobacillus</i>	Presença de <i>G. vaginalis</i>
LcGv	Lc	Gv	Sim	Não
GvLc	Gv	Lc	Sim	Não
LgGv	Lg	Gv	Sim	Sim
GvLg	Gv	Lg	Sim	Sim

FONTE: O autor (2024). LEGENDA: Lc - *Lactobacillus crispatus*, Gv - *Gardnerella vaginalis*, Lg - *Lactobacillus gasseri*. LcGv e GvLc - co-cultura de *L. crispatus* com *G. vaginalis*, LgGv e GvLg - co-cultura de *L. gasseri* com *G. vaginalis*.

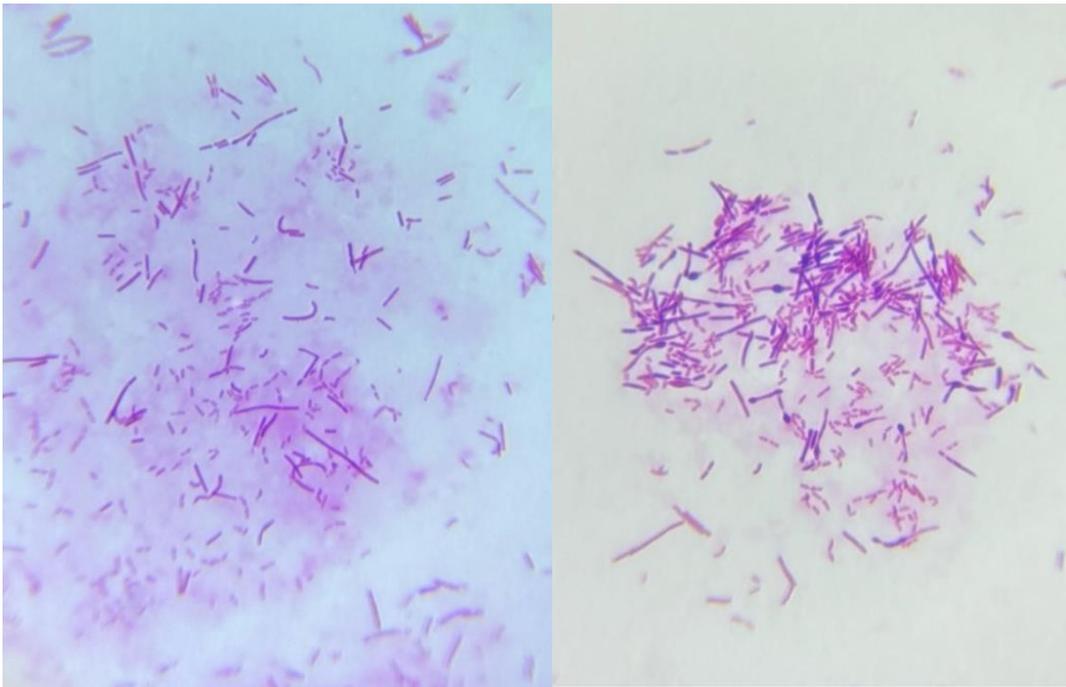
As lâminas de microscopia coradas pelo método de Gram após incubação da co-cultura por 48 horas estão mostradas na FIGURA 8 e FIGURA 9

FIGURA 8. LÂMINAS DE CO-CULTURA DE 48 HORAS DE LcGv E GvLc RESPECTIVAMENTE.



FONTE: O autor (2024). LEGENDA: Lc - *L. crispatus*, Gv - *G. vaginalis*.

FIGURA 9. LÂMINAS DE CO-CULTURA DE 48 HORAS DE LgGv E GvLg RESPECTIVAMENTE.



FONTE: O autor (2024). LEGENDA: Lg - *L. gasseri*, Gv - *G. vaginalis*.

#### 4.2 RESULTADO DO MODELO DE CO-CULTURA COM INÓCULO SIMULTÂNEO

Os resultados obtidos do modelo de co-cultura com inóculo simultâneo de *L. crispatus* com *G. vaginalis* e de *L. gasseri* com *G. vaginalis* estão resumidos no QUADRO 2 e QUADRO 3, respectivamente. Para esse modelo também foi verificado qual o morfotipo predominante nos esfregaços.

QUADRO 2 - RESULTADOS OBTIDOS DO MODELO DE CO-CULTURA COM INÓCULO SIMULTÂNEO DE *L. crispatus* COM *G. vaginalis*

Inóculo <i>Lactobacillus</i> <i>crispatus</i> (Lc)	Inóculo <i>Gardnerella</i> <i>vaginalis</i> (Gv)	Resultado microscopia 48h		Morfotipo predominante na microscopia (após 48h)
		Presença de <i>Lactobacillus</i>	Presença de <i>G. vaginalis</i>	
0,5 McFarland	0,5 McFarland	Sim	Sim	Lc
0,5 McFarland	Diluição 10 <sup>-1</sup>	Sim	Sim	Gv
0,5 McFarland	Diluição 10 <sup>-2</sup>	Sim	Sim	Gv
0,5 McFarland	Diluição 10 <sup>-3</sup>	Sim	Sim	Gv
0,5 McFarland	Diluição 10 <sup>-4</sup>	Sim	Sim	Lc

0,5 McFarland	Diluição $10^{-5}$	Sim	Não	Lc
---------------	--------------------	-----	-----	----

FONTE: O autor (2024). LEGENDA: Lc - *Lactobacillus crispatus*, Gv - *Gardnerella vaginalis*.

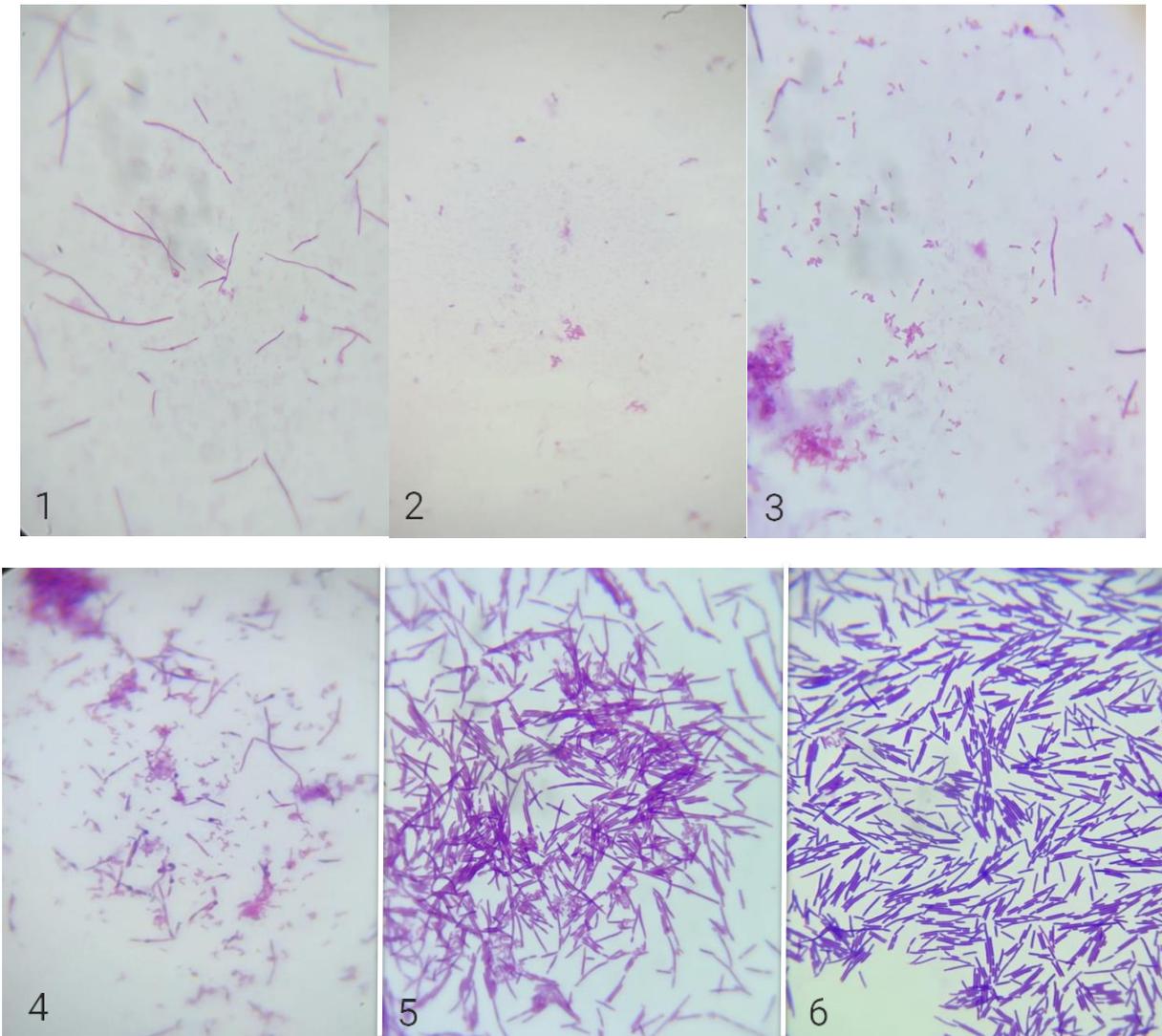
QUADRO 3 - RESULTADOS OBTIDOS DO MODELO DE CO-CULTURA COM INÓCULO SIMULTÂNEO DE *L. gasseri* COM *G. vaginalis*

Inóculo <i>Lactobacillus</i> <i>gasseri</i> (Lg)	Inóculo <i>Gardnerella</i> <i>vaginalis</i> (Gv)	Resultado microscopia após 48h		Morfotipo predominante na microscopia (após 48h)
		Presença de <i>Lactobacillus</i>	Presença de <i>G. vaginalis</i>	
0,5 McFarland	0,5 McFarland	Sim	Sim	Gv
0,5 McFarland	Diluição $10^{-1}$	Sim	Sim	Gv
0,5 McFarland	Diluição $10^{-2}$	Sim	Sim	Gv
0,5 McFarland	Diluição $10^{-3}$	Sim	Sim	Gv
0,5 McFarland	Diluição $10^{-4}$	Sim	Sim	Lg
0,5 McFarland	Diluição $10^{-5}$	Sim	Não	Lg

FONTE: O autor (2024). LEGENDA: Lg - *Lactobacillus gasseri*, Gv - *Gardnerella vaginalis*.

As lâminas de microscopia coradas pelo método de Gram de LcGv, após incubação da co-cultura por 48 horas, estão mostradas na FIGURA 10.

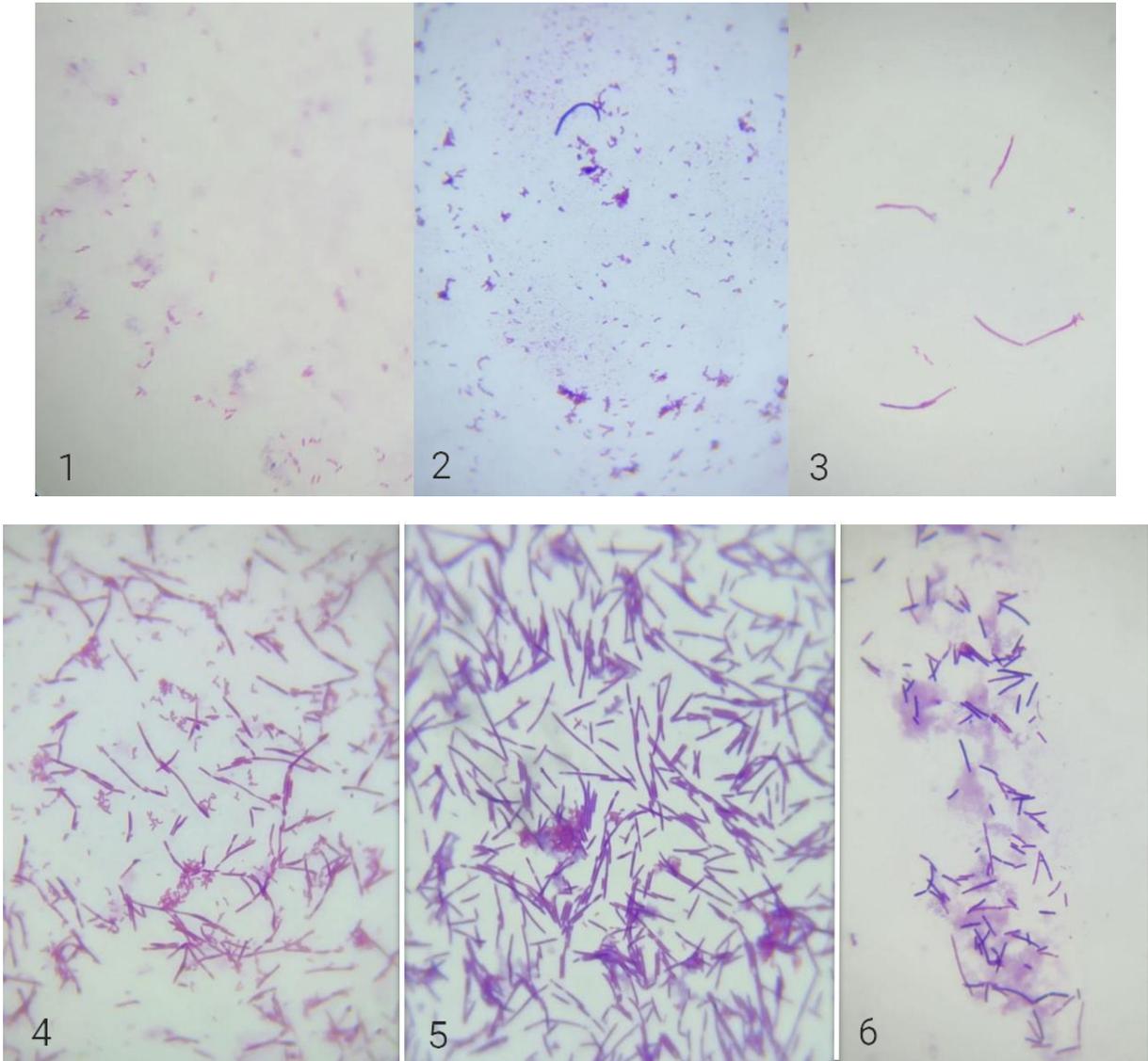
FIGURA 10. CO-CULTURA DE LcGv



FONTE: O autor (2024). LEGENDA: Nas imagens é possível visualizar a co-cultura de *L. crispatus* (Lc) com *G. vaginalis* (Gv). Na imagem 1, Lc está com quantidade de inóculo a 0,5 na escala de McFarland e Gv também está a 0,5 na escala de McFarland. Nas imagens 2, 3, 4, 5 e 6, Lc permaneceu com a quantidade de inóculo a 0,5 na escala de McFarland, enquanto Gv foi diluída a  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , respectivamente.

As lâminas de microscopia coradas pelo método de Gram de LgGv, após incubação da co-cultura por 48 horas, estão mostradas na FIGURA 11.

FIGURA 11. CO-CULTURA DE LgGv



FONTE: O autor (2024). LEGENDA: Nas imagens é possível visualizar a co-cultura de *L. gasseri* (Lg) com *G. vaginalis* (Gv). Na imagem 1, Lg está com quantidade de inóculo de 0,5 na escala de McFarland e Gv também com 0,5 na escala de McFarland. Nas imagens 2, 3, 4, 5 e 6, Lg permaneceu com a quantidade de inóculo a 0,5 na escala de McFarland, enquanto Gv foi diluída a  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ , respectivamente.

### 4.3 DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos, dois modelos de co-cultura foram padronizados. No modelo de co-cultura com inóculo simultâneo é possível testar diferentes quantidades de inóculos através da diluição de uma das cepas bacterianas, a fim de observar diferentes condições da microbiota vaginal, seja testando condições de VB, em que há o predomínio de *G. vaginalis*, seja testando condições de microbiota vaginal saudável, em que há o predomínio de *Lactobacillus* spp. O modelo de co-cultura com inóculo em dois momentos pode ser utilizado com o objetivo de cultivar duas ou mais cepas com a mesma quantidade de inóculo, porém adicionados em momentos diferentes na co-cultura. Como a primeira cepa bacteriana adicionada em monocultura se estabelece primeiramente no ambiente por 24 horas, a interação com a segunda cepa será diferente do observado no modelo de co-cultura com inóculo simultâneo. Dessa forma, ambos os modelos podem contribuir para experimentos de co-cultura, principalmente na testagem de diferentes prebióticos e probióticos, assim como auxiliar na padronização de novos modelos de co-cultura

Os resultados do modelo de co-cultura com inóculo em dois momentos, mostraram que na co-cultura de LcGv e GvLc não foram encontrados morfotipos compatíveis com *G. vaginalis* após 48 horas de incubação, indicando que o *L. crispatus* inibiu completamente a *G. vaginalis*. Isso pode ser explicado por conta dos mecanismos bactericidas produzidos pelo *L. crispatus*, como as bacteriocinas de amplo espectro (PENDHARKAR, 2023). Além disso, o *L. crispatus* é considerado um importante biomarcador de microbiota vaginal saudável, principalmente por ser um ótimo produtor de ácido láctico, o que leva a uma diminuição do pH e deixa o ambiente menos favorável para o crescimento de outras bactérias como a *G. vaginalis* (ARGENTINI, 2022). Em relação às co-culturas de LgGv e GvLg, após 48 horas de incubação ainda haviam morfotipos compatíveis com *L. gasseri* e *G. vaginalis*. A explicação para isso é que provavelmente a cepa *L. gasseri* ATCC 33323 não possui mecanismos inibitórios tão eficientes quanto o *L. crispatus*, que conseguiu inibir o crescimento de *G. vaginalis* de forma eficaz. Porém, alguns estudos indicam que algumas cepas de *L. gasseri* conseguem inibir a *G. vaginalis*. Um estudo conduzido por Atassi et al. (2019) mostraram que as cepas de *L. gasseri* ATCC 9857 e KS 120.1 isoladas da microbiota cervicovaginal de mulheres saudáveis, foram capazes de

exercer atividade bactericida contra a *G. vaginalis*. Segundo um outro estudo publicado por Zhang et al. (2024), a cepa *L. gasseri* VHProbi E09 foi capaz de inibir o crescimento da *G. vaginalis* em cerca de 99%, quando ambas foram inoculadas em co-cultura em uma placa de ágar sangue. Esses estudos confirmam que o *L. gasseri* possui mecanismos inibitórios contra a *G. vaginalis*, dependendo do tipo de cepa isolada.

Os resultados do modelo de co-cultura com inóculo simultâneo mostraram que as co-culturas GvLc e GvLg apresentaram resultados contraditórios e necessitam ser repetidos futuramente para uma maior compreensão dos resultados. Os resultados das co-culturas LcGv e LgGv indicam que tanto o *L. crispatus* como o *L. gasseri* só foram capazes de inibir a *G. vaginalis* quando a mesma foi diluída em  $10^{-5}$ . Uma explicação pouco provável para esse resultado, é que a *G. vaginalis* conseguiu se aderir e formar biofilmes. A formação de biofilmes permite com que a *G. vaginalis* resista a alguns compostos como peróxido de hidrogênio e ácido láctico e consiga sobreviver no ambiente, principalmente quando os *Lactobacillus* spp. estão depletados (MUZNY, 2019). Porém como havia uma maior quantidade de inóculo de *Lactobacillus* spp. na co-cultura, há uma maior produção de compostos inibitórios pelos *Lactobacillus* spp., além da produção de compostos que diminuem a adesão da *G. vaginalis*, não havendo a formação de biofilmes (OJALA, 2014). Já na co-cultura em que a *G. vaginalis* foi diluída  $10^{-4}$ , tanto o *L. crispatus* como o *L. gasseri* predominaram na co-cultura, enquanto a *G. vaginalis* permaneceu viável com alguns morfotipos presentes. Porém, quando a *G. vaginalis* foi diluída  $10^{-5}$ , os *Lactobacillus* spp. não só dominaram o ambiente como inibiram completamente a *G. vaginalis*, demonstrando um ambiente de microbiota vaginal saudável, em que há grande quantidade de *Lactobacillus* spp. presentes.

Por fim, no experimento de co-cultura com inóculo em dois momentos, o *L. crispatus* foi capaz de inibir a *G. vaginalis* quando ambos estavam com quantidades de inóculo similares. Porém, o mesmo não foi observado no modelo de co-cultura com inóculo simultâneo, onde o *L. crispatus* não foi capaz de inibir a *G. vaginalis* quando a mesma estava diluída  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ , por motivos não compreendidos. Já no modelo com inóculo em dois momentos, na co-cultura de *L. gasseri* com *G. vaginalis*, o *L. gasseri* não conseguiu inibir a *G. vaginalis*. Entretanto, no modelo com inóculo simultâneo, o *L. gasseri* conseguiu inibir a *G. vaginalis* quando a mesma

estava diluída  $10^{-5}$ . Uma explicação para isso, é que talvez o *L. gasseri* (cepa ATCC 33323) só consiga inibir efetivamente a *G. vaginalis* quando o mesmo está com mais quantidade de inóculo presente na co-cultura.

## 5 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Dois modelos de co-cultura foram padronizados, um modelo de co-cultura com inóculo em dois momentos e outro modelo de co-cultura com inóculo simultâneo. Ambos os modelos se mostraram promissores e podem contribuir futuramente com a padronização de experimentos destinados à descoberta de novas opções terapêuticas. Além disso, verificou-se que o *L. crispatus* conseguiu inibir a *G. vaginalis* nos dois modelos de co-cultura, enquanto o *L. gasseri* conseguiu inibir a *G. vaginalis* apenas no modelo de co-cultura com inóculo simultâneo, onde a *G. vaginalis* estava diluída  $10^{-5}$ . Por último, foi possível realizar a identificação dos morfotipos encontrados na co-cultura após 48 horas de incubação, através da coloração de Gram e posterior visualização no microscópio óptico.

Para futuros trabalhos, é necessário maior reprodutibilidade dos dois modelos de co-cultura, para uma melhor interpretação dos resultados. Além disso, para os futuros modelos de co-cultura, será interessante comparar os modelos de co-cultura através de testes estatísticos, a partir da análise do tempo de incubação com a inibição da cepa bacteriana. Outra recomendação consiste em simular modelos com formação de biofilmes e adição de mais bactérias relacionadas a VB, assim como ocorre na fisiopatologia da VB (CASTRO, 2019). A adição da *Prevotella bivia* adicionaria uma maior complexidade à co-cultura, pois a mesma interage diretamente com a *Gardnerella vaginalis* durante a VB (PELAYO, 2024). Com isso, o experimento se aproximará de um modelo *in vitro* mais complexo para o estudo da VB e, conseqüentemente, para o estudo e descoberta de novas opções terapêuticas.

## REFERÊNCIAS

- ABOU CHACRA, L.; FENOLLAR, F.; DIOP, K. Bacterial Vaginosis: What Do We Currently Know? **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 18 jan. 2022.
- ALGBURI, A. et al. Gemini Cationic Amphiphiles Control Biofilm Formation by Bacterial Vaginosis Pathogens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 12, 22 nov. 2017.
- ARGENTINI, C. et al. Evaluation of Modulatory Activities of *Lactobacillus crispatus* Strains in the Context of the Vaginal Microbiota. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 2, 27 abr. 2022.
- ATASSI, F.; PHO VIET AHN, D. L.; LIEVIN-LE MOAL, V. Diverse Expression of Antimicrobial Activities Against Bacterial Vaginosis and Urinary Tract Infection Pathogens by Cervicovaginal Microbiota Strains of *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus crispatus*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 20 dez. 2019.
- ATCC. ATCC: The Global Bioresource Center. Disponível em: <<https://www.atcc.org/>>.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST)**. Brasília, 2018, p. 104 – 106.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. **Técnica de Coloração de GRAM**. Brasília, 2001.
- CAMARGO, K. C. DE; ALVES, R. R. F.; SADDI, V. A. Prevalence and factors associated with bacterial vaginosis in women in Brazil: a systematic review. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 35, 2023.
- CASTRO, J.; MACHADO, D.; CERCA, N. Unveiling the role of *Gardnerella vaginalis* in polymicrobial Bacterial Vaginosis biofilms: the impact of other vaginal pathogens living as neighbors. **The ISME Journal**, v. 13, n. 5, p. 1306–1317, 22 jan. 2019.
- CHEE, W. J. Y.; CHEW, S. Y.; THAN, L. T. L. Vaginal microbiota and the potential of *Lactobacillus* derivatives in maintaining vaginal health. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 203, 2020.
- COUDRAY, M. S.; MADHIVANAN, P. Bacterial vaginosis - A brief synopsis of the literature. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 245, n. 2, p. 143–148, fev. 2020.
- DE GREGORIO, P. R. et al. Biosurfactant from vaginal *Lactobacillus crispatus* BC1 as a promising agent to interfere with Candida adhesion. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, 18 jun. 2020.

HICKEY, R. J.; FORNEY, L. J. *Gardnerella vaginalis* does not always cause Bacterial Vaginosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 10, p. 1682–1683, 22 maio 2014.

KALIA, N.; SINGH, J.; KAUR, M. Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: a critical review. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 19, n. 1, 28 jan. 2020.

LACHYAN, A.; KHUNGER, N.; PANDA, P. S. Bacterial vaginosis and biofilms: Therapeutic challenges and innovations – A narrative review. **Indian Journal of Dermatology Venereology and Leprology**, v. 0, p. 1–5, 3 jul. 2024.

MACHADO, A.; JEFFERSON, K.; CERCA, N. Interactions between *Lactobacillus crispatus* and Bacterial Vaginosis (BV)-Associated Bacterial Species in Initial Attachment and Biofilm Formation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 12004–12012, 5 jun. 2013.

MARTIN, HAROLD L. et al. Vaginal Lactobacilli, Microbial Flora, and Risk of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Sexually Transmitted Disease Acquisition. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, n. 6, p. 1863–1868, dez. 1999.

MEI, Z.; LI, D. The role of probiotics in vaginal health. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 28 jul. 2022.

MUZNY, C. A. et al. An Updated Conceptual Model on the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 220, n. 9, p. 1399–1405, 1 ago. 2019.

O'HANLON, D. E.; MOENCH, T. R.; CONE, R. A. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, 19 jul. 2011.

O'HANLON, D. E.; COME, R. A.; MOENCH, T. R. Vaginal pH measured in vivo: lactobacilli determine pH and lactic acid concentration. **BMC Microbiology**, v. 19, n. 1, 14 jan. 2019.

OJALA, T. et al. Comparative genomics of *Lactobacillus crispatus* suggests novel mechanisms for the competitive exclusion of *Gardnerella vaginalis*. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 1070, 2014.

RAVEL, J. et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. Supplement 1, p. 4680–4687, 3 jun. 2010.

PELAYO, P. et al. *Prevotella* are major contributors of sialidases in the human vaginal microbiome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 121, n. 36, 26 ago. 2024.

PENDHARKAR, S. et al. Lactobacilli and Their Probiotic Effects in the Vagina of Reproductive Age Women. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 636, 1 mar. 2023.

ROSCA, A. S. et al. *Gardnerella* and vaginal health: the truth is out there. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 44, n. 1, p. 73–105, 7 nov. 2019.

ROSE, W. A. et al. Commensal Bacteria Modulate Innate Immune Responses of Vaginal Epithelial Cell Multilayer Cultures. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. e32728, 7 mar. 2012.

SAVICHEVA, A. M. et al. Vaginal Microbiota Molecular Profiling in Women with Bacterial Vaginosis: A Novel Diagnostic Tool. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 21, p. 15880–15880, 1 nov. 2023.

SCHWEBKE, J. R.; MUZNY, C. A.; JOSEY, W. E. Role of *Gardnerella vaginalis* in the Pathogenesis of Bacterial Vaginosis: A Conceptual Model. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 3, p. 338–343, 7 fev. 2014.

SPEAR, G. T. et al. Human  $\alpha$ -amylase Present in Lower-Genital-Tract Mucosal Fluid Processes Glycogen to Support Vaginal Colonization by *Lactobacillus*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 7, p. 1019–1028, 15 abr. 2014.

TAKADA, K. et al. *Lactobacillus crispatus* accelerates re-epithelialization in vaginal epithelial cell line MS74. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 80, n. 3, 24 ago. 2018.

UMER, A. A. Review on the Role of Biofilm Formation in Bacterial Pathogenesis. **Austin journal of veterinary science & animal husbandry**, v. 10, n. 1, 7 fev. 2023.

VANEECHOUTTE, M. et al. Emended description of *Gardnerella vaginalis* and description of *Gardnerella leopoldii* sp. nov., *Gardnerella piovii* sp. nov. and *Gardnerella swidsinskii* sp. nov., with delineation of 13 genomic species within the genus *Gardnerella*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 679–687, 1 mar. 2019.

VODSTRCIL, L. A. et al. Bacterial vaginosis: drivers of recurrence and challenges and opportunities in partner treatment. **BMC Medicine**, v. 19, n. 1, 2 set. 2021.

VONGSA, R. A. et al. In vitro evaluation of nutrients that selectively confer a competitive advantage to lactobacilli. **Beneficial Microbes**, v. 7, n. 2, p. 299–304, 11 mar. 2016.

WIESENFELD, H. C. et al. Bacterial Vaginosis Is a Strong Predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* Infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 5, p. 663–668, mar. 2003.

ZHANG, J. et al. Characterization of a *Lactobacillus gasseri* strain as a probiotic for female vaginitis. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, 23 jun. 2024.