UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito da utilização de culturas láticas probióticas na microbiota vaginal de pacientes acometidas por infecções bacterianas e fúngicas

RAFAEL CHACON RUIZ MARTINEZ

Ribeirão Preto

2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito da utilização de culturas láticas probióticas na microbiota vaginal de pacientes acometidas por infecções bacterianas e fúngicas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, para obtenção do Título de Doutor em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientado: Rafael Chacon Ruiz Martinez

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis

Ribeirão Preto

2008

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Martinez, Rafael Chacon Ruiz
Efeito da utilização de culturas láticas probióticas na microbiota vaginal de pacientes acometidas por infecções bacterianas e fúngicas. Ribeirão Preto, 2008.
213 p. : il. ; 30 cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.
Orientadora: De Martinis, Elaine Cristina Pereira.

1. Bactérias láticas. 2. *Lactobacillus*. 3. Probióticos 4. Candidíase vulvovaginal. 5. Fluconazol. 6. Vaginose Bacteriana. 7. Tinidazol. 8. Citocinas.

Autor: Rafael Chacon Ruiz Martinez
Título: Efeito da utilização de culturas láticas probióticas na microbiota vaginal de pacientes acometidas por infecções bacterianas e fúngicas

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, para obtenção do Título de Doutor em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A Deus.

À minha família, meu porto seguro,

que sempre me acolheu, apoiou e inspirou.

Dedico

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela proteção, conforto espiritual, luz e amor imensurável, demonstrado nas mais diversas formas e em inúmeros momentos desta caminhada. Sem a Vossa presença Senhor, este momento tão especial seria impossível!

À Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis por ter me recebido de braços abertos em seu laboratório desde a época de estágio de iniciação. Sou grato pela confiança em mim depositada, disponibilidade, orientação e sugestões tão valiosas em todos os momentos deste trabalho.

To Prof. Gregor Reid, Ph.D: thanks a lot for your inestimable cooperation since the initial step of elaboration of this work. I really appreciate your assistance for the developing of this work, and also am grateful for your help in the analysis of the obtained data. I am thankful for such a warm welcoming received at the Lawson Health Research Institute – University of Western Ontario (LHRI-UWO) (London, Ontario, Canada) where I took part of my thesis activities, under your supervision, from May 31st (2007) to February 29th (2008). During that stage abroad I could learn and employ, among others, a culture-independent method for the analysis of vaginal lactobacilli populations [Polymerase chain reaction - Amplified ribossomal DNA restriction analysis – (PCR-DGGE)] and perform *in vitro* experiments with vaginal epithelial cells, *Candida* and lactobacilli. I also acknowledge you for the wondrous opportunity to work in such a friendly and high-concepted place, which has provided me invaluable cientific and human maturing.

Aos médicos, Ms. Sílvio Antônio Franceschini, Dra. Maristela Carbol Patta e Dra. Silvana Maria Quintana, responsáveis pelos atendimentos ginecológicos e pela supervisão da coleta de informações e espécimes clínicos.

Agradeço especialmente ao Ms. Sílvio A. Franceschini, por ter colaborado de maneira tão ativa no delineamento deste trabalho, bem como pelo auxílio no cumprimento dos trâmites legais relacionados ao Comitê de Ética.

Ao Prof. Álvaro Cantini Nunes do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG) – Belo Horizonte, pela disponibilidade e ótimo treinamento prestado durante as duas etapas de estágio realizadas sob sua supervisão, nos meses de fevereiro de 2006 e maio de 2007, para identificação molecular de isolados de lactobacilos pela técnica de PCR-ARDRA (Reação em cadeia da polimerase – Analise de Restrição do DNA ribossomal amplificado). Também sou grato ao aluno de Pós-Graduação do ICB-UFMG, João Luiz Silva Moreira (orientado do Prof. Álvaro C. Nunes) por ter me auxiliado tão prontamente nesta mesma tarefa.

À Profa. Dra. Regina Celia Candido, docente da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) e sua técnica de laboratório, Joseane Cristina Ferreira, pela colaboração na identificação bioquímica de leveduras do gênero *Candida* isoladas neste trabalho.

To Prof. Kelly Summers, Ph.D from UWO and her laboratory technician, Shannon Seney, thanks for your help in the design, standardization and performance of experiments with culture cells and measurement of cytokines.

To Prof. Peter Cadieux, Ph.D from UWO, I'm grateful for the VK2/E6E7 cells kindly donated from you for the performance of our *in vitro* experiments at the LHRI.

To Prof. Larry Stitt, Ms. from UWO: thank you for your help with the statistical analysis of our data.

To the researchers from the DNA Sequencing Facility at the John P. Robarts Research Institute – UWO: I acknowledge for your precious and excellent analysis performed whenever required.

To Prof. Andrew Bruce, Ph.D, from the University of Toronto (Ontario, Canada): I appreciate your input in the design of part of this project.

Ao Prof. Dr. Auro Nomizo, docente da FCFRP-USP pela ajuda na interpretação dos resultados obtidos a partir dos experimentos sobre a quantificação de diferentes citocinas estudadas.

A todos os integrantes do corpo de enfermagem, bem como médicos residentes e contratados do Centro de Saúde Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CSE-FMRP)-USP (em especial à Dra. Flavia Maciel de Aguiar), Hospital das Clínicas (HC)-FMRP-USP, Sistema Integrado de Saúde (SIS)-USP e Centro de Saúde Vila Lobato (CSVL)-FMRP-USP, e aos alunos dos 5° e 6° anos do curso de Ciências Médicas da FMRP–USP. Muito obrigado por terem me acolhido e introduzido de maneira tão agradável na “rotina” de atendimento às pacientes; proporcionando-me inclusive, a oportunidade de desenvolver e aprimorar habilidades importantes para atuar em equipe multidisciplinar. Sou grato pela colaboração na triagem das voluntárias, agendamento de consultas e coleta de informações e amostras clínicas, os quais foram essenciais para a realização deste trabalho. Agradeço também o intercâmbio de conhecimentos científicos e os momentos de descontração que me foram proporcionados, os quais tornaram todas aquelas manhãs e tardes em que acompanhei a rotina de serviços de saúde na cidade de Ribeirão Preto mais leves, humanos e prazerosos para mim.

Às pacientes que integraram este estudo, pela doação de tempo, paciência e interesse na colaboração. Vocês foram imprescindíveis para a concretização deste estudo! MUITÍSSIMO OBRIGADO!

Agradeço aos meus queridos pais Angela e Antonio pelo apoio e incentivo incondicional em todos os momentos de minha vida. Em especial, agradeço-lhes pela confiança e carinho em mim depositados, bem como os ensinamentos e valores que me foram transmitidos durante a vida, incluindo a importância da organização, paciência, dedicação e persistência, como forma de contínuo auto-aperfeiçoamento.

À minha irmã Raquel e ao meu irmão Renan por todos os momentos de alegrias, dúvidas, garra e sonhos que compartilhamos, os quais nos tornaram mais fortes e ao mesmo tempo influenciaram positivamente na condução do presente trabalho.

Aos meus queridos avós, que foram, são e serão exemplos de otimismo pela vida, dignidade e simplicidade.

À minha prima Daniela Chacon pelo estímulo e por todos os momentos tão divertidos, bem como a todos meus familiares.

A todos os amigos do ex-Coral da Aliança Francesa de Ribeirão Preto, especialmente Helena e Ana Cláudia, pelos encontros inusitados e pelas conversas sempre cheias de magia e entusiasmo.

Ao meu cunhado Marcio Matsumoto pela amizade e à Sabrina Sasaki pela simpatia e alto astral.

A todos os amigos da saudosa 74ª turma do curso de Farmácia-Bioquímica da FCFRP-USP: vocês são muito queridos e serão sempre lembrados com carinho!

Aos amigos do laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCFRP-USP: Bruna, Virgínia, Regiane, Carlos Eduardo, Claudia, Carolina, Lizziane, Maria Aparecida, Natália, Fernanda, Marina, Thamiris, Fabrício, Vanessa Odoríssio, Marta e Patrícia, pelo companheirismo, momentos de descontração e ensinamento mútuo.

À técnica Vanessa Maciel por ter me introduzido a rotina de trabalho e as principais técnicas microbiológicas empregadas em nosso laboratório desde a época em que passei a freqüentá-lo, no início de 2002; bem como pelas dicas de informática tão valiosas, utilizadas na confecção deste trabalho.

Aos “vizinhos” e amigos do Laboratório de Física Industrial da FCFRP-USP, especialmente Claudia e Rubiana, pelos momentos de alto astral, incentivo e confraternização e ao Prof. Dr. Wanderley Pereira de Oliveira, pela paciência e coleguismo.

Aos amigos de longa data, especialmente Bruno, Gabriel, Iara, Maria, Fernanda, Maria Júlia e Melina, pela companhia, bom humor, disposição e por tantas experiências positivas compartilhadas ao longo de tantos anos.

To Kate Crowley, the technician from the laboratory of Prof. Gregor Reid at the LHRI: I'm really grateful for your sincere friendship, help and companionship throughout the performance of my experiments.

To my friends from Canada: Jessica, Louis, Yao Chang, Amitt, Adam, Diana, Tara, Jeremy, Simon, Vince, Jaimie, Kingsley, Nara, Jacklyn, Lauren, Hoda, Rajesh, Jaspreet, Patrick, Jung Hwa, Alicia, Madeleine, Jeff, and Emily: many thanks for your complicity, patience and friendship. I leave registered here my sincere acknowledgments for all you guys, while tender remembrances pass through my mind.

Aos funcionários da equipe de segurança do Bloco Q, Maria Aparecida, Cristiane, Angela, Luís e Francisco e àqueles do serviço de limpeza do mesmo, Valdirene, Daniel e Maura, entre outros. Muito obrigado pela atenção dispensada, companhia e ótimos serviços prestados durante a execução de meu projeto.

To the secretary Lesley Carmichael from the LHRI: thanks so much for your availability, empathy and precious help whenever required.

Às funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação da FCFRP-USP: Ana Lúcia Turatti Barbosa, Eleni Angeli Passos, Rosana Ferreira Leite dos Santos Florencio e ao ex-funcionário desta mesma Seção, Carlos Armando Flausino da Silva, pela colaboração e disponibilidade, sempre que solicitados.
Às secretárias do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas (DACTB) da FCFRP-USP, Lúcia Helena Ignácio Sassi e Sandra Helena Abbade Reis, pela competência, disponibilidade, atenção dispensada e simpatia.

Ao Diretor da FCFRP-USP, Prof. Dr. Augusto César Cropanese Spadaro, e ao Chefe do DACTB-FCFRP, Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque, pelo suporte administrativo prestado, o qual foi imprescindível para a plena realização deste trabalho.

To Christian Hansen (Denmark): many thanks for the donation of the probiotic and placebo capsules used in this study.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelas bolsas de Iniciação Científica (Processo n° 02/05672-2 e respectiva renovação) e Doutorado Direto (Processo n° 04/14580-0) que me foram concedidas e pelo auxílio pesquisa obtido para financiamento deste trabalho (Processo n° 06/06595-2).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de Estágio de Doutorando no Exterior (Processo BEX n° 6159/06-2).

To the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC): I am thankful for the financial grant that supported my experimental activities at the LHRI.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste sonho.

“No meio de qualquer dificuldade encontra-se a oportunidade”

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

Resumo ..... **i**
Abstract ..... **iii**
Lista de figuras ..... **v**
Lista de tabelas ..... **xiv**
Lista de abreviaturas e siglas ..... **xvii**
Lista de símbolos ..... **xx**

1. INTRODUÇÃO **1**
1.1 Microbiota vaginal normal 3
1.1.1 Lactobacilos, taxonomia e prevalência no epitélio vaginal 4
1.1.2 Leveduras do gênero *Candida*, taxonomia e prevalência no epitélio vaginal 8
1.2 Infecções urogenitais 10
1.2.1 Infecções do trato urinário 10
1.2.2 Candidíase vulvovaginal 11
1.2.2.1 Tratamento farmacológico de candidíase vulvovaginal 16
1.2.2.2 Candidíase vulvovaginal e resposta imune do hospedeiro 19
1.2.3 Vaginose bacteriana 21
1.2.3.1 Tratamento farmacológico de vaginose bacteriana 26
1.3 Probióticos 31
1.3.1 Definição 31
1.3.2 Vantagens e efeitos benéficos gerais da utilização de probióticos 31
1.3.3 Características de lactobacilos para utilização como culturas probióticas em infecções vaginais 32
1.3.3.1 Adesão a células epiteliais vaginais 33
1.3.3.2 Peróxido de hidrogênio 33
1.3.3.3 Ácidos orgânicos 34
1.3.3.4 Bacteriocinas 35
1.3.3.5 Biosurfactantes 37
1.3.3.6 Moléculas de auto e co-agregação 38
1.3.3.7 Arginina desaminase 38
1.3.4 Cepas de BAL estudadas para aplicação como culturas probióticas em infecções do trato urogenital 40
1.3.4.1 Estudos sobre a utilização de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 para o tratamento/prevenção de infecções urogenitais 40
1.3.4.2 Outros estudos sobre a utilização de BAL no controle/prevenção de infecções vaginais 42

2. RELEVÂNCIA DO PRESENTE ESTUDO 46
3. OBJETIVOS 48
3.1 Objetivo geral 49
3.2 Objetivos específicos 49
4. MATERIAIS E MÉTODOS 50
4.1 Microrganismos probióticos 51
4.2 Aspectos éticos, recrutamento de pacientes e equipe médica participante 51
4.3 Procedimentos clínicos e laboratoriais adotados durante a consulta ginecológica 52
4.4 Randomização do tratamento e consulta ginecológica para reavaliação 53
4.5 Caracterização de *Candida* spp. e *Lactobacillus* spp. a partir das amostras vaginais 55
4.5.1 *Candida* spp. 55
4.5.2 *Lactobacillus* spp. 56
4.5.2.1 PCR-ARDRA (MOREIRA et al., 2005) 57
4.5.2.1.1 Pré-tratamento das amostras e extração de DNA total 57
4.5.2.1.2 Amplificação por PCR da região gênica correspondente à fração 16S-23S do RNAr 58
4.5.2.1.3 Digestões com enzimas de restrição 59
4.5.2.2 Produção de H_2O_2 pelos isolados de lactobacilos 61
4.5.2.3 PCR-DGGE (WALTER et al., 2000) 62
4.5.2.3.1 Extração de DNA das zaragatoas 62
4.5.2.3.2 Amplificação do DNA através da reação de PCR 62
4.5.2.3.3 Preparação dos géis para DGGE 63
4.5.2.3.4 Excisão das bandas dos géis de DGGE, reamplificação e seqüenciamento 64
4.5.2.4 Pesquisa de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 em amostras vaginais ... 65
4.6 Avaliação do efeito *in vitro* de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 na modulação de infecção vaginal por *C. albicans* 66
4.6.1 Linhagem celular epitelial humana 66
4.6.2 Linhagens de lactobacilos 66
4.6.3 Linhagem de *C. albicans* 67
4.6.4 Modelo *in vitro* para candidíase vaginal e desenho do estudo de desafio 67
4.6.5 Quantificação das populações de células VK2/E6E7, *C. albicans* e lactobacilos 68
4.6.6 Coleta do sobrenadante para quantificação de citocinas e quimiocinas 68

4.7 Análise estatística 69
5. RESULTADOS 71
5.1 Características demográficas e comportamentais dos três grupos de pacientes integrantes deste estudo 72
5.2 Isolamento, enumeração e identificação de *Lactobacillus* spp. através da técnica de PCR-ARDRA e comparação com os resultados obtidos com a técnica independente de cultivo, PCR-DGGE 73
5.3 Produção de H_2O_2 pelos isolados de lactobacilos 89
5.4 Isolamento e identificação de leveduras do gênero *Candida* 92
5.5 Avaliação da eficácia da utilização dos microrganismos probióticos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 e medicamento antimicrobiano nas pacientes diagnosticadas com CVV 95
5.6 Avaliação da eficácia da utilização dos microrganismos probióticos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 e tratamento antimicrobiano nas pacientes diagnosticadas com VB 100
5.7 Pesquisa de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 105
5.8 Resultados dos experimentos *in vitro* para avaliação do efeito de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 na modulação de infecção vaginal por *C. albicans* 106
6. DISCUSSÃO 113
6.1 Caracterização de *Lactobacillus* spp. a partir das amostras vaginais obtidas 114
6.1.1 Determinação semi-quantitativa da produção de H_2O_2 por lactobacilos vaginais 119
6.2 Caracterização de *Candida* spp. a partir das amostras vaginais obtidas 122
6.3 Tratamento de CVV com fluconazol e microrganismos probióticos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14: estudo duplo-cego, placebo-controlado 125
6.4 Tratamento de VB com tinidazol e microrganismos probióticos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14: estudo duplo-cego, placebo-controlado 129
6.5 Pesquisa de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 em amostras vaginais 134
6.6 Avaliação do efeito *in vitro* de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 na modulação de infecção vaginal por *C. albicans* 136
7. CONCLUSÕES 140
8. REFERÊNCIAS 143
APÊNDICES 181
ANEXOS 209

RESUMO

MARTINEZ, R. C. R. **Efeito da utilização de culturas láticas probióticas na microbiota vaginal de pacientes acometidas por infecções bacterianas e fúngicas.** 2008. 213f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A microbiota vaginal saudável é constituída, majoritariamente, por espécies de lactobacilos que representam uma barreira natural contra microrganismos causadores de doenças como a candidíase vulvovaginal (CVV), vaginose bacteriana (VB) e infecções do trato urinário (ITU), que juntas acometem cerca de um bilhão de mulheres no mundo anualmente. Um melhor entendimento da ecologia microbiana vaginal pode ser útil na otimização de tratamentos existentes para as infecções urogenitais, os quais podem destruir parcialmente a microbiota autóctone, predispor a novas infecções, contribuir para a seleção de microrganismos resistentes e causar efeitos colaterais indesejáveis. A utilização de microrganismos certificadamente probióticos, *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 e *Lactobacillus reuteri* RC-14, representa uma alternativa terapêutica promissora na abordagem de VB e CVV, uma vez que são capazes de colonizar o trato vaginal, apresentam atividade inibitória frente a diversos patógenos do trato urogenital, exibem risco mínimo para a seleção de microrganismos resistentes e podem auxiliar na restauração da microbiota vaginal. Os objetivos deste trabalho foram: (i) avaliar a prevalência de espécies de lactobacilos na microbiota vaginal de mulheres saudáveis e diagnosticadas com infecções vaginais (CVV e VB) da cidade de Ribeirão Preto (São Paulo, Brasil), (ii) avaliar a capacidade de isolados de lactobacilos produzirem peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e (iii) determinar a eficácia da utilização de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 no tratamento de CVV e VB, quando co-administrados com medicamentos antimicrobianos tradicionais. Participaram deste estudo, 196 pacientes voluntárias, atendidas por médicos ginecologistas de centros de saúde ligados à Universidade de São Paulo, *campus* de Ribeirão Preto (64 saudáveis, 68 diagnosticadas com CVV e 64 diagnosticadas com VB) e duas amostras vaginais de cada paciente foram coletadas com o auxílio de zaragatoas esterilizadas. Uma zaragatoa foi utilizada para semeadura em ágar MRS (de Man, Rogosa & Sharpe), os isolados de bactérias láticas obtidos foram analisados através da técnica de PCR-ARDRA (Reação em cadeia da polimerase – Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado) e a habilidade de *Lactobacillus* spp. produzir H_2O_2 foi determinada semi-quantitativamente. A outra zaragatoa foi utilizada para a análise das espécies de lactobacilos da microbiota vaginal pela técnica independente de cultivo PCR-DGGE (Reação em cadeia da polimerase – Eletroforese em gel de gradiente de desnaturação). As leveduras do gênero *Candida* foram obtidas através da semeadura das amostras vaginais provenientes de pacientes saudáveis e com CVV no meio Chromagar® Candida e identificadas através de provas bioquímicas de referência. As pacientes diagnosticadas com CVV participaram de um estudo randomizado, duplo-cego, placebo-controlado e foram tratadas com dose única de fluconazol (150mg) e suplementação diária durante 28 dias com (i) duas cápsulas contendo os microrganismos probióticos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 (Urex-Cap-5®) ou (ii) duas cápsulas de placebo. As pacientes com VB também participaram de um estudo randomizado, duplo-cego, placebo-controlado e foram tratadas com dose única de tinidazol (2g) e suplementação diária com cápsulas do probiótico (Urex-Cap-5®) ou placebo, conforme descrito acima. Todas as pacientes foram reavaliadas ao final do tratamento, no 28º dia. Foram realizados experimentos para averiguar o possível efeito de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 na modulação *in vitro* da infecção por *Candida albicans* em culturas de células

epiteliais vaginais humanas (VK2/E6E7) Os resultados mostraram que, pela técnica de PCR-ADRA, *L. crispatus* foi a espécie mais prevalente nos grupos de pacientes saudáveis (37,0%) e com CVV (35,9%), enquanto que *L. gasseri* foi predominante no grupo de pacientes com VB (34,6%). De acordo com o método de PCR-DGGE, *L. iners* foi o microrganismo mais prevalente nos três grupos de pacientes avaliados: saudáveis, com CVV e VB (48,7%, 44,7% e 65,0%, respectivamente). A maioria dos isolados de *Lactobacillus* spp. obtidos nos grupos de pacientes saudáveis (98,6%) e diagnosticadas com CVV (97,4%) foram capazes de produzir H_2O_2 (1 a 100mg/L), em comparação a apenas 68,2%, determinado no grupo de pacientes com VB (p<0,05). *L. crispatus* e *L. johnsonii* produziram as maiores quantidades médias de H_2O_2 (≥30mg/L). A taxa de colonização por leveduras do gênero *Candida* foi de 26,6% no grupo de pacientes saudáveis (*C. albicans* correspondeu a 52,4% de todos os isolados), enquanto que no grupo de pacientes com CVV, 89,2% dos isolados leveduriformes foram identificados como *C. albicans*. Para as análises estatísticas dos dados obtidos com os testes clínicos, foram consideradas 55 pacientes diagnosticadas com CVV (pela presença de sinais e sintomas da infecção e cultura positiva para *Candida* sp.) e foi observado que a utilização de dose única de fluconazol e suplementação diária com o probiótico, resultou em taxa de cura mais elevada para a infecção (89,7%) em comparação com aquela verificada no grupo placebo (65,4%) (p<0,05). A utilização de tinidazol em associação com a ingestão diária de Urex-Cap-5® no tratamento de pacientes com VB também resultou em taxa de cura mais elevada para a condição (87,5%), em comparação àquela observada no grupo placebo (50,0%) (p<0,05). A atividade anti-*Candida* de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 foi observada através do modelo *in vitro* para infecção vaginal. Em conclusão, quando as técnicas de PCR-ARDRA e PCR-DGGE foram comparadas entre si, foi observado que ambas apresentaram limitações, evidenciando a importância do emprego de diferentes metodologias para avaliação adequada das espécies de lactobacilos presentes na microbiota vaginal. As espécies de lactobacilos vaginais determinadas nas mulheres saudáveis do presente trabalho foram semelhantes àquelas verificadas em estudos prévios descritos na literatura com pacientes com dieta e localização geográfica notadamente distintas. Os dados do presente trabalho sugerem que a presença de lactobacilos produtores de H_2O_2, isoladamente, não confere proteção contra CVV, enquanto que a ausência desses microrganismos pode ser um fator contribuinte para VB. Além disso, foi demonstrado que a utilização de medicamentos antimicrobianos tradicionais e suplementação com os microrganismos probióticos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 foi mais eficiente no tratamento de CVV e VB em comparação com medicamentos clássicos e placebo. Estes resultados podem contribuir para prolongar a vida útil de medicamentos cuja eficácia pode ser comprometida devido à seleção de microrganismos resistentes e também reduzir o tempo de tratamento para pacientes que necessitam de terapias clássicas por períodos prolongados.

Palavras-chave: Bactérias láticas, *Lactobacillus*, probióticos, candidíase vulvovaginal, fluconazol, vaginose bacteriana, tinidazol, citocinas.

ABSTRACT

MARTINEZ, R. C. R. **Effect of lactic acid probiotic cultures utilization on the vaginal microbiota of women diagnosed with bacterial and fungal infections.** 2008. 213p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

The vaginal microbiota is mainly constituted by lactobacilli species, which represent a natural barrier against microorganisms that cause vulvovaginal candidiasis (VVC), bacterial vaginosis (BV), and urinary tract infections (UTI). Together, these conditions afflict each year an estimated one billion women worldwide. A better understanding of the vaginal microbial ecology may be useful to improve the current available treatments for urogenital infections, which can partially destroy the autochthonous microbiota, predispose to other infections, contribute for the selection of resistant microorganisms and cause undesirable collateral effects. The use of microorganisms with demonstrated probiotic properties, *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14, represents a promising therapeutic alternative for BV and VVC, since they are able to colonize the vaginal tract, present inhibitory against several urogenital pathogens, pose minimal risk for the selection of resistant microorganisms and can help to restore the vaginal microbiota. The objectives of this work were: (i) to evaluate the prevalence of lactobacilli species in the vaginal microbiota of healthy women and those diagnosed with vaginal infections (VVC and BV) in the city of Ribeirão Preto (São Paulo, Brazil), (ii) to evaluate the ability of the lactobacilli isolates to produce hydrogen peroxide (H_2O_2) and (iii) to determine the efficacy of the use of *L. rhamnosus* GR-1 and *L. reuteri* RC-14 in the treatment of VVC and BV, in co-administration with traditional antimicrobials. 196 voluntary subjects were examined by the gynecologists team from health centers affiliated with Universidade de São Paulo, campus at Ribeirão Preto (64 healthy, 68 diagnosed with VVC and 64 diagnosed with BV) and two vaginal samples from each patient were collected by the use of two sterile swabs. One swab was cultured in MRS (de Man, Rogosa & Sharpe) agar, the isolates of lactic acid bacteria obtained were analyzed by PCR-ARDRA (Polymerase chain reaction - Amplified ribosomal DNA restriction analysis) and the ability of *Lactobacillus* spp. to produce hydrogen peroxide was determined semi-quantitatively. The other swab was used for the analysis of lactobacilli species from the vaginal microbiota using the culture-independent PCR-DGGE (Polymerase chain reaction – Denaturating gradient gel electrophoresis). The yeasts belonging to *Candida* genus were obtained also by culturing the vaginal material from healthy and VVC patients in Chromagar® Candida and were identified by standard biochemical tests. VVC patients were enrolled in a randomized, double-blind, placebo-controlled trial and treated with a single dose fluconazole (150mg) and daily supplementation for 28 days with (i) two capsules containing the probiotic microorganisms *L. rhamnosus* GR-1 and *L. reuteri* RC-14 (Urex-Cap-5®) or (ii) two placebo capsules. BV patients were also enrolled in a randomized, double-blind, placebo controlled trial and treated with a single dose of tinidazole (2g) and supplementation with probiotic capsules (Urex-Cap-5®) or placebo, as described above. All patients were re-evaluated at the end of treatment, on the 28th day. Experiments were also conducted to assess the possible effect of *L. rhamnosus* GR-1 and *L. reuteri* RC-14 in the *in vitro* modulation of vaginal infection by *Candida albicans* on cultures of human vaginal epithelial cells (VK2/E6E7). The results revealed that according to PCR-ADRA, *L.crispatus* was the most prevalent species in the groups of healthy women (37.0%) and those with VVC (35.9%), while *L. gasseri* was dominant in BV patients (34.6%). By PCR-DGGE method, *L. iners* was the most prevalent *Lactobacillus* species in all the three groups evaluated: healthy,

VVC and BV (48.7%, 44.7% and 65.0%, respectively). The majority of the isolates of *Lactobacillus* spp. from healthy women (98.6%) and those with VVC (97.4%) were able to produce H_2O_2 (1 to 100mg/L) in comparison with only 68.2% assessed for the BV group ($p<0.05$). *L. crispatus* and *L. johnsonii* produced the highest average levels of H_2O_2 (≥30mg/L). Colonization rate by yeasts belonging to *Candida* genus was 26.6% in the group of healthy patients (*C. albicans* represented 52.4% of all isolates), whereas in the VVC group, 89.2% of yeast isolates were identified as *C. albicans*. For the performance of statistical analysis of the results obtained with the clinical trials, 55 patients diagnosed with VVC (by the presence of symptoms and signals of the infection and positive culture for *Candida* sp.) were taken into consideration and it was observed that the use of a single dose of fluconazole and daily supplementation with probiotics, yielded a higher cure rate (89.7%), in comparison with the placebo group (65.4%) ($p<0.05$). The use of tinidazole plus probiotic also resulted in higher cure rate of the infection (87.5%), compared to placebo group (50.0%) ($p<0.05$). An anti-*Candida* activity of *L. rhamnosus* GR-1 and *L. reuteri* RC-14 was observed in the *in vitro* model of vaginal infection. In conclusion, when PCR-ARDRA and PCR-DGGE were compared, it was verified that both presented limitations, which evidences the need of using different techniques for a better knowledge of lactobacilli species present in the vaginal microbiota. The lactobacilli species found in healthy women in this work were similar to those reported in previous studies described in the literature for patients with distinctly different diet and geographic localization. The data of the present work indicate that solely the presence of H_2O_2-producing isolates does not render protection against VVC, whereas the absence of those microorganisms may be a contributing factor for BV. Moreover, it was demonstrated that the use of classical medicines supplemented with the probiotics *L. rhamnosus* GR-1 and *L. reuteri* RC-14 was more efficient to treat VVC and BV in comparison with classical medicines plus placebo. These results may contribute to extend the longevity of drugs whose efficacy is compromised due to the selection of resistant microorganisms and also to shorten the length of treatment courses for patients that require long regimens with standard therapy.

Keywords: Lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, probiotics, vulvovaginal candidiasis, fluconazole, bacterial vaginosis, tinidazole, cytokines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos operons ribossomais de *Lactobacillus* spp. As regiões dos espaçadores intergênicos estão indicadas através de barras escuras [DE VRIES et al. (2006) com modificações] 6

Figura 2. Amostra de material obtido da parede lateral vaginal, adicionada de solução de hidróxido de potássio a 10% (p/v), evidenciando pseudo-hifas de leveduras do gênero *Candida*, observadas sob microscopia óptica (magnificação de 400X) (Autoria: Rafael Chacon Ruiz Martinez) 13

Figura 3. Amostra de material obtido da parede lateral vaginal, corada pelo método de Gram, evidenciando pseudo-hifas (seta verde) e leveduras em brotamento (seta azul), pertencentes ao gênero *Candida*, observadas sob microscopia óptica de imersão (magnificação de 1.000X) (Autoria: Rafael Chacon Ruiz Martinez) 13

Figura 4. Estrutura química do fluconazol (VANDEN BOSSCHE; ENGELEN; ROCHETTE, 2003) 18

Figura 5. Cronologia da história das hipóteses envolvidas na proteção ou susceptibilidade de CVV recorrente (FIDEL, 2007) 20

Figura 6. Esfregaços vaginais corados pelo método de Gram, exibindo microbiota vaginal normal (A e B), intermediária (C e D) e indicativa de vaginose bacteriana (E e F) visualizados sob microscopia óptica de imersão (magnificação de 1000X) (NUGENT; KROHN; HILLIER, 1991) 24

Figura 7. Estruturas químicas do tinidazol e metronidazol (REES; MCGLASHAN; MWEGA, 1974) 29

Figura 8. Reações do metabolismo da arginina por: i) lactobacilos vaginais produtores da enzima arginina desaminase e ii) microrganismos patogênicos causadores de vaginose bacteriana produtores da enzima arginina descarboxilase (LEPARGNEUR e ROUSSEAU, 2002) 39

Figura 9. Escala para comparação visual, fornecida pelo kit *Merckoquant Peroxide Test* (Merck, Darmstadt, Alemanha), para a determinação da produção de H_2O_2 (expressa em mg/L) de isolados de lactobacilos vaginais provenientes de pacientes saudáveis e diagnosticadas com infecções vaginais (candidíase vulvovaginal e vaginose bacteriana) 61

Figura 10. Perfil de restrição da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus acidophilus***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb) 74

Figura 11. Perfil de restrição da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus agilis***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb) 75

Figura 12. Perfil de restrição da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus coleohominis***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb) 75

Figura 13. Perfil de restrição da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus crispatus***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb) 76

Figura 14. Perfil de restrição da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus fermentum***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb) 76

Figura 15. Perfil de restrição da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus gasseri***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb) 77

Figura 16. Perfil de restrição da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus jensenii***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb) 77

Figura 17. Perfil de restrição da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus johnsonii***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb) 78

Figura 18. Perfil de restrição A da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus reuteri***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb) 78

Figura 19. Perfil de restrição B da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus reuteri***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb) 79

Figura 20. Perfil de restrição da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus rhamnosus***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb) 79

Figura 21. Perfil de restrição da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus ruminus***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb) 80

Figura 22. Perfil de restrição da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus salivarius***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb) 80

Figura 23. Perfil de restrição A da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus vaginalis***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb) 81

Figura 24. Perfil de restrição B da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus vaginalis***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb) 81

Figura 25. Prevalência de pacientes saudáveis (A), diagnosticadas com candidíase vulvovaginal (B) e vaginose bacteriana (C), não colonizadas, colonizadas por uma, duas ou três espécies de lactobacilos vaginais, determinada através da técnica de PCR-ARDRA 82

Figura 26. Prevalência de pacientes saudáveis (A), diagnosticadas com candidíase vulvovaginal (B) e vaginose bacteriana (C), não colonizadas, colonizadas por uma ou duas espécies de lactobacilos vaginais, determinada através da técnica de PCR-DGGE 83

Figura 27. Prevalência de lactobacilos vaginais obtidos a partir de três grupos de pacientes: 64 mulheres saudáveis (A), 68 mulheres diagnosticadas com candidíase vulvovaginal (B) e 64 mulheres diagnosticadas com vaginose bacteriana (C), de acordo com os resultados obtidos através das técnicas de PCR-ARDRA e PCR-DGGE 85

Figura 28. Fotografia de gel obtido em testes de DGGE, exibindo as bandas de DNA do controle positivo (CP) *L. iners* 13385 e obtidas a partir de pacientes saudáveis (numeradas de 1 a 16) 87

Figura 29. Fotografia de gel obtido em testes de DGGE, exibindo as bandas de DNA do controle positivo (CP) *L. iners* 13385 e obtidas a partir de pacientes diagnosticadas com candidíase vulvovaginal (numeradas de 133 a 163) 87

Figura 30. Fotografia de gel obtido em testes de DGGE, exibindo as bandas de DNA do controle positivo (CP) *L. iners* 13385 e obtidas a partir de pacientes diagnosticadas com vaginose bacteriana (numeradas de 297 a 327) 88

Figura 31. Diferentes aspectos macroscópicos de colônias de leveduras pertencentes ao gênero *Candida*, obtidas a partir de amostras vaginais de pacientes saudáveis e com candidíase vulvovaginal, após semeadura em superfície em meio de cultura seletivo e diferencial [Chromagar® Candida (Probac – São Paulo)] e incubação por 48 horas a 37ºC: verdes (A), brancas (B), rosas (C) e roxas (D) 92

Figura 32. Distribuição de leveduras do gênero *Candida*, isoladas do grupo de 64 pacientes saudáveis, identificadas presuntivamente no meio Chromagar® Candida e confirmadas com provas bioquímicas, de acordo com Kurtzman e Fell (1998) 93

Figura 33. Distribuição de leveduras do gênero *Candida*, isoladas do grupo de 68 pacientes diagnosticadas com candidíase vulvovaginal, identificadas presuntivamente no meio Chromagar® Candida e confirmadas com provas bioquímicas de acordo com Kurtzman e Fell (1998) 93

Figura 34. Prevalência de mulheres com microbiota vaginal normal, intermediária ou indicativa de vaginose bacteriana, avaliadas de acordo com o escore de Nugent após quatro semanas de tratamento com dose única de tinidazol (2g) e suplementação com duas cápsulas diárias de probiótico (*L. rhamnosus GR-1* e *L. reuteri* RC-14) ou placebo, durante quatro semanas, sendo que cada grupo compreendia 32 pacientes .. 102

Figura 35. Fotografia de gel de agarose a 1,5% (p/v) exibindo as bandas de DNA dos controles positivos (CP) *L. rhamnosus* GR-1 (CP1) e *L. reuteri* RC-14 (CP2) e aquelas obtidas a partir de pacientes diagnosticadas com candidíase vulvovaginal (numeradas de 70 a 172) após tratamento com dose única de fluconazol (150mg) e suplementação com probiótico oral, utilizado no período da manhã, diariamente durante quatro semanas. O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à direita e expresso em pares de base (pb) 105

Figura 36. Produção de IL-6, IL-8, IL-1α, IP-10, RANTES e VEGF (expressa em ρg/mL) por células epiteliais vaginais VK2/E6E7 cultivadas isoladamente ($8{,}0 \times 10^4$ células/poço testado), crescida com 10ng/mL de TNF-α e infectadas com *C. albicans* 3153a ($2{,}0 \times 10^4$ UFC/mL). Os resultados foram obtidos após 6h (A) e 12h (B) de incubação a 37°C. TNF-α foi utilizado como controle positivo e os asteriscos indicam as condições nas quais as concentrações de citocinas foram significativamente diferentes ($p<0{,}05$) quando comparadas àquelas obtidas com VK2/E6E7 cultivadas isoladamente. São mostrados resultados médios de experimentos realizados em duplicata 107

Figura 37. Produção de IL-8 e IP-10 (expressa em ρg/mL) pela linhagem celular epitelial VK2/E6E7 ($8{,}0 \times 10^4$ células/poço testado) infectada com *C. albicans* 3153a ($2{,}0 \times 10^4$ UFC/mL), não desafiada ou desafiada com: i) *L. rhamnosus* GR-1 (10^7 UFC/mL); ii) SLC de *L. rhamnosus* GR-1 [1:10 (v/v)]; iii) *L. reuteri* RC-14 (10^7 UFC/mL); iv) SLC de *L. reuteri* RC-14 [1:10 (v/v)]; v) *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 (10^7 UFC/mL cada) e vi) SLC de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 [1:10 (v/v)]. Os resultados foram obtidos após 12h de incubação a 37°C e os asteriscos indicam as condições nas quais as concentrações de citocinas foram estatisticamente diferentes ($p<0{,}05$) quando comparados àquelas obtidas com VK2/E6E7 cultivada com *C. albicans* 3153a. São mostrados resultados médios de experimentos realizados em duplicata 109

Figura 38. Produção de IL-6, IL-1α, RANTES e VEGF (expressa em ρg/mL) pela linhagem celular epitelial VK2/E6E7 (8,0x10^4 células/poço testado) infectada com *C. albicans* 3153a (2,0x10^4 UFC/mL), não desafiada ou desafiada com: i) *L. rhamnosus* GR-1 (10^7 UFC/mL); ii) SLC de *L. rhamnosus* GR-1 [1:10 (v/v)]; iii) *L. reuteri* RC-14 (10^7 UFC/mL); iv) SLC de *L. reuteri* RC-14 [1:10 (v/v)]; v) *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 (10^7 UFC/mL cada) e vi) SLC de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 [1:10 (v/v)]. Os resultados foram obtidos após 12h de incubação a 37°C e os asteriscos indicam as condições nas quais as concentrações de citocinas foram estatisticamente diferentes (p<0,05) quando comparados àquelas obtidas com VK2/E6E7 cultivada com *C. albicans* 3153a. São mostrados resultados médios de experimentos realizados em duplicata 110

Figura 39. Produção de IL-8 e IP-10 (expressa em ρg/mL) pela linhagem celular epitelial VK2/E6E7 (8,0x10^4 células/poço testado) na presença de: i) *L. rhamnosus* GR-1 (10^7 UFC/mL); ii) SLC de *L. rhamnosus* GR-1 [1:10 (v/v)]; iii) *L. reuteri* RC-14 (10^7 UFC/mL); iv) SLC de *L. reuteri* RC-14 [1:10 (v/v)]; v) *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 (10^7 UFC/mL cada) e vi) SLC de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 [1:10 (v/v)]. Os resultados foram obtidos após 12h de incubação a 37°C e os asteriscos indicam as condições nas quais as concentrações de citocinas foram estatisticamente diferentes (p<0,05) quando comparadas àquelas obtidas com VK2/E6E7 cultivada isoladamente. São mostrados resultados médios de experimentos realizados em duplicata 111

Figura 40. Enumeração (log UFC/mL) de *C. albicans* 3153a após 6h, 12h e 24h de incubação a 37°C em placas de 24 poços contendo a linhagem de célula epitelial vaginal VK2/E6E7 (controle) e desafiada com: i) *L. rhamnosus* GR-1 (10^7 UFC/mL); ii) SLC de *L. rhamnosus* GR-1 [1:10 (v/v)]; iii) *L. reuteri* RC-14 (10^7 UFC/mL); iv) SLC de *L. reuteri* RC-14 [1:10 (v/v)]; v) *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 (10^7 UFC/mL cada) e vi) SLC de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 [1:10 (v/v)]. As populações de *C. albicans* 3153a em T=24h nas condições iii) e iv) foram estatisticamente diferentes (p<0,05) quando comparadas àquelas obtidas no controle. São mostrados resultados médios de experimentos realizados em duplicata 112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características de vaginites complicadas e não complicadas (SOBEL, 1998) 15

Tabela 2 – Regimes terapêuticos para candidíase vulvovaginal complicada 16

Tabela 3 – Tratamentos terapêuticos para candidíase vulvovaginal não complicada 17

Tabela 4 – Sistema de escore proposto por Nugent, Krohn e Hillier (1991) 25

Tabela 5 – Tratamentos recomendados para a vaginose bacteriana 27

Tabela 6 – Tratamentos alternativos para a vaginose bacteriana 28

Tabela 7 – Perfis de digestão dos espaçadores amplificados por PCR da região intergênica 16S-23S de diferentes espécies de lactobacilos de origem humana, animal e alimentar 60

Tabela 8 – Características demográficas e comportamentais das pacientes que integraram o presente estudo. Os resultados estão expressos como números absolutos e porcentagens, respectivamente 72

Tabela 9 – Populações de lactobacilos nas amostras vaginais colhidas de pacientes saudáveis e diagnosticadas com infecções vaginais 73

Tabela 10 – Resultados semi-quantitativos da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por diferentes espécies de lactobacilos vaginais obtidos a partir de 64 mulheres saudáveis, que foram triadas em centros de saúde da cidade de Ribeirão Preto afiliados com a Universidade de São Paulo, no período de maio a setembro de 2005 90

Tabela 11 – Resultados semi-quantitativos da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por diferentes espécies de lactobacilos vaginais obtidos a partir de 68 mulheres diagnosticadas com candidíase vulvovaginal, que foram triadas em centros de saúde da cidade de Ribeirão Preto afiliados com a Universidade de São Paulo, no período de setembro de 2006 a maio de 2007 90

Tabela 12 – Resultados semi-quantitativos da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por diferentes espécies de lactobacilos vaginais obtidos a partir de 64 mulheres diagnosticadas com vaginose bacteriana, que foram triadas em centros de saúde da cidade de Ribeirão Preto afiliados com a Universidade de São Paulo, no período de setembro de 2006 a maio de 2007 91

Tabela 13 – Características demográficas e comportamentais, sinais e resultados das determinações laboratoriais das pacientes diagnosticadas com candidíase vulvovaginal (CVV), obtidas durante primeira consulta com o médico ginecologista, que foram triadas em centros de saúde da cidade de Ribeirão Preto afiliados com a Universidade de São Paulo, no período de setembro de 2006 a maio de 2007. Os resultados estão expressos como números absolutos e porcentagens, respectivamente 96

Tabela 14 – Determinações obtidas após quatro semanas de tratamento, comparando-se pacientes com candidíase vulvovaginal tratadas com dose única de fluconazol (150mg) e suplementadas com probiótico oral ou cápsulas de placebo, utilizadas diariamente durante quatro semanas. Os resultados estão expressos como números absolutos e porcentagens, respectivamente 97

Tabela 15 – Determinações obtidas após quatro semanas de tratamento, comparando-se pacientes com candidíase vulvovaginal recorrente (auto-relatado) tratadas com dose única de fluconazol (150mg) e suplementadas com probiótico oral ou cápsulas de placebo diariamente, no período da manhã, durante quatro semanas. Os resultados estão expressos como números absolutos e porcentagens, respectivamente 98

Tabela 16 – Características demográficas e comportamentais, sintomas, sinais e determinações laboratoriais das pacientes diagnosticadas com vaginose bacteriana (VB), obtidas durante primeira consulta com o médico ginecologista, que foram triadas em centros de saúde da cidade de Ribeirão Preto afiliados com a Universidade de São Paulo, no período de setembro de 2006 a maio de 2007. Os resultados estão expressos como números absolutos e porcentagens, respectivamente 101

Tabela 17 – Determinações obtidas após quatro semanas de tratamento, comparando-se pacientes com vaginose bacteriana tratadas com dose única de tinidazol (2g) e suplementadas com probiótico oral (*L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14) ou cápsulas de placebo, utilizadas no período da manhã, diariamente durante quatro semanas. Os resultados estão expressos como números absolutos e porcentagens, respectivamente 103

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD = Ágar Sabouraud Dextrose

ATP = Trifosfato de adenosina ("*Adenosine Triphosphate*")

BAL = Bactérias láticas

BHI = Caldo infusão de cérebro coração ("*Brain heart infusion*")

BrEt = Brometo de etídio

CDC = Centros para controle e prevenção de doenças ("*Centers for Disease Control and Prevention*")

CO_2 = dióxido de carbono

CP = controle positivo

CSE-FMRP-USP = Centro de Saúde Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

CSVL-FRMP-USP = Centro de Saúde Vila Lobato – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

CV = candidíase vaginal

CVV = Candidíase vulvovaginal

D = dextrógiro

DNA = Ácido desoxirribonucléico ("*Deoxirribonucleic acid*")

dNTP = trifosfato deoxinucleotídeo ("*Deoxinucleotide triphosphate*")

EDTA = ácido etileno diamino tetracético

EMP = Embden – Meyerhof – Parnas

EUA = Estados Unidos da América

FAO/WHO = Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação / Organização Mundial da Saúde ("*Food and Agriculture Organization of the United Nations*" / "*World Health Organization*")

FCFRP-USP = Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

FDA = Administração de alimentos e medicamentos dos EUA ("*Food and Drug Administration*")

FMRP-USP = Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

G = grande

HC-FMRP-USP = Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

HCl = Ácido clorídrico

HIV = Vírus da imunodeficiência humana ("*Human immunodeficiency virus*")

H_2O_2 = Peróxido de hidrogênio

ICB-UFMG = Instituto de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Minas Gerais

Ig = Imunoglobulina

ITU = Infecção do trato urinário

KDa = KDalton

KOH = Hidróxido de potássio

L = levógiro

LiCl = Cloreto de lítio

M = médio

M-CFS = Fator estimulante de colônia de macrófago ("*Macrophage colony-stimulating factor*")

$MgCl_2$ = Cloreto de magnésio

Mr = marcador de peso molecular

MRS = de Man, Rogosa & Sharpe

NaCl = Cloreto de sódio

NaOH = Hidróxido de sódio

NK = matador natural ("*natural killer*")

P = pequeno

Pb = pares de bases

PBS = Solução salina tamponada fosfatada ("*Phosphate buffer solution*")

PCR-ARDRA = Reação em cadeia da polimerase – Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado ("*Polymerase chain reaction - Amplified ribosomal DNA restriction analysis*")

PCR-DGGE = Reação em cadeia da polimerase – Eletroforese em gel de gradiente de desnaturação ("*Polymerase chain reaction – Denaturating gradient gel electrophoresis*")

PCR-TGGE = Reação em cadeia da polimerase – Eletroforese em gel de gradiente de temperatura ("*Polimerase chain reaction – Temperature gradient gel temperature*")

QSS = Queratinócito sem soro

RANTES = célula T normal, expressa e secretada, regulada sob ativação ("*Regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted*")

RAPD = DNA polimórfico amplificado randomicamente ("*Randomly Amplified Polymorphic DNA*")

RNAr = Ácido ribonucléico ribossomal ("*Ribosomal ribonucleic acid*")

RNAt = Ácido ribonucléico transportador ("*Transfer ribonucleic acid*")

ROS = Espécies reativas ao oxigênio ("*Reactive oxigen species*")

SIS-USP = Sistema Interno de Saúde – Universidade de São Paulo

SLC = Sobrenadante livre de célula

Temed = N,N,N', N'- tetrametiletilenodiamino

TGI = Trato gastrintestinal

UFC/mL = Unidades formadoras de colônia por mililitro

UV = ultravioleta

VB = vaginose bacteriana

VEGF = fator de crescimento endotelial vascular ("*vascular endothelial growth factor*")

VYBC = "*Vitek Yeast Biochemical Card*"

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
°C	grau Celsius
et al.	e colaboradores
L	litro
g	grama
g	gravidade
h	hora
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
n	número de sujeitos
ηg	nanograma
pH	potencial de hidrogênio (iônico)
p	nível de significância
ρg	picograma
ρmol	picomol
p/v	peso por volume
®	marca registrada
™	"*trademark*"
U	unidade
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrometro
v	volume
V	Volt
X	vez
Y	ípsilon
%	porcentagem

1. INTRODUÇÃO

É possível que a adoção de medidas excessivas de higiene praticadas desde o nascimento de crianças, em especial na sociedade ocidental, faça com que muitos indivíduos apresentem dificuldade em desenvolver uma microbiota intestinal endógena protetora. Acredita-se que essa prática possa estar associada à elevação da incidência de alergias e mesmo infecções, observadas nas últimas décadas (CHANDRA, 1979; CHUNG et al., 2007; SHREINER; HUFFNAGLE; NOVERR, 2008).

Crianças alimentadas com fórmulas artificiais, quando comparadas àquelas que receberam aleitamento materno, apresentam um grau de colonização intestinal por lactobacilos e bifidobactérias muito inferior e maiores populações de microrganismos potencialmente patogênicos, como algumas espécies de enterococos, coliformes e clostrídios (BALMER; WHARTON, 1989).

O estresse da vida moderna, a redução da atividade física, o consumo de alimentos excessivamente manipulados e processados, aliados à maciça ingestão de aditivos alimentares, também podem contribuir para a diminuição da resistência a infecções (BENGMARK, 1998).

Paralelamente a esta situação, em muitos países desenvolvidos e em desenvolvimento, o uso indiscriminado de antibióticos no combate a infecções é um dos maiores problemas de saúde pública (CIZMAN, 2003). Além disso, o agravamento da seleção de microrganismos resistentes a medicamentos ocorre mundialmente (ROBERTS et al., 2008), sendo que as nações com as maiores taxas de consumo de antibióticos por pessoa, exibem as maiores taxas de resistência microbiana frente a esses fármacos (CIZMAN, 2003).

Segundo Bengmark (1998), os medicamentos empregados no combate às principais infecções humanas apresentam diversos aspectos negativos, pois (i) os antibióticos podem destruir a microbiota autóctone e predispor a infecções; (ii) existe a preocupação com a seleção de linhagens de microrganismos resistentes a antibióticos, como resultado da prescrição mundial indiscriminada e do uso incorreto desses medicamentos; (iii) há temor de que as indústrias farmacêuticas sejam incapazes de

desenvolver antibióticos novos e efetivos em intervalos de tempo cada vez menores, a fim de competir com a seleção de microrganismos resistentes aos fármacos já utilizados; (iv) o interesse público mundial tem aumentado sobremaneira em relação à utilização de métodos mais naturais, a fim de prevenir e combater diversas infecções.

Dentre as infecções urogenitais, as vaginites causadas por leveduras do gênero *Candida*, a vaginose bacteriana e as infecções do trato urinário, em conjunto, acometem cerca de um bilhão de mulheres no mundo anualmente (REID, 2008). Em todas essas patologias, o tratamento medicamentoso tradicional destrói parcialmente a microbiota autóctone, podendo levar à seleção de microrganismos multiresistentes e ao desenvolvimento de efeitos colaterais de intensidades variáveis (GARDINER et al., 2002a).

Deste modo, estudos com microrganismos inócuos e que apresentam efeito terapêutico comprovado, podem ser importantes aliados no restabelecimento da microbiota autóctone, que funciona como uma barreira natural contra inúmeros microrganismos patogênicos e oportunistas. Estudos realizados com cepas de bactérias láticas (BAL) isoladas da microbiota vaginal de mulheres saudáveis *(Lactobacillus rhamnosus* GR-1 e *Lactobacillus reuteri* RC-14) demonstraram que esses microrganismos podem ser agentes efetivos no tratamento e prevenção de infecções urogenitais em mulheres (REID, 1999).

1.1 Microbiota vaginal normal

A microbiota vaginal de mulheres saudáveis é constituída por inúmeros gêneros de microrganismos que co-existem em um tênue equilíbrio (BORIS; BARBÉS, 2000). A composição da microbiota é influenciada por diversos parâmetros internos e externos, tais quais variação dos níveis hormonais, utilização de métodos contraceptivos, dieta, relação sexual, realização de duchas vaginais, imunossupressão, uso de antibióticos, cirurgias ginecológicas e câncer cervical (FRIEDRICH, 1979; LARSEN; GALASK, 1980; HOOTON et al., 1989; REID; BRUCE, 2006).

1.1.1 Lactobacilos, taxonomia e prevalência no epitélio vaginal

O gênero *Lactobacillus* compreende aproximadamente 100 espécies que estão amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em alimentos e bebidas fermentados, frutas, vegetais e águas de esgotos (NIKOLAITCHOUK et al., 2001; DELLAGIO; FELIS, 2005). Esses microrganismos estão associados também com o TGI e estudos realizados sobre o trato vaginal, identificaram *Lactobacillus* sp. como predominantes neste sítio anatômico, sendo denominados bacilos de Doderleïn (ROGOSA; SHARPE, 1960).

Na microbiota vaginal humana de mulheres saudáveis em período pós-puberal, são determinadas populações de lactobacilos da ordem de 10^7 a 10^8 Unidades Formadoras de Colônia por mililitro (UFC/mL) de exsudato vaginal (REDONDO-LOPEZ; COOK; SOBEL, 1990; ANTONIO; HAWES; HILLIER, 1999). Esses microrganismos desempenham um papel importante neste sítio anatômico, pois formam um biofilme na superfície da mucosa vaginal e são dominantes em relação a diversos gêneros de microrganismos, incluindo *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Bacterioides* e *Mycoplasma* (LARSEN; MONIF, 2001; REID, 2001).

As espécies de lactobacilos mantêm um ecossistema vaginal saudável, sendo importantes na proteção contra agentes infecciosos (HAWES et al, 1996; MARTIN et al., 1999; DONDERS et al., 2000).

Acredita-se que o reto contribua em grande parte para a manutenção da microbiota vaginal, uma vez que funciona como reservatório para a recolonização por lactobacilos, verificada especialmente após a ocorrência de distúrbios neste ecossistema, como a prática de duchas vaginais e/ou relações sexuais (VALLOR et al., 2001; ANTONIO; RABE; HILLIER, 2005). Além disso, algumas espécies de lactobacilos vaginais já foram detectadas em amostras de fezes (TANNOCK, 1999; WALTER et al., 2000).

O gênero *Lactobacillus* já foi agrupado de diferentes formas. De acordo com Lino, Uchimura e Komagata (2003), a divisão clássica do mesmo, proposta por Orla-Jensen (1919), baseava-se em características morfológicas e no metabolismo energético

(homofermentadores ou heterofermentadores), nas temperaturas de multiplicação (10ºC e 45ºC) e, ainda, nas formas isoméricas do ácido lático produzido (D, L ou DL).

De acordo com Hammes e Vogel (1995), a subdivisão do gênero *Lactobacillus* é baseada no tipo de fermentação do microrganismo, o qual pode ser classificado como: *homofermentativo obrigatório*, *heterofermentativo* ou *heterofermentativo obrigatório*. Os lactobacilos homofermentativos obrigatórios são capazes de fermentar hexoses e sintetizar quase que exclusivamente o ácido lático através da via Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), enquanto que as pentoses e gluconato não são fermentados. Os lactobacilos heterofermentadores degradam hexoses a ácido lático pela via EMP e também são capazes de degradar pentoses e freqüentemente gluconato, uma vez que possuem as enzimas aldolase e fosfocetolase. Os lactobacilos heterofermentadores obrigatórios, por sua vez, degradam as hexoses através da via do fosfogluconato, produzindo lactato, etanol ou ácido acético e dióxido de carbono, além disso, as pentoses também são fermentadas por esta via.

Com o advento da biologia molecular, diversas alterações taxonômicas têm ocorrido no grupo das bactérias láticas (desagregação, agregação e renomeação de espécies), embora ainda não haja um consenso (DELLAGLIO; FELIS, 2006).

Em geral, o número de espécies de lactobacilos que habitam o epitélio vaginal de uma mulher saudável varia de zero a quatro, sendo que essas espécies e suas combinações podem se alterar devido ao uso de antibiótiocos, espermicidas, flutuações hormonais e estados de imunossupressão (GALASK, 1988; REDONDO-LOPEZ; COOK; SOBEL, 1990; REID, 2000).

Por meio de testes fenotípicos foi demonstrado que *Lactobacillus acidophilus* (ESCHENBACH et al., 1989; NAGY; PETTERSON; MARDTH, 1991) era a espécie de lactobacilo mais prevalente na microbiota vaginal humana.

Análises baseadas em tipagem molecular demonstraram que *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus fermentum e Lactobacillus iners* são os microrganismos mais comumente encontrados, embora o passo da cultura seja limitante, por exemplo, para *L.*

iners que não se multiplica nos meios de cultura normalmente empregados no isolamento de lactobacilos (SONG et al., 1999a; MATSUMIYA et al., 2002; BURTON; CADIEUX; REID, 2003; STOYANCHEVA et al., 2006).

Os métodos fenotípicos tradicionalmente utilizados na identificação de espécies de lactobacilos apresentam baixa concordância com testes baseados em estudos genômicos, devendo ser utilizados com cautela (BOYD; ANTONIO; HILLIER, 2005). A disparidade de resultados entre esses métodos pode ser atribuída à grande diversidade bioquímica intra-espécie de lactobacilos vaginais e à ausência de determinadas espécies do microrganismo em bases de dados de galerias comerciais (MARTÍN et al., 2008).

Embora o gênero *Lactobacillus* seja normalmente definido com base nos resultados de homologia do DNA (ácido desoxirribonucléico), mais recentemente foram introduzidos métodos moleculares baseados na análise da subunidade 16S do RNAr (ácido ribonucléico ribossomal) que representam um avanço significativo, pois permitem eliminar ambigüidades decorrentes da preparação de sondas e das condições de hibridização usualmente empregadas, as quais podem afetar a interpretação dos estudos de hibridização de DNA (WILKS et al., 2004).

A representação esquemática dos operons ribossomais de espécies de *Lactobacillus* pode ser visualizada na Figura 1.

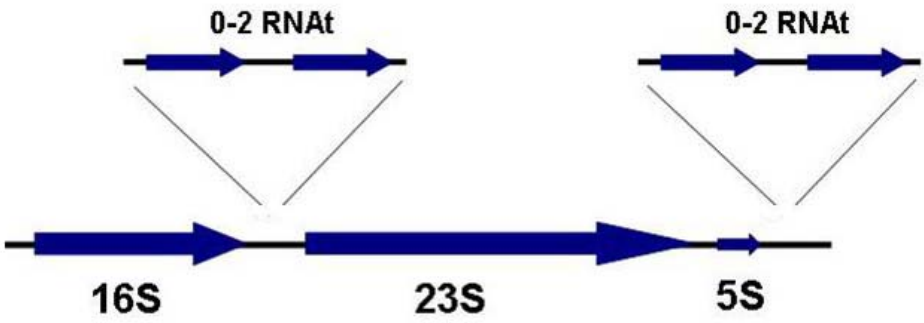


Figura 1. Estrutura dos operons ribossomais de *Lactobacillus* spp. As regiões dos espaçadores intergênicos estão indicadas através de barras escuras [DE VRIES et al., (2006) com modificações].

Duas técnicas moleculares amplamente empregadas na identificação de espécies de lactobacilos são descritas a seguir.

A técnica de PCR-ARDRA (Reação em cadeia da polimerase – Análise de restrição do DNA ribossomal amplificado / *Polymerase chain reaction – Amplified ribosomal DNA restriction analysis*) é bastante aceita para a identificação de espécies de lactobacilos e consiste na amplificação por PCR do DNA que codifica para a região intergênica 16S-23S do RNAr, seguido da digestão com um conjunto de enzimas de restrição que reconhecem seqüências gênicas de 6 bases, sendo obtido um padrão de digestão específico para cada espécie de lactobacilo. Este método dispensa os passos de purificação do gel de agarose e o seqüenciamento dos amplicons obtidos, no entanto, depende do isolamento prévio do(s) microrganismo(s) de interesse em meio de cultivo (MOREIRA et al., 2005).

A técnica de PCR-DGGE (Reação em cadeia da polimerase – Eletroforese em gel de gradiente desnaturante / *Polymerase chain reaction – Denaturing gradient gel electrophoresis*) tem sido empregada com sucesso para a identificação de espécies de lactobacilos da microbiota intestinal de adultos e crianças (WALTER et al., 2000; FAVIER et al., 2002) e da microbiota vaginal humana (BURTON; REID, 2002; BURTON et al., 2004; DEVILLARD et al., 2004). Este método é confiável e permite a análise simultânea de um número grande de amostras, uma vez que o material genético microbiano utilizado como molde pode ser obtido diretamente do espécime clínico, sem a necessidade de isolamento prévio do(s) microrganismo(s) de interesse em meios de cultura (WALTER et al., 2000). Após a extração de DNA da amostra e desenvolvimento da reação de PCR da região que codifica para a subunidade 16S do RNAr com iniciadores específicos ou universais, são obtidos diferentes perfis de migração dos fragmentos em géis de poliacrilamida e pode-se compará-los com padrões obtidos a partir de microrganismos conhecidos. Os fragmentos de interesse devem ser excisados dos géis, reamplificados, seqüenciados e comparados com seqüências disponíveis em bancos de dados de DNA, para identificação do microrganismo (BURTON; REID, 2002).

1.1.2 Leveduras do gênero *Candida*, taxonomia e prevalência no epitélio vaginal

Amostras de exsudatos vaginais contendo leveduras do gênero *Candida* foram verificadas em aproximadamente 20% de mulheres saudáveis que não apresentavam quaisquer sintomas durante o período pré-menopausal (HAEFNER, 1999; FERRER, 2000; BAROUSSE et al., 2004). Segundo Eckert et al. (1998), essas leveduras são comensais no epitélio vaginal, onde podem ser encontradas em altas populações, da ordem de 10^6 a 10^7 UFC/mL. Desta maneira, no indivíduo saudável, essa população residente encontra-se em estado de equilíbrio com o hospedeiro, sem causar-lhe danos.

Beigi et al. (2004) avaliaram um grupo de 1.248 mulheres jovens assintomáticas durante o período de um ano (com visitas programadas em intervalos regulares a cada quatro meses) e observaram que 70% delas, em algum momento do estudo, estavam colonizadas por leveduras do gênero *Candida*. Os autores atribuíram a elevada taxa de isolamento do microrganismo à metodologia empregada, na qual um caldo de enriquecimento seletivo foi utilizado para isolamento das leveduras, o que pode ter aumentado a sensibilidade para detecção do microrganismo.

As espécies de *Candida* mais comumente isoladas a partir de amostras vaginais de pacientes saudáveis correspondem a *Candida albicans* (determinada em aproximadamente 10% a 55% de mulheres assintomáticas), seguida de outras espécies de *Candida* não-*albicans*: *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida pseudotropicalis* e *Candida tropicalis* (SOBEL, 1993, PIROTTA; GARLAND, 2006).

Diferentes métodos podem ser empregados na identificação de leveduras do gênero *Candida*. Tradicionalmente, são utilizadas técnicas fenotípicas baseadas na formação de tubo germinativo, realização de microcultivo, assimilação de hidratos de carbono e substâncias nitrogenadas (auxanograma), fermentação de carboidratos (zimograma) e detecção de produção das enzimas urease e fenol-oxidase (KURTZMAN; FELL, 1998).

Há painéis manuais e automatizados comercialmente disponíveis para identificação de leveduras [API 20C e *Vitek Yeast Biochemical Card* (YBC) da bioMerieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo., EUA]. Esses testes permitem avaliar a capacidade assimilativa de substratos bioquímicos e enzimáticos; além disso, são de realização e interpretação fáceis, oferecendo resultados rápidos (FENN et al., 1994).

Para auxiliar na identificação de leveduras do gênero *Candida*, também pode ser utilizado um meio de cultura diferencial e seletivo, denominado Chromagar® Candida (CHROMagar Company, Paris, França), que permite o isolamento e identificação preliminar simultânea desses microrganismos, baseado na pigmentação das colônias. Desta maneira, o meio de cultura facilita a detecção e identificação de leveduras obtidas a partir de culturas mistas, antecipando a aquisição dos resultados em até 48h, em comparação àqueles determinados por métodos tradicionais de isolamento e identificação do microrganismo (ODDS; BERNAERTS, 1994; LOUWAGIE et al., 1995; PFALLER; HOUSTON; COFFMAN, 1996).

Para a identificação rápida de *Candida* spp. também podem ser empregadas reações de PCR. Para este gênero, já foram estudados diversos genes, avaliando-se a especificidade e sensibilidade da técnica (BARTIE et al., 2001). Apesar de necessitarem de pouca manipulação técnica quando comparados a outras metodologias moleculares, os ensaios para identificação do microrganismo baseados em reações de PCR, não estão completamente padronizados (LÓPEZ et al., 2005).

1.2 Infecções urogenitais

1.2.1 Infecções do trato urinário

A incidência de infecções do trato urinário (ITU) não complicadas em mulheres é muito elevada, cerca de 0,5 episódio/pessoa/ano, sendo a taxa de recorrência da ordem de 27% a 48% (REID; BRUCE, 2003). Dados históricos têm indicado que a maioria das ITU (aproximadamente 70% dos casos) é causada por *E. coli*, seguida por uma ordem variável compreendendo as seguintes espécies de microrganismos: *Staphylococcus saprophyticus*, *Proteus mirabilis*, *Enteroccocus faecalis*, *Klebsiela pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens* (REID, 2001; SANGRADOR et al., 2005). A maior parte das infecções urinárias é causada por um único patógeno, embora infecções mistas possam ocorrer e necessitem de tratamento mais complexo (WAGENLEHNER; NABER, 2004). O diagnóstico da infecção normalmente requer a determinação de populações do microrganismo iguais ou superiores a 10^5 UFC/mL de urina, no entanto, a presença de 10^3 microrganismos/mL pode sinalizar a infecção caso estejam presentes sintomas de disúria, freqüência muito aumentada de micção e ocasionalmente hematúria (REID; DEVILLARD, 2004).

Um aspecto importante sobre as ITU é a seleção, cada vez mais freqüente, de linhagens de microrganismos resistentes a diversos agentes antimicrobianos comumente empregados no tratamento dessa condição. Existem diversos relatos na literatura científica de cepas de *E. coli* resistentes à ampicilina, às cefalosporinas de primeira geração e ao clotrimazol (KARLOWSKY et al., 2002), bem como às fluoroquinolonas (KAHLMETER, 2003), o que preocupa profissionais da área da saúde.

1.2.2 Candidíase vulvovaginal

A candidíase vulvovaginal (CVV) pode ser definida pela presença de corrimento vaginal esbranquiçado associado à inflamação vulvar e vaginal, devido à proliferação de leveduras do gênero *Candida* nesse sítio anatômico. A reação inflamatória pode manifestar-se como prurido vulvar, sensação de queimação e/ou disúria. Um quadro de infecção típico inclui sinais de eritema vulvar, escoriações e fissuras, sendo que em uma mesma paciente podem ocorrer um ou todos os sintomas acima relatados (SHEARY; DAYAN, 2005).

Durante a gravidez, verifica-se um aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento de CVV, a qual é particularmente virulenta no último trimestre do período gestacional (FERRER, 2000). Cerca de 70 a 85% das mulheres grávidas colonizadas com *Candida* sp. contaminam seus filhos com tais leveduras no momento do parto e em torno de 22 a 24% de todos os recém-nascidos adquirem *C. albicans*, fato preocupante especialmente em relação a bebês que apresentem predisposição à aquisição de infecções fúngicas sistêmicas (BLASCHKE-HELLMESSEN, 1998).

A principal fonte de infecção por *Candida* spp. é endógena (intestinal), por colonização retal e do tecido cutâneo perianal (BUSCEMI; ARECHAVALA; NEGRONI, 2004) e cerca de 75% das mulheres sexualmente ativas experimentarão ao menos um episódio de CVV durante a vida (FERRER, 2000). Aproximadamente 50% delas desenvolverão um segundo episódio da doença e 5% apresentarão CVV recorrente, definida como a presença de quatro ou mais episódios documentados da doença em um período de um ano (ECKERT et al., 1998; SOBEL, 1998; COSTA; FERNANDES; SILVA, 2003; PATEL et al., 2004). A infecção pode afetar a saúde física e emocional da paciente, bem como interferir negativamente nos relacionamentos sexuais e conjugais (CHAPPLE et al., 2000).

Os principais fatores predisponentes para a CVV são gravidez, uso de anticoncepcionais com alta dose de estrógeno, diabetes, uso de antibióticos locais ou sistêmicos (por causa da destruição da microbiota vaginal), alta freqüência sexual (predisposição à aquisição de blastoconídeos, que são as formas contaminantes do microrganismo e passíveis de serem transmitidas sexualmente), história prévia de VB e

imunossupressão (SOBEL, 1998; FERRER, 2000; LEON et al., 2002; PATEL et al., 2004).

Para que as leveduras do gênero *Candida* sejam consideradas patogênicas, devem apresentar os seguintes mecanismos:

Adesão: a adesão é crucial para a sobrevivência do blastoconídeo. A adesão de *C. albicans* é superior à adesão de *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei* e isto pode explicar a maior freqüência de seus achados em estudos clínicos (KING; LEE; MORRIS, 1980). *Candida* sp. adere à membrana celular do epitélio vaginal através do receptor de fosfolipídeo e fibronectina (BOHBOT, 1996). Acredita-se que a aderência dos blastoconídeos esteja associada a uma manoproteína na membrana fúngica, conhecida como adesina, similar às integrinas. A adesão do microrganismo é aumentada pela impregnação estrogênica das células do epitélio vaginal. O estrogênio aumenta a superfície de exposição dos complexos glicoprotéicos que atuam como receptores para a aderência dos blastoconídeos (POWELL; DRUTZ, 1983; TARRY et al., 2005).

Germinação dos blastoconídeos, desenvolvimento de micélio e invasão epitelial: após o desenvolvimento do micélio, *Candida* é capaz de penetrar e invadir as células superficiais vaginais. Do ponto de vista bioquímico, a penetração celular epitelial tem sido relacionada à produção de diversas proteases pelas hifas (RODIER et al., 1999). Os blastoconídeos, por sua vez, são incapazes de penetrar no tecido epitelial e causar colpite (FIDEL; SOBEL, 1996) e algumas formas mutantes de *C. albicans* são incapazes de desenvolver o micélio, não causando vulvovaginite recorrente (SOBEL, 1993).

O diagnóstico de CVV é confirmado por um conjunto de determinações simultâneas, em paralelo à avaliação dos sinais e sintomas de vaginite e ausência de diagnóstico de *T. vaginalis* ou VB: (i) determinação do pH vaginal (inferior a 4,5); (ii) presença de pseudo-hifas ou leveduras em brotamento observadas sob microscopia óptica (magnificação de 400X) após adição de solução de KOH 10% (p/v) ao material vaginal coletado (Figura 2); (iii) visualização de elementos fúngicos após coloração de Gram direta do material vaginal obtido (Figura 3) e (iv) isolamento do microrganismo em meios de cultivo (ECKERT et al., 1998; WILLIAMS et al., 2001).

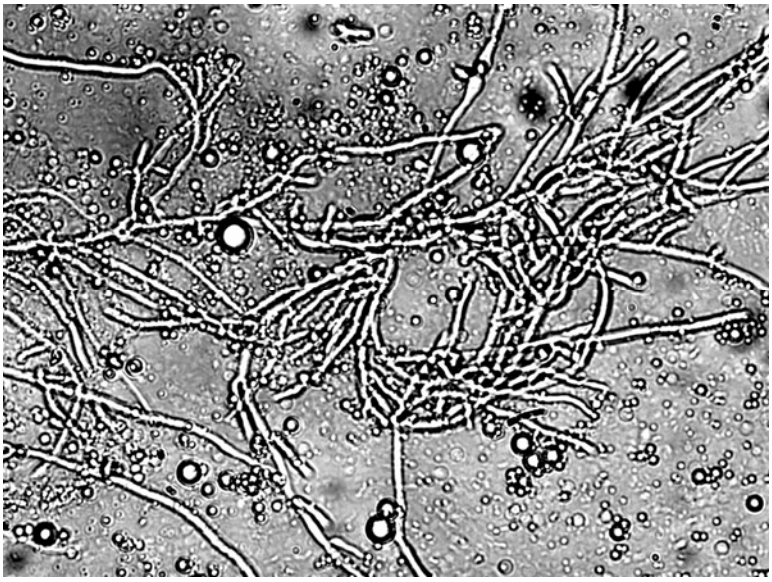


Figura 2. Amostra de material obtido da parede lateral vaginal, adicionada de solução de hidróxido de potássio a 10% (p/v), evidenciando pseudo-hifas de leveduras do gênero *Candida*, observadas sob microscopia óptica (magnificação de 400X) (Autoria: Rafael Chacon Ruiz Martinez).

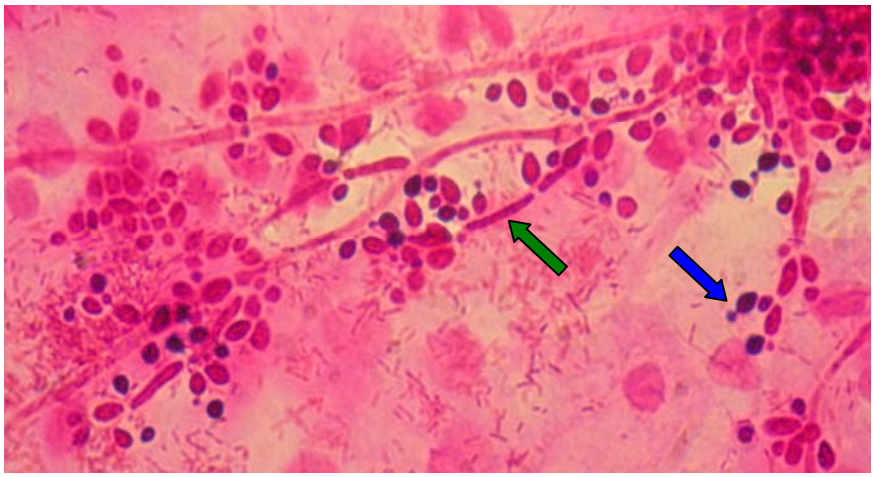


Figura 3. Amostra de material obtido da parede lateral vaginal, corada pelo método de Gram, evidenciando pseudo-hifas (seta verde) e leveduras em brotamento (seta azul), pertencentes ao gênero *Candida*, observadas sob microscopia óptica de imersão (magnificação de 1.000X) (Autoria: Rafael Chacon Ruiz Martinez).

Cerca de 80% a 95% das leveduras isoladas de pacientes com CVV pertencem à espécie *C. albicans*. *C. glabrata* é responsável por 5% a 15% dos casos da infecção; *C. tropicalis* está envolvida em 5% das ocorrências, sendo os demais casos relacionados a espécies como *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. pseudotropicalis*, *C. tropicalis* (FERRER, 2000; SOBEL, 2007). Através de análises genotípicas, *Candida dubliniensis* foi identificada recentemente como uma espécie distinta em relação a *C. albicans*, apesar de ambas exibirem características fenotípicas semelhantes (TINTELNOT et al., 2000).

A maior parte das mulheres adultas, saudáveis, sem fatores predisponentes, desenvolve episódios de CVV não complicados, os quais são esporádicos, apresentam intensidade leve à moderada e são causados por *C. albicans* (SOBEL et al., 1998). Em contraste, aproximadamente 10 a 20% das mulheres sofrem de CVV complicada, caracterizada por episódios mais severos da infecção, que podem ser recorrentes e estão associados com as espécies de *C.* não *albicans* (Tabela 1) (SOBEL, 1998).

Tabela 1 – Características de vaginites complicadas e não complicadas (SOBEL, 1998)

Vaginites complicadas	Vaginites não complicadas
Episódios moderados a severos	Episódios leves a moderados
ou	
Recorrentes (> 4 casos por ano)	Esporádicos
ou	
Somente leveduras em brotamento no exsudato vaginal, observadas sob microscopia de luz comum (400X)	Pseudo-hifas/hifas no exsudato vaginal, observadas sob microscopia de luz comum (400X)
ou	
Fatores adversos: - Gravidez - Diabetes descompensada - Imunocomprometimento	Hospedeiro saudável

1.2.2.1 Tratamento farmacológico de candidíase vulvovaginal

A importância prática da classificação de CVV como complicada ou não complicada é importante para definir o tratamento de cada uma delas (Tabelas 2 e 3, respectivamente).

Tabela 2 – Regimes terapêuticos para candidíase vulvovaginal complicada

Tratamento	Dose inicial	Dose de manutenção
Comprimidos de clotrimazol (100mg, Gyne-Lotrim®, Mycelex-7®; 500mg, Mycelex-G®)	1 comprimido diário de 100mg, uso intravaginal, durante 7 dias	1 comprimido de 500mg, uso intravaginal, 1 vez por semana
Fluconazol (Diflucan®)	1 comprimido de 150mg, via oral; repetir após 3 dias	1 comprimido de 150mg, via oral, 1 vez por semana

Fonte: CDC (2002)

Tabela 3 – Regimes terapêuticos para candidíase vulvovaginal não complicada

Tratamento	Dosagem
Butoconazol creme vaginal 2% (Mycelex-3®)	5g diários, uso intravaginal, durante 3 dias
Butoconazol creme vaginal 2%, liberação prolongada (Gynezole-1®)	5g, uso intravaginal, 1 vez
Clotrimazol creme vaginal 1% (Mycelex-7®)*	5g diários, uso intravaginal, durante 7 a 14 dias
Clotrimazol comprimido vaginal 100mg (Gyne-Lotrimin®, Mycelex-7®)	1 comprimido diário, uso intravaginal, durante 7 dias ou 2 comprimidos diários, uso intravaginal, durante 3 dias
Clotrimazol comprimido vaginal 500mg (Mycelex-G®)	1 comprimido, uso intravaginal, 1 vez
Fluconazol (Diflucan®)▲	1 comprimido de 150mg, via oral, dose única
Miconazol creme vaginal 2% (Monistat®)*	5g diários, uso intravaginal, durante 7 dias
Miconazol supositório vaginal 100mg (Monistat®)*	1 supositório, uso intravaginal diário, durante 7 dias
Miconazol supositório vaginal 200mg (Monistat 3®)*	1 supositório, uso intravaginal diário, durante 3 dias
Nistatina (100.000 unidades) comprimido vaginal*	1 comprimido, uso intravaginal diário, durante 14 dias
Tioconazol pomada 6,5% (Vagistat-1®)*	5g, uso intravaginal, 1 vez
Terconazol creme vaginal 0,4% (Terazol 7®)	5g diários, uso intravaginal, durante 7 dias
Terconazol creme vaginal 0,8% (Terazol 3®)	5g diários, uso intravaginal, durante 3 dias
Terconazol supositório vaginal 80mg	1 supositório, uso intravaginal diário, durante 3 dias

* Disponíveis sem necessidade de prescrição médica nos EUA

▲ Uso não recomendado durante a gravidez

Fonte: CDC (2002)

Todos os regimes terapêuticos recomendados para CVV não complicada apresentam taxas de cura semelhantes, normalmente inferiores a 80% (SOBEL et al., 1995; SOBEL, 1997). O tratamento com fluconazol por via oral mostrou-se igualmente seguro e eficaz, quando comparado ao uso de clotrimazol intravaginal em mulheres diagnosticadas com CVV (SOBEL et al., 1995). Em alguns pacientes, o fluconazol pode causar distúrbios gastrointestinais, dores de cabeça, enjôos e *rash* cutâneo, embora esses efeitos colaterais sejam normalmente de intensidade moderada (OWEN; CLENNEY, 2004).

O mecanismo de ação do fluconazol é baseado na inibição de citocromos P450 envolvidos na biossíntese do ergosterol, um componente essencial da membrana plasmática fúngica, que regula a permeabilidade celular e a atividade enzimática. O ergosterol é o principal componente de vesículas secretórias e tem papel fundamental na respiração mitocondrial e fosforilação oxidativa (KELLY et al., 1997; DAUM et al., 1998; VANDEN-BOSSCHE; ENGELEN; ROCHETTE, 2003) A estrutura química da molécula de fluconazol pode ser visualizada na Figura 4.

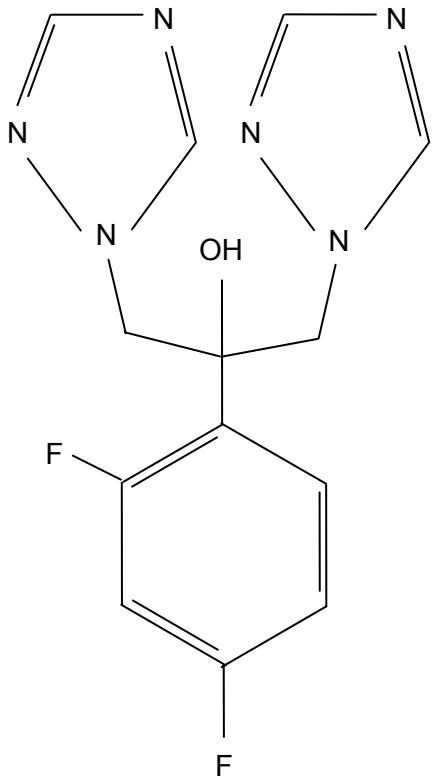


Figura 4. Estrutura química do fluconazol (VANDEN-BOSSCHE; ENGELEN; ROCHETTE, 2003).

No caso específico de CVV complicada, a terapia tópica mostrou-se mais eficaz que a terapia de dose única por via oral, contudo o tratamento tópico deve ser prolongado por 10 a 14 dias (SOBEL, 1997; SOBEL et al., 1998). A utilização de duas doses de 150mg de fluconazol, administradas em um intervalo de três dias, têm demonstrado alta eficácia no combate à CVV severa, em pacientes acometidas por CVV recorrente (SOBEL et al., 2001). Em pacientes com intenso desconforto secundário à vulvite, a combinação de um creme contendo esteróide de baixa potência e creme antifúngico tópico podem ser benéficos (HAEFNER, 1999).

Embora antifúngicos tópicos sejam recomendados como primeira escolha no tratamento de mulheres grávidas com CVV, o fluconazol por via uso oral também é utilizado no tratamento de infecções micóticas nesse grupo de pacientes (MOUDGAL; SOBEL, 2003). O emprego deste medicamento sob tais condições deve ser avaliado com bastante cautela, uma vez que um estudo recente conduzido por Norgaard et al. (2008) demonstrou um aumento no risco de malformações congênitas após a utilização de tratamentos por via oral com regimes curtos de fluconazol em pacientes durante o primeiro trimestre gestacional.

Relatos de cepas de *C. albicans* resistentes a antifúngicos tradicionais são raros, embora situação oposta seja verificada em relação a *C. glabrata*. Esta observação está relacionada à resistência intrínseca de *C. glabrata* frente a compostos azólicos e outros agentes antimicóticos amplamente utilizados de maneira incorreta pela população (SOBEL, 1997; SOBEL, 1998).

1.2.2.2 Candidíase vulvovaginal e resposta imune no hospedeiro

Ao longo das últimas décadas, diversas hipóteses foram propostas para explicar o papel da imunidade adaptativa na proteção e na susceptibilidade à CVV, especialmente no caso de pacientes com recorrências (Figura 5) (FIDEL, 2007).

Deficiência / Disfunção:	- Antígenos específicos e/ou células T sistêmicas não específicas	- Células T sistêmicas antígeno específicas	- Resposta Th2 CD4+ local	- Imunoregulação, ausência de resposta de célula T	- Resposta inflamatória inata de polimorfonucleares
Proteção:	**1980**	**1990**	**1995**	**2000**	**2003**
	- Células T sistêmicas	- Células T sistêmicas - Antígeno específico Ab	- Resposta Th1 CD4+ local - Antígeno específico Ab	- Células epiteliais	- Mediadores inflamatórios não inatos - Células epiteliais

Figura 5. Cronologia da história das hipóteses envolvidas na proteção ou susceptibilidade de CVV recorrente (FIDEL, 2007).

Devido à falta de comprovação de evidências plausíveis da imunidade mediada por células e anticorpos na proteção frente a casos de CVV (MATHUR et al., 1977; FIDEL et al., 1997), estudos subseqüentes propuseram a avaliação do papel da resistência inata contra vaginites causadas por *Candida* em modelos animais (BLACK et al., 1998; FIDEL et al., 1999). Contudo, os resultados obtidos também foram inconsistentes.

Recentemente, resultados obtidos a partir de um modelo de desafio *in vivo* com seres humanos, sugeriram que CVV pode ser causada por uma resposta imune inata exacerbada frente a *Candida* sp. (grande infiltração de neutrófilos), ao invés de uma deficiência na resposta de células T (FIDEL et al., 2004).

C. albicans pode afetar diretamente as células epiteliais vaginais através da mudança do perfil de citocinas produzidas, destacando-se aquelas predominantemente inflamatórias (STEELE; FIDEL, 2002). Além disso, a liberação de citocinas quimiotáticas (quimiocinas) pelas células epiteliais vaginais após contato com *C. albicans* é um mecanismo crítico para a indução de vaginite, uma vez que as quimiocinas recrutam células inflamatórias e aumentam, por conseguinte, a liberação de mediadores inflamatórios, tais quais, P-seletina, molécula de adesão vascular-1, CC14 e mieloperoxidases (FERRER, 2000; SCHALLER; MAILHAMMAR; KORTING, 2002; TRIFONOVA et al., 2007).

1.2.3 Vaginose bacteriana

Embora a exata etiologia da vaginose bacteriana (VB) não esteja completamente elucidada, essa doença é caracterizada pela diminuição significativa da população de lactobacilos produtores de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na microbiota vaginal e aumento numérico da população de microrganinsmos aeróbios facultativos e anaeróbios, incluindo *G. vaginalis*, *Mobilluncus* spp., *Atopobium* spp., *Prevotella* spp., *Bacteroides* spp., *Mycoplasma hominis*, *Megasphaera* spp. (COOK et al., 1992; ROSS; LEE; ONDERDONK, 1995; HAWES et al., 1996; CALZOLARI et al., 2000; BURTON et al., 2004; WILKS et al., 2004; FREDRICKS; FIEDLER; MARRAZZO, 2005).

A infecção é responsável por 40 a 50% dos casos de corrimento vaginal sintomáticos (O'BRIEN; SERWINT, 2008) e a prevalência desta condição durante a gravidez é de 12 a 55%, dependendo da metodologia empregada no diagnóstico (HOGAN et al., 2007). Esta patologia está associada com ruptura prematura de membranas coroamnióticas, aumento do risco de nascimento de bebês prematuros, podendo também levar à morte do recém-nascido (RALPH; RUTHERFORD; WILSON, 1999; REID; BOCKING, 2003). Há probabilidade da ocorrência de doenças inflamatórias pélvicas, infertilidade, abortos, aumento da susceptibilidade a doenças sexualmente transmissíveis (RAUH; CULHANE; HOGAN, 2000; MORRIS et al., 2001; REID, 2001) e do desenvolvimento de neoplasia intraepitelial cervical (HUDSON et al., 1997).

Entre 30% (MYER et al., 2006) e 58% (BRADSHAW et al., 2006) das mulheres experimentam episódios recorrentes de VB em um período de 12 meses após tratamento medicamentoso oral.

Embora muitas mulheres apresentem uma microbiota vaginal aberrante indicativa de VB, nem todas são sintomáticas (ALLSWORTH; PEIPERT, 2007). Mulheres acometidas por esta infecção freqüentemente apresentam corrimento e odor vaginal fétido, sendo a presença de prurido também observada em alguns casos, embora mais característica de infecções vaginais de origem fúngica (HAWES et al., 1996).

Os principais fatores de risco para a aquisição de VB incluem (i) a prática do

tabagismo (LAMONT et al., 2000); (ii) *origem racial*, sendo as mulheres negras mais propensas ao desenvolvimento da doença (GOLDENBERG et al., 1996); (iii) *práticas contraceptivas*, pois já foi sugerida a associação entre o uso de dispositivo intra-uterino e o aumento do risco de aquisição de VB, quando comparado com a utilização de contraceptivos orais (SHOUBNIKOVA et al., 1997; AVONTS et al., 1999) e (iv) *atividade sexual*, sendo a doença mais prevalente em mulheres sexualmente ativas, embora existam relatos da patologia em mulheres virgens (BUMP; BUESCHING, 1988; PRIESTLY; KINGHORN, 1996).

G. vaginalis é um patógeno que pode causar VB e apresenta diversos fatores de virulência, incluindo a produção de hemolisina, sialidase e prolidase (CAUCI et al., 2003). A colonização vaginal por espécies de *Mobilluncus* spp. está associada com aumento de sangramento vaginal e possível desenvolvimento de infecção endometrial (LARSSON et al., 1990).

De acordo com Libby et al. (2008), *Atopobium vaginae* é capaz de estimular a resposta imune inata de células epiteliais vaginais, levando a uma produção localizada de defensina e citocina, contribuindo na patogênese de VB. Enquanto alguns trabalhos sugerem que *Prevotella* spp. e *Bacteroides* spp. não são patógenos vaginais, já foi observado que microrganismos pertencentes ao primeiro gênero produzem sialidase e beta-lactamase, e, além disto, ambos são capazes de induzir a produção de ciclooxigenases e iniciar uma cascata inflamatória associada à produção de prostaglandina (CAUCI et al., 1998; REESE et al., 2000; CHANG et al., 2003). O significado clínico da presença de microrganismos do gênero *Megasphaera* em amostras vaginais é incerto (ZOZAYA-HINCHLIFFLE; MARTIN; FERRIS, 2008). Por outro lado, há indicações do envolvimento de *M. hominis* em diversas infecções genitais, casos de infertilidade, patologias obstétricas e infecções neonatais (JUDLIN, 2003).

Segundo Amsel et al. (1983), a confirmação de VB é dada pela presença de pelo menos três, dos seguintes critérios: (i) pH vaginal superior a 4,5; (ii) corrimento vaginal branco, aquoso, de aspecto homogêneo; (iii) liberação de odor de peixe no teste de “Whiff”,

que promove a reação entre solução de hidróxido de potássio (KOH) a 10% (p/v) com compostos orgânicos produzidos pelos microrganismos patogênicos (putrescina, cadaverina e trimetilamina) (PHEIFER et al., 1978) e (iv) presença de “clue cells”, que são células epiteliais vaginais parcial ou totalmente recobertas por bactérias que se aderem à sua superfície, podendo ser observadas em preparação contendo solução fisiológica de cloreto de sódio (NaCl) (0,85%, p/v) e material vaginal, sob microscopia óptica (GARDNER; DUKES, 1955).

Esfregaços vaginais preparados com coloração de Gram (Figura 6) e avaliados segundo a metodologia proposta por Nugent, Krohn e Hillier (1991), conhecido como “Escore de Nugent”, também podem ser empregados conjuntamente no diagnóstico da VB. De acordo com esse método, são avaliadas quantitativamente no espécime clínico obtido, as populações de: i) bacilos Gram-positivos (sugestivos de *Lactobacillus* sp.), ii) bacilos Gram-negativos curvos (sugestivos de *Mobilluncus* sp.) e iii) cocobacilos Gram-variáveis (sugestivos de *G. vaginalis*) presentes em cada um dos campos visualizados sob microscopia óptica de imersão (magnificação de 1000X). Com base nesses critérios são atribuídos diferentes escores e a somatória final é empregada na classificação da microbiota vaginal em *normal*, *intermediária* ou *indicativa de VB*, conforme descrito na Tabela 4.

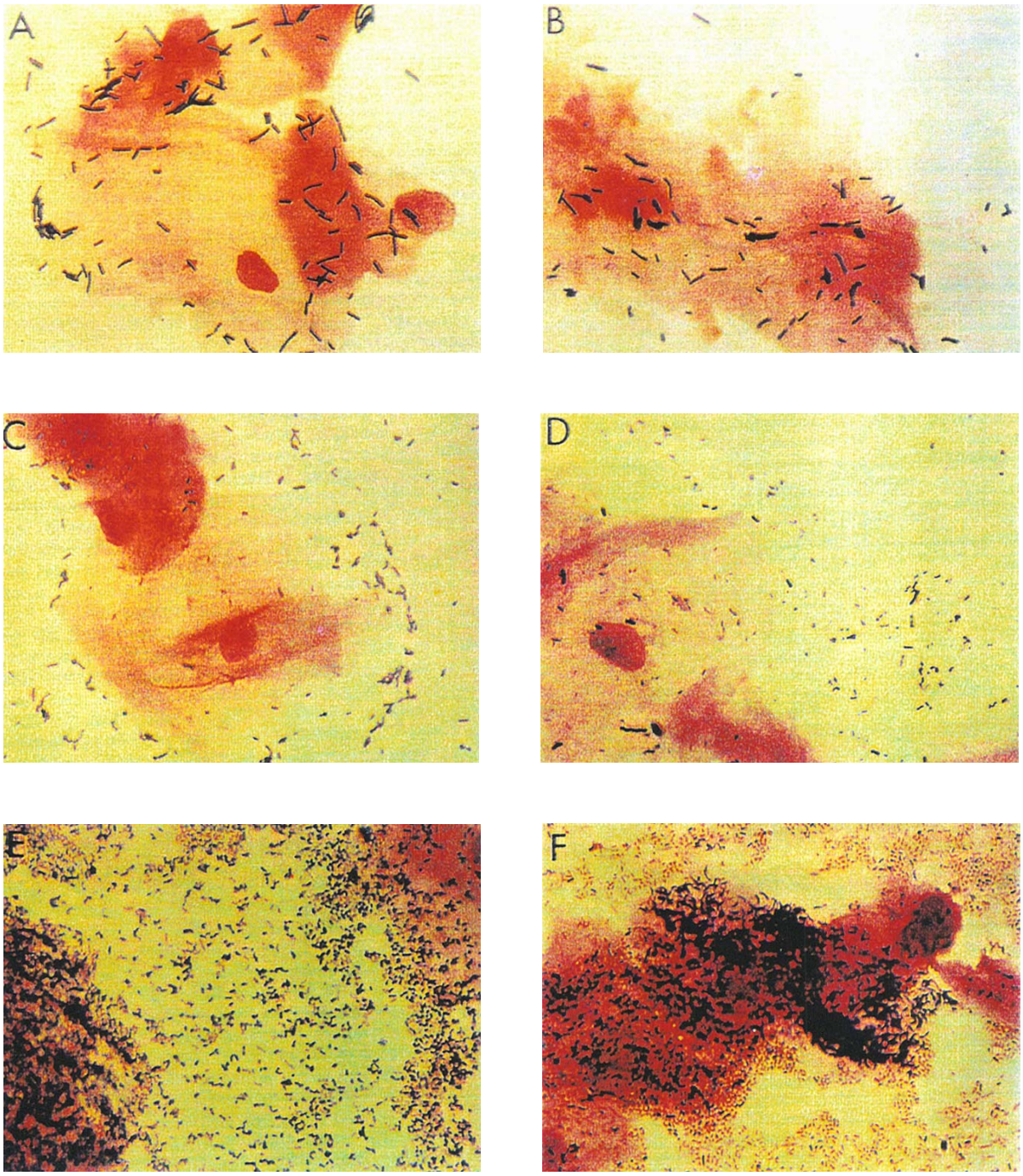


Figura 6. Esfregaços vaginais corados pelo método de Gram, exibindo microbiota vaginal normal (A e B), intermediária (C e D) e indicativa de vaginose bacteriana (E e F), visualizados sob microscopia óptica de imersão (magnificação de 1000X) (NUGENT; KROHN; HILLIER, 1991).

Tabela 4 – Sistema de escore proposto por Nugent, Krohn e Hillier (1991)*

Morfotipo bacteriano	nº de organismos/campo visualizado sob aumento de 1000X (nº de cruzes)	Escore
Lactobacillus sp.	> 30 (4+)	0
(bacilos Gram-positivos)	5 – 30 (3+)	1
	1 – 4 (2+)	2
	< 1 (1+)	3
	0 (0)	4
Mobilluncus sp.	> 5 (3+ ou 4+)	2
(bacilos Gram-negativos curvos)	1 – 4 (1+ ou 2+)	1
	0 (0)	0
Gardnerella vaginalis	> 30 (4+)	4
(cocobacilos Gram-variáveis)	5 – 30 (3+)	3
	1 – 4 (2+)	2
	< 1 (1+)	1
	0 (0)	0

* O escore final é obtido pela somatória dos escores determinados para cada população de *Lactobacillus* sp., *Mobilluncus* sp. e *G. vaginalis*, por avaliação sob microscopia de imersão – magnificação de 1000X, sendo utilizado para classificação da microbiota vaginal em normal (escore: 0 – 3), intermediária (escore: 4 – 6) e indicativa de vaginose bacteriana (escore: 7 – 10).

Segundo Mota et al. (2000), o emprego concomitante das metodologias propostas por Amsel et al. (1983) e Nugent, Krohn e Hillier (1991) é capaz de permitir o diagnóstico correto de um número maior de casos da doença.

1.2.3.1 Tratamento farmacológico de vaginose bacteriana

De acordo com o órgão norte-americano CDC (Centros pra controle e prevenção de doenças / *Centers for Disease Control and Prevention*) (2002) o tratamento padrão para VB é feito com metronidazol (Flagyl®), administrado por via oral, na dosagem de 500mg, duas vezes ao dia, durante sete dias (Tabela 5). Tratamentos com a utilização de metronidazol para tratamento tópico em gel na concentração de 0,75% (MetroGel-Vaginal®) e clindamicina em creme na concentração de 2% (Cleocin®) demonstraram aproximadamente a mesma eficácia do tratamento oral, contudo estão associados a taxas mais elevadas de recorrência da doença (FISCHBACH et al., 1993; FERRIS et al., 1995; MIKAMO et al., 1997; OWEN; CLENNEY, 2004).

Tabela 5 – Tratamentos recomendados para a vaginose bacteriana

Medicamento	Dosagem	Uso na gravidez
Metronidazol em comprimido (Flagyl®)	500mg, via oral, 2 vezes ao dia, durante 7 dias	250mg, via oral, 3 vezes ao dia, durante 7 dias
Metronidazol em gel 0,75% (MetroGel-Vaginal®)	5g, uso intravaginal 1 vez ao dia, durante 5 dias	Não*
Clindamicina em creme vaginal 2,0% (Cleocin®)	5g, uso intravaginal, 1 vez ao dia, à noite, durante 7 dias	Não*

* Dados existentes na literatura não recomendam o uso destes agentes tópicos durante gravidez
Fonte: CDC (2002)

Em estudos conduzidos por Caro-Partón et al. (1997) e Czeizel e Rockenbauer (1998) não foi demonstrado aumento do risco de nascimento de bebês com anomalias, após exposição ao metronidazol utilizado por via oral, durante o primeiro trimestre gestacional. Contudo, o medicamento ainda não é amplamente utilizado por pacientes grávidas.

O tratamento de mulheres grávidas de alto risco (histórico de parto prematuro) com VB ainda é controverso (SCHWEBKE, 2000; KEKKI et al., 2001). O CDC adverte que a utilização tópica da clindamicina (creme) pode elevar o risco do nascimento de bebês prematuros e de infecções neonatais e, portanto, não recomenda o uso desse medicamento durante o período gestacional (CDC, 2002).

Dentre os tratamentos alternativos para a VB encontram-se a dose única de 2g (via oral) de metronidazol, bem como a clindamicina, administrada tanto na forma de comprimidos para uso oral quanto óvulos para uso intravaginal (Tabela 6).

Tabela 6 – Tratamentos alternativos para a vaginose bacteriana

Medicamento	Dosagem	Uso na gravidez
Metronidazol em comprimido	2g, via oral, dose única	Não*
Clindamicina em comprimido	300mg, via oral, 2 vezes por dia, durante 7 dias	300mg, via oral, 2 vezes ao dia, durante 7 dias
Clindamicina em óvulos	100g, uso intravaginal, 1 vez ao dia, à noite, durante 3 dias	Não*

* Dados são insuficientes para recomendar a utilização desses tratamentos durante a gravidez
Fonte: CDC (2002)

Um estudo publicado por Ferris et al. (1995) demonstrou que a utilização de antibióticos para o tratamento de VB pode aumentar significativamente o risco de desenvolvimento de infecções por *Candida*. A explicação para tal observação pode estar relacionada ao fato de que, quando a paciente apresenta VB, a população de lactobacilos vaginais está reduzida ou mesmo ausente, assim, as condições encontradas para a multiplicação da levedura neste ecossistema podem ser favorecidas pela erradicação de microrganismos Gram-negativos remanescentes (REID; HAMMOND; BRUCE, 2003).

Embora o tinidazol seja utilizado no tratamento de VB fora dos Estados Unidos (EUA) há pelo menos quatro décadas, apenas recentemente o fármaco foi reavaliado e aprovado pelo órgão norte-americano FDA (Administração de medicamentos e alimentos dos EUA / *Food and Drug Administration*) para o tratamento de tricomoníase e VB e está em fase de estudo como alternativa ao metronidazol para o tratamento de VB (NAILOR; SOBEL, 2007).

De acordo com Mohanty e Deighton (1987) a utilização da dose única do medicamento (2g) é efetiva e segura no tratamento de VB. Milani, Barcellona e Agnello (2003) observaram que a taxa de cura de pacientes diagnosticadas com VB tratadas com dose única de tinidazol (2g) foi semelhante (84,0%) àquela obtida com o emprego de creme vaginal contendo clindamicina a 2,0% (5g, diariamente, durante uma semana), determinada após sete dias do início da terapia. Além disso, o uso de tinidazol foi capaz de reduzir as taxas de nascimento de bebês prematuros e de complicações perinatais em pacientes brasileiras grávidas (CAMARGO et al., 2005).

O tinidazol é um pró-fármaco estruturalmente derivado da molécula de metronidazol, que é convertido *in vivo*, para sua forma ativa. As representações das estruturas químicas de ambos os fármacos podem ser visualizadas na Figura 7.

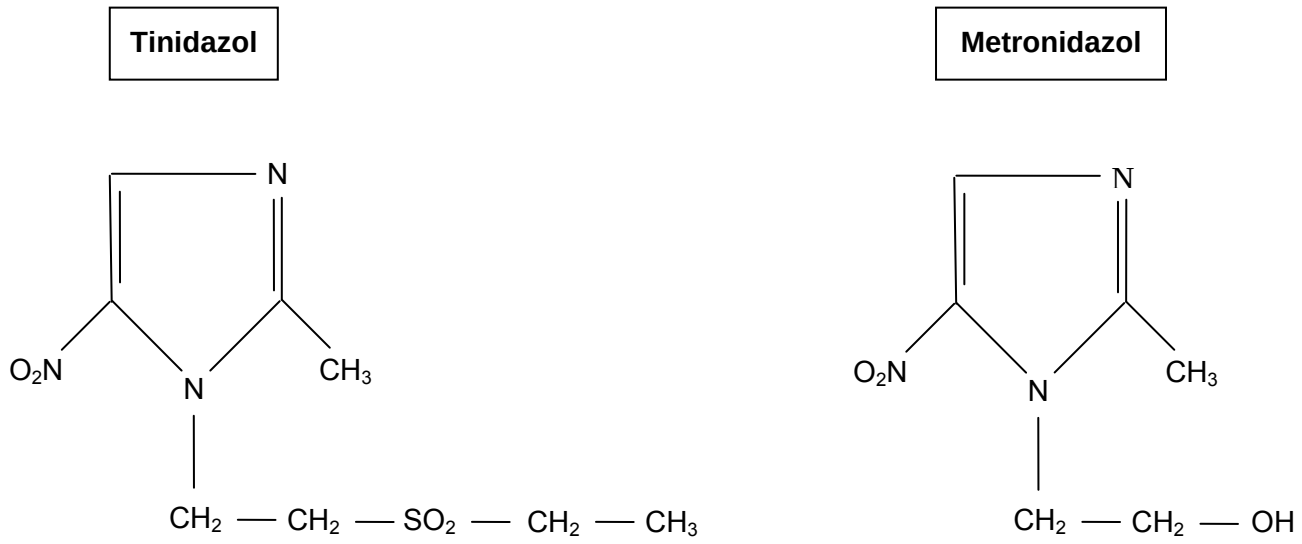


Figura 7. Estruturas químicas do tinidazol e metronidazol (REES; MCGLASHAN; MWEGA, 1974).

O mecanismo de ação do tinidazol é baseado na redução da molécula a compostos intermediários citotóxicos que se ligam covalentemente ao DNA, interferem com a estrutura helicoidal e promovem a quebra de suas fitas, causando prejuízo na função de molde para a síntese de novas moléculas de DNA, levando à morte celular (RAETHER; HÄNEL, 2003; FUNG; DOAN, 2005). Microrganismos aeróbios e células de mamíferos geralmente não são afetados pelo tinidazol devido aos altos potenciais de oxi-redução e à presença de oxigênio, que inibem o processo de redução da molécula do fármaco (NORD e KAGER, 1983). Os principais efeitos colaterais relacionados ao tinidazol são paladar alterado, náusea, desconforto abdominal, anorexia, vômito e fadiga (FUNG; DOAN, 2005).

Casos recorrentes de VB normalmente requerem tratamentos prolongados (10 a 14 dias), com qualquer uma das terapias recomendadas ou alternativas (SOBEL, 2000).

1.3 Probióticos

1.3.1 Definição

De acordo com a FAO/WHO (Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação / Organização Mundial da Saúde / *Food and Agriculture Organization of the United Nations* / *World Health Organization*) (2001), probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem efeito benéfico à saúde do hospedeiro. Os requisitos mínimos para testes pré-humanos com microrganismos que apresentam potencial probiótico incluem a ausência de genes de virulência conhecidos, como aqueles responsáveis pela produção de toxinas, proteases e hemolisinas, bem como a ausência de genes de resistência a fármacos que possam ser transmissíveis (REID, 2006).

Os principais microrganismos empregados como probióticos incluem representantes dos gêneros *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., os quais podem ser utilizados em seres humanos, tanto na forma de alimentos como de cápsulas (ADAMS; MARTEAU, 1995; NAIDU; BIDLACK; CLEMENS, 1999; REID, 2002; SAAD, 2006).

1.3.2 Vantagens e efeitos benéficos gerais da utilização de probióticos

Algumas culturas probióticas são efetivas no tratamento de desordens intestinais associadas com antibióticos, gastrenterites, diarréia do viajante, doença inflamatória intestinal e síndrome do cólon irritável. Além disso, os probióticos podem exercer efeitos terapêuticos em relação a processos alérgicos, auxiliarem no tratamento/prevenção de infecções urogenitais, estimularem o sistema imune e exercerem efeito antitumoral (SALMINEN et al., 1998; ISOLAURI et al., 2001; MARTEAU, 2002; AMITAL; GILBURD; SHOENFELD, 2003; REID; BURTON, 2002; REID et al., 2003; GILL; PRASAD, 2008).

A maior parte dos estudos relacionando a utilização de bactérias probióticas e a imunomodulação em seres humanos e animais, discorrem sobre efeitos observados na resposta imune intestinal e sistêmica. Estes efeitos incluem a estimulação não específica de

mecanismos de resistência a patógenos microbianos, tais quais elevação da produção e atividade de fagócitos (PERDIGÓN et al., 1986; PERDIGÓN et al., 1988); aumento da responsividade de imunoglobulinas A, de maneira sistêmica e na mucosa intestinal (KAILA et al., 1992; ISOLAURI et al., 1993; SHROFF; MESLIN; CEBRA, 1995) e supressão da proliferação de linfócitos e da produção de citocinas inflamatórias por células T (SÜTAS; HURME; ISOLAURE, 1996; SÜTAS et al., 1996).

Estudos em animais demonstraram que o efeito antitumoral está relacionado à competição entre BAL e alguns microrganismos que são capazes de ativar enzimas implicadas na geração de substâncias carcinogênicas e/ou mutagênicas em células de intestino, bexiga e estômago (HALPERN et al.,1991; PEUHKURI et al., 1996; DUNNE et al., 1999; NAIDU; BIDLACK; CLEMENS, 1999).

Os microrganismos probióticos atuam por meio de diversos mecanismos, diminuindo o risco de desenvolvimento de resistência pelos patógenos através de mutações pontuais, encorajando maiores investigações e investimentos nessa área. A tecnologia necessária para a indústria farmacêutica produzir agentes probióticos é viável, com custos de produção razoáveis (ELMER; SURAWICZ; MCFARLAND, 1996).

1.3.3 Características de lactobacilos para utilização como culturas probióticas em infecções vaginais

De acordo com REID e BURTON (2002), dentre os pré-requisitos desejáveis para que representantes das espécies do gênero *Lactobacillus* sejam empregadas como probióticos em infecções vaginais, encontram-se: capacidade de adesão às células epiteliais vaginais, inibição da adesão e multiplicação de microrganismos patogênicos, depleção de nutrientes disponíveis para patógenos, alterações do microambiente e modulação da resposta imune do hospedeiro.

O papel protetor de lactobacilos vaginais tem sido atribuído principalmente à capacidade que esses microrganismos apresentam em aderir-se às células epiteliais vaginais e sintetizar diversas subtâncias inibitórias a patógenos do trato vaginal: H_2O_2,

ácidos orgânicos, bacteriocinas, biosurfactantes, moléculas de auto e co-agregação e a enzima arginina desaminase (MCLEAN; MCGROARTY, 1996; REID, 2001; LEPARGNEUR; ROUSSEAU, 2002; VALORE et al., 2002; MARTÍN et al., 2008). Contudo, esta é uma generalização e todas as propriedades podem não ser requeridas para prevenir o processo infeccioso causado por um dado microrganismo (REID; BURTON, 2002).

Além disso, de acordo com a FAO/WHO (2002) ficou estabelecido que a seleção *in vitro* de microrganismos com potencial probiótico, não significa necessariamente que os mesmos sejam de fato probióticos, uma vez que para corroborar tal atribuição, testes clínicos com seres humanos são requeridos.

1.3.3.1 Adesão a células epiteliais vaginais

A capacidade de adesão de um microrganismo representa um fator importante na colonização de membranas mucosas, sendo um dos principais fatores a ser considerado para avaliar o potencial para utilização como cultura probiótica (COLLINS; THORNTON; SULLIVAN, 1998; O'BRIEN et al., 1999). A adesão a superfícies celulares favorece a colonização do epitélio vaginal através da formação de um biofilme bacteriano contribuindo para a exclusão de microrganismos patogênicos (BALOTESCU; PETRACHE, 2004).

Até o presente momento, poucas informações são conhecidas a respeito dos mecanismos moleculares exatos pelos quais lactobacilos provenientes de mulheres saudáveis aderem-se às células epiteliais vaginais, embora um amplo espectro de mecanismos possa estar envolvido (BORIS et al., 1998; ANDREU et al., 1995).

1.3.3.2 Peróxido de hidrogênio

O H_2O_2 é normalmente produzido por certos microrganismos que se desenvolvem de forma aeróbia, pois nestas condições, o oxigênio é utilizado como aceptor de elétron, sendo reduzido a H_2O_2 ou água. Os lactobacilos (e as demais espécies de BAL) não possuem o grupo heme, portanto não utilizam o sistema de citocromo (que reduz o oxigênio molecular à molécula de água) para a oxidação terminal durante o processo respiratório

(PIARD; DESMAZEAUD, 1991). Whittenbury (1964) sugeriu que esses microrganismos possuem flavoproteínas oxidases, que catalizam a produção de H_2O_2. Este mecanismo, aliado à ausência de hemeproteína catalase, gera H_2O_2 em quantidades que excedem a capacidade do microrganismo em degradá-lo.

Na microbiota vaginal humana saudável, através de um mecanismo de defesa antimicrobiano não específico, as espécies de lactobacilos produzem grande quantidade de H_2O_2, que pode ser convertido em compostos citotóxicos, como algumas espécies reativas ao oxigênio (ROS), tais quais ânions superóxidos e radicais hidroxila, devido à presença de agentes redutores e peroxidases (KLEBANOFF, 1967; REDONDO-LOPEZ; COOK; SOBEL, 1990; LARSEN, 1993).

Desse modo, os lactobacilos mantêm um alto potencial de oxi-redução no ambiente vaginal, o que poderia ser um dos principais fatores responsáveis pelo domínio desses microrganismos no trato vaginal saudável. O principal mecanismo de ação antimicrobiano pode ser atribuído à reação de ROS com proteínas, ácidos nucléicos ou outras biomoléculas presentes nos microrganismos alvo (JUVEN; PIERSON, 1996; OCAÑA; PESCE DE RUIZ HOLGADO; NADER-MACÍAS, 1999; AROUTCHEVA et al, 2001).

A ausência de lactobacilos produtores de H_2O_2 na microbiota vaginal está relacionada a um maior risco de aquisição de VB, infecções recorrentes do trato urinário por *E. coli*, aquisição de vírus da imunodeficiência humana (HIV) do tipo 1, gonorréia e herpes vírus do tipo 2 (VALLOR et al., 2001; CHERPES et al., 2003; TOMÁS et al., 2004).

1.3.3.3 Ácidos orgânicos

No trato vaginal, níveis elevados de estrógenos estimulam o depósito de glicogênio no epitélio, que é utilizado no metabolismo anaeróbio de bactérias residentes neste sítio anatômico, levando à produção de ácidos lático, fórmico, succínico, acético, propiônico e butírico (PAAVONEN, 1983; STANEK et al., 1992; BOSKEY et al., 1999). As bactérias produzem tanto as formas D ou L, quanto misturas racêmicas DL e, por conseguinte, representam a primeira fonte de produção de ácido lático no meio vaginal (BOSKEY et al.,

2001). Em pacientes saudáveis, o nível de ácido lático em amostras de exsudato vaginal encontra-se na faixa de 0,9 a 4,0g/L (BOSKEY et al., 2001).

A produção de ácidos orgânicos mantém o pH vaginal inferior a 4,5 criando um ambiente inóspito para o desenvolvimento da maior parte dos microrganismos endógenos patogênicos (AROUTCHEVA et al., 2001). A importância dos ácidos orgânicos na manutenção de uma microbiota vaginal saudável foi comprovada por Valore et al. (2002), que avaliaram exsudatos vaginais de pacientes saudáveis e observaram que os maiores níveis de atividade antimicrobiana (em relação a *C. albicans*, *E. coli* e estreptococos do grupo B) estavam relacionados às amostras contendo os maiores níveis de ácido lático.

Além disso, o pH ácido vaginal é capaz de aumentar significativamente a capacidade de ligação de lactobacilos ao epitélio vaginal (NAGY; FROMAN; MARDTH, 1992) e reduzir a atividade de diversas enzimas de bactérias patogênicas, incluindo a sialidade (CAUCI et al., 1998).

1.3.3.4 Bacteriocinas

Algumas espécies de lactobacilos vaginais são capazes de produzir proteínas ou peptídeos, denominados bacteriocinas, que são compostos dotados de atividade antimicrobiana (KLAENHAMMER, 1988). As bacteriocinas apresentam cerca de 20 a 60 resíduos de aminoácidos, possuem características anfipáticas e ponto isoelétrico elevado. São produzidas por diversas espécies bacterianas e apresentam diferentes mecanismos de ação, espectro de atividade, massa molecular, propriedades bioquímicas e origem genética (CAROLISSEN-MACKAY; ARENDSE; HASTINGS, 1997).

De acordo com Tagg, Dajani e Wannamaker (1976), seis critérios eram necessários para a caracterização de bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas: i) presença de fração protéica biologicamente ativa; ii) estreito espectro de ação, inibindo apenas espécies homólogas; iii) mecanismo de ação bactericida; iv) capacidade de ligação a receptores específicos; v) presença de determinantes genéticos de origem plasmidial que codificam para a sua produção e imunidade; vi) biossíntese letal.

De acordo com Montville e Kaiser (1993) as bacteriocinas de BAL são substâncias protéicas e não são letais para as células produtoras. O principal alvo de ação das mesmas são as bactérias Gram positivas, sendo o espectro de ação dessas substâncias denominado estreito, no caso de apresentarem atividade antagonística frente a bactérias da mesma espécie do organismo produtor e bactérias taxonomicamente relacionadas; ou amplo, no caso de inibirem diferentes gêneros de microrganismos (KLAENHAMMER, 1988; BORIS; BARBÉS, 2000; COTTER; HILL; ROSS, 2005). As bactérias Gram-negativas são sensíveis às bacteriocinas de BAL apenas após tratamentos que desestruturem a membrana externa. Por exemplo, o uso de agentes quelantes que seqüestram íons metálicos divalentes da membrana externa desses microrganismos, desestrutura a membrana plasmática e altera sua permeabilidade, tornando a bactéria sensível à ação da bacteriocina (BOZIARIS; ADAMS, 1999; COTTER; HILL; ROSS, 2005).

De acordo com Klaenhammer (1993), bioquimicamente, as bacteriocinas podem ser divididas em quatro classes: (i) lantibióticos, pequenos peptídios [<5 KDalton (KDa)] ativos em membranas, que apresentam anéis de tioéter intramoleculares como a lantionina, a β-metil-lantionina e resíduos desidratados. O tipo “A” dos lantibióticos são alongados, catiônicos e possuem peptídios formadores de poros, alguns dos quais se constituem de dois componentes (NAVARATNA; SAHL; TAGG, 1998). O tipo “B” dos lantibióticos apresenta uma estrutura globular maior, são inibidores de enzimas e imunologicamente ativos; (ii) peptídios pequenos (<10KDa), hidrofóbicos, resistentes ao aquecimento, que não apresentam lantioninas e são divididos em três subgrupos, dentre os quais: (iia) peptídeos ativos contra *Listeria*, apresentando uma seqüência N-terminal comum, (iib) peptídeos formadores de poros na membrana celular, constituídos de duas subunidades, (iic) peptídeos ativados por tiol, necessitando de resíduos de cisteína reduzida a fim de se converterem para a forma ativa; (iii) grandes proteínas termolábeis (>30KDa) e finalmente (iv) proteínas complexas, cuja atividade necessita da associação de moléculas de carboidratos ou lipídeos (LEROY; DE VUYST, 2000).

Uma classificação mais atual para as bacteriocinas foi proposta por Cotter, Hill e

Ross (2005), em que são reconhecidas apenas duas categorias: i) classe I: formada pelas bacteriocinas que contêm lantionina. Neste grupo diferenciam-se os lantibióticos simples, formados por um peptídeo (nisina, lacticina 481 e mersacidina) e lantibióticos duplos, formados por dois peptídeos (citolisina e lacticina 3147), ii) classe II: formada pelas bacteriocinas que não contêm lantionina. Tal classe encontra-se ainda subdividida em classe IIa (que inclui bacteriocinas do tipo-pediocina – leucocina A e pediocina PA1), classe IIb (que inclui bacteriocinas formadas por dois peptídeos – lactacina F), classe IIc (que inclui bacteriocinas cíclicas – enterocina AS48 e reutericina 6) e classe IId (que inclui peptídeos lineares simples diferentes da pediocina – divergicina A e lactococina A). Ademais, estes autores denominaram como *bacteriolisinas* as bacteriocinas da classe III propostas por Klaenhammer (1993), com base nas diferenças de tamanho, estabilidade térmica, mecanismo de ação, estrutura e genoma daquelas em relação às verdadeiras bacteriocinas. Exemplos de bacteriolisinas citadas incluem a lisostafina e enterolisina A.

Cotter, Hill e Ross (2005) sugeriram ainda que as bacteriocinas circulares, recentemente descobertas e atualmente consideradas como classe V, sejam incluídas na classe II. Por sua vez, a classe IV não foi considerada na nova proposta visto que, segundo os autores, não há demonstração incontestável da existência de algum membro desta classe.

Diversos modos de ação já foram sugeridos para as bacteriocinas, dentre os quais o mais aceito envolve a formação de poros na membrana citoplasmática com conseqüente efluxo de substâncias intracelulares de baixo peso molecular, com perda de trifosfato de adenosina (ATP) citoplasmático e conseqüente dissipação da força próton-motriz, resultando na inativação ou morte celular (CLEVELAND et al., 2001).

1.3.3.5 Biosurfactantes

Estas substâncias são produzidas por algumas espécies de lactobacilos e podem inibir a adesão de patógenos a tecidos epiteliais (REID, 2001). Estes compostos de natureza hidrofóbica e/ou hidrofílica são liberados e acumulam-se em alguns tipos de interfaces, mais

notoriamente nas líquido-ar (VELRAEDS et al., 1996). Alguns biosurfactantes são resistentes a temperaturas de até 75ºC e à ação de enzimas como a pepsina e tripsina, embora sejam sensíveis a α-amilase e lisozima (VELRAEDS et al., 1998).

1.3.3.6 Moléculas de auto e co-agregação

O termo auto-agregação é empregado para a agregação de microrganismos da mesma linhagem, enquanto que co-agregação é utilizado para diferentes linhagens de bactérias ou outros microrganismos. Ambos funcionam como um mecanismo de defesa do hospedeiro frente a agentes patogênicos (OCAÑA; NADER-MACÍAS, 2002).

A auto-agregação entre lactobacilos pode elevar seu potencial de colonização no epitélio vaginal, contribuindo para a exclusão de agentes patogênicos e provavelmente trata-se de uma característica inerente ao microrganismo (OCAÑA; NADER-MACÍAS, 2002).

As moléculas de co-agregação produzidas por algumas espécies de lactobacilos são responsáveis pelo bloqueio da disseminação de patógenos como *C. albicans* e *G. vaginalis* para receptores teciduais (BORIS ET AL., 1998; REID, 2001). Segundo Mastromarino et al. (2002), a co-agregação é fator essencial na manutenção de uma microbiota vaginal sadia, uma vez que resultaria em uma concentração de substâncias inibitórias ao redor do patógeno, sintetizadas por bactérias do gênero *Lactobacillus*.

1.3.3.7 Arginina desaminase

Lactobacilos vaginais podem produzir a enzima arginina desaminase, que degrada a molécula de arginina em citrulina e amônia, as quais são utilizadas como fonte de carbono e energia por esses microrganismos, privando bactérias patogênicas envolvidas na VB de utilizarem aquele aminoácido (LEPARGNEUR; ROUSSEAU, 2002).

Os microrganismos patogênicos envolvidos na VB são capazes de converter moléculas de arginina em putrescina, através de um sistema enzimático que apresenta a enzima arginina descarboxilase. A putrescina é uma poliamina, grupo ao qual também pertencem a espermina, a cadaverina e a trimetilamina. Essas substâncias são detectadas

em concentrações elevadas em pacientes com VB e também são sintetizadas a partir da descarboxilação de outras classes de aminoácidos, sendo responsáveis pelo mau odor vaginal observado quando da presença da patologia (CHEN et al., 1979; CLAY, 1982).

As poliaminas estão relacionadas a diversos efeitos negativos para o hospedeiro, como a ruptura da integridade da mucosa vaginal e a esfoliação de células epiteliais vaginais (FAMULARO et al., 2001).

A figura 8 reúne as reações envolvidas no metabolismo da arginina pela microbiota vaginal saudável (representada majoritariamente por espécies de lactobacilos) e por patógenos causadores da VB (LEPARGNEUR; ROUSSEAU, 2002).

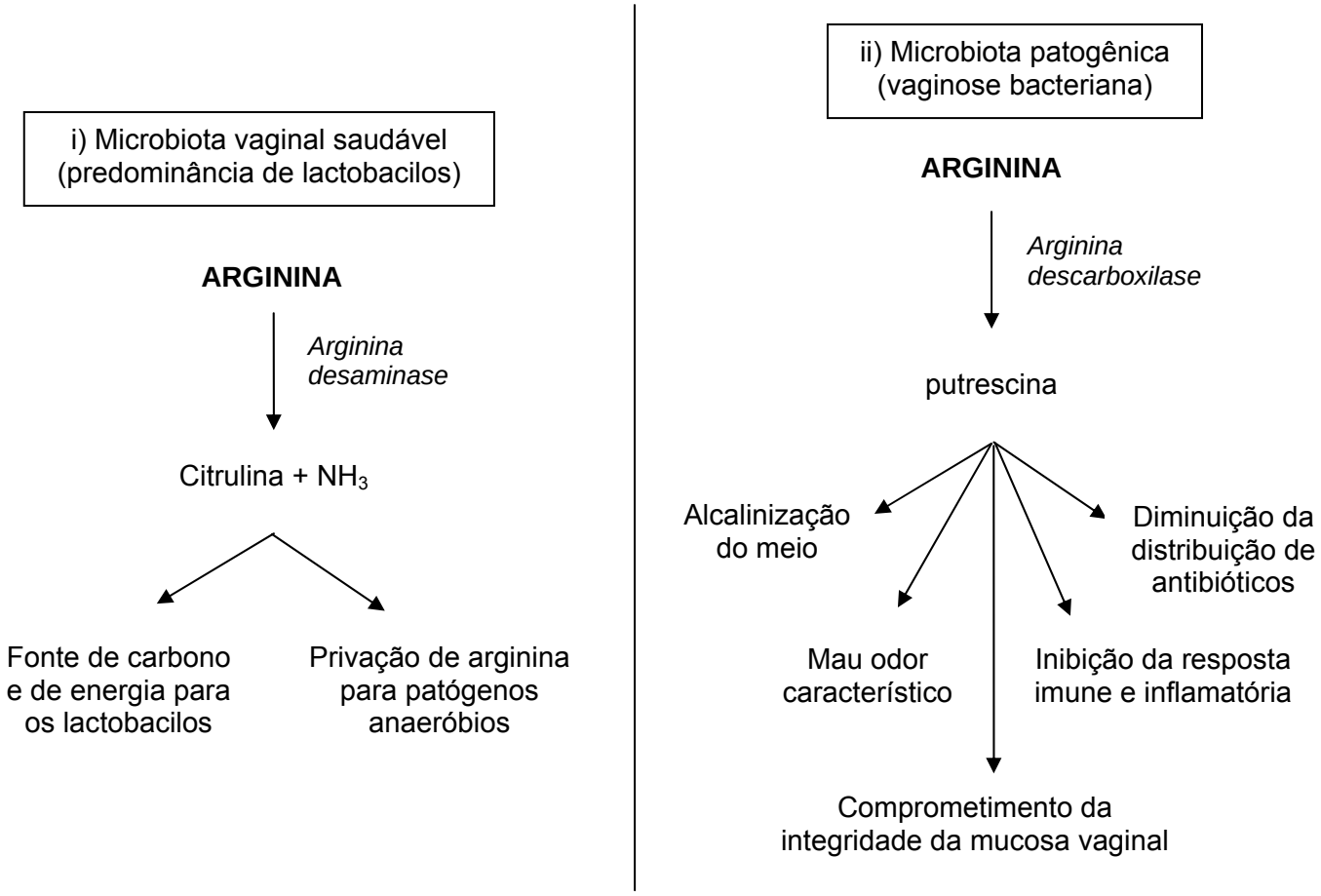


Figura 8. Reações do metabolismo da arginina por: i) lactobacilos vaginais produtores da enzima arginina desaminase e ii) microrganismos patogênicos causadores de vaginose bacteriana produtores da enzima arginina descarboxilase (LEPARGNEUR; ROUSSEAU, 2002).

1.3.4 Cepas de BAL estudadas para aplicação como culturas probióticas em infecções do trato urogenital

O conceito de restaurar a população de lactobacilos da microbiota vaginal como forma de prevenir infecções foi concebido pelo urologista canadense Andrew W. Bruce no início da década de 1970 (REID et al., 2003).

É provável que os lactobacilos possam exercer efeito benéfico na prevenção e/ou tratamento de infecções urogenitais através de um, ou o conjunto de mecanismos: (i) ascensão dos microrganismos probióticos provenientes do reto em direção à vagina, (ii) ascensão reduzida de patógenos do reto para a vagina ou (iii) aumento da imunidade da mucosa intestinal, que por sua vez afetaria a imunidade vaginal, tornando o trato vaginal menos susceptível à colonização e multiplicação de microrganismos patogênicos (REID; BOCKING, 2003; REID; BRUCE, 2003; REID et al., 2003).

1.3.4.1 Estudos sobre a utilização de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 para o tratamento/prevenção de infecções urogenitais

Até o presente momento, a combinação de duas linhagens de microrganismos, *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14, mostrou-se a mais promissora na restauração e manutenção de uma microbiota vaginal saudável (REID, 1999; REID, 2008).

L. rhamnosus GR-1 foi inicialmente designado como *L. casei rhamnosus* GR-1 (REID; COOK; BRUCE, 1987). *L. reuteri* RC-14, por sua vez, foi identificado no ano de 1986 como *L. acidophilus* RC-14 através de testes bioquímicos e reclassificado posteriormente como *L. fermentum* RC-14 através de análise de ribotipagem (ZHONG et al., 1998). No ano de 2006, através de análise por hibridização DNA-DNA, o microrganismo foi finalmente renomeado como *L. reuteri* RC-14 (CADIEUX et al., 2008).

L. rhamnosus GR-1 foi isolado da porção da uretra distal de uma mulher saudável e é uma linhagem bacteriana altamente aderente ao epitélio urinário e vaginal, é resistente a substâncias espermicidas, não produz H_2O_2, é capaz de produzir bacteriocina, inibe o crescimento, a adesão e a formação *in vitro* de biofilmes de patógenos Gram-negativos e *C.*

albicans. *L. reuteri* RC-14 é uma linhagem isolada da microbiota vaginal de uma paciente saudável e é capaz de produzir H_2O_2 e um potente biossurfactante de 29KDa que se liga ao colágeno de células epiteliais vaginais, inibindo a adesão de *E. coli*, *E. faecalis*, *K. pneumonia*e, *P. aeruginosa*, estreptococos do grupo B, *Staphylococcus epidermidis*, *C. albicans* e *G. vaginallis* (REID; COOK; BRUCE, 1987; REID; TIESZER; LAM, 1995; VELRAEDS et al., 1996; HOWARD et al., 2000; REID, 2000; REID, 2001; REID et al., 2001a; REID et al., 2001b; GARDINER et al., 2002b; REID; BURTON, 2002; BURTON; CADIEUX; REID, 2003; REID et al., 2003; REID; BOCKING, 2003; REID; BRUCE, 2003).

L. rhamnosus GR-1 e *L. reuteri* RC-14 são tolerantes à bile e ao baixo pH estomacal, colonizam o trato gastrintestinal (TGI) e a vagina e não induzem inflamação sistêmica (ausência de efeito nos níveis séricos de imunoglobulinas (Ig) do tipo G, A e M) (REID et al., 2001a; CADIEUX et al.; 2002; GARDINER et al., 2002b; BURTON; CADIEUX; REID, 2003; MORELLI et al., 2004).

L. rhamnosus GR-1 e *L. reuteri* RC-14 foram preparados para comercialização na forma farmacêutica de cápsulas (cada uma contendo 10^9 UFC de ambos os microrganismos) através de cooperação internacional entre as empresas Christian Hansen (Dinamarca) e Urex Biotech. Inc. (Canadá), tendo o produto final sido designado como “Urex-Cap-5®”. As cápsulas podem ser mantidas à temperatura ambiente e sob tal condição, os microrganismos probióticos são viáveis por um período de até dois anos (ANUKAM et al., 2006b). O objetivo principal da utilização deste produto é restaurar o equilíbrio natural da microbiota vaginal, contribuindo na prevenção e tratamento de infecções urogenitais.

Após a ingestão oral das cápsulas de Urex-Cap-5® e passagem pelo estômago, as BAL são liberadas no intestino delgado: (i) sob a ação do baixo pH do suco gástrico, a cápsula é dissolvida, (ii) a matriz polissacarídica que compõe o excipiente da formulação do probiótico é hidratada, formando uma matriz de gel insolúvel, que é capaz de proteger as bactérias probióticas em seu interior e (iii) na porção superior do intestino delgado, a matriz é dissolvida e as bactérias probióticas reidratadas são liberadas em estado biológico ativo.

Alguns estudos têm demonstrado que a incidência de ITU em mulheres pode ser significativamente reduzida, após a utilização intravaginal de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 (BRUCE; REID, 1988; BRUCE et al., 1992; REID; BRUCE; TAYLOR, 1995).

Anukam et al. (2006a) avaliaram um grupo de 125 mulheres da Nigéria diagnosticadas com VB que foram tratadas com metronidazol (500mg, duas vezes ao dia, durante sete dias) e aleatoriamente suplementadas com cápsulas para uso diário (duas vezes ao dia, durante 30 dias) contendo os microrganismos probióticos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 ou placebo. Aqueles autores relataram que ao final do período de tratamento as pacientes foram reavaliadas e 88,0% das que fizeram uso do metronidazol e probiótico foram curadas, em comparação a 40,0% determinado no grupo das que utilizaram probiótico e placebo (p<0,001).

Em outro estudo realizado por Anukam et al. (2006b), foram empregadas novamente as linhagens de microrganismos probióticos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 para o tratamento de mulheres diagnosticadas com VB. As pacientes daquele estudo utilizaram metronidazol gel vaginal (0,75%) ou cápsulas para uso intravaginal contendo 10^9 UFC de cada uma das linhagens de microrganismos probióticos, uma vez ao dia, durante cinco dias. As taxas de cura de VB obtidas por Anukam et al. (2006b), determinadas respectivamente com a utilização dos microrganismos probióticos e metronidazol foram de 80,0% *versus* 45,0% (determinada após seis dias do início do tratamento), 85,0% *versus* 45,0% (verificada no 15º dia) e 90,0% *versus* 55,0% (obtida no 30º dia).

1.3.4.2 Outros estudos sobre a utilização de BAL no controle/prevenção de infecções vaginais

No caso de pacientes com CVV, apenas um estudo é descrito na literatura no sentido de tratar a infecção apenas com BAL. Hilton, Rindos e Isenberg (1995) avaliaram um grupo de 28 mulheres com sintomas de CVV que foram tratadas com supositórios vaginais impregnados com *Lactobacillus* e observaram que após uma semana, todas as mulheres relataram melhora dos sinais e sintomas da infecção.

Para avaliar o efeito de BAL na prevenção de CVV, Hilton, Rindos e Isenberg (1992) realizaram um estudo randomizado controlado, no qual foram acompanhadas 33 pacientes com CVV recorrente que consumiram diariamente cerca de 225g de iogurte contendo *L. acidophilus* durante seis meses e, nos seis meses seguintes, realizaram dieta na qual restringiram totalmente o consumo de iogurte. Assim, naquele estudo, as pacientes serviram como seus próprios controles, já que fizeram uso das duas terapias. Apesar do fato de apenas 13 mulheres terem concluído o estudo, o número de episódios de CVV (confirmados através de exame clínico e cultura positiva para *Candida* sp.) por paciente foi de 0,38±0,51 durante o período em que o iogurte foi consumido, em comparação a 2,54±1,66 durante os seis meses sem a ingestão de iogurte.

Por outro lado, um estudo duplo-cego, placebo-controlado, conduzido por Williams et al. (2001), evidenciou que a utilização intravaginal de *L. acidophilus* ou de clotrimazol, uma vez por semana, foi capaz de prevenir o desenvolvimento de CVV em pacientes HIV-positivas, em comparação com o grupo de mulheres que receberam placebo. Aqueles autores relataram que a reavaliação clínica e análise laboratorial de espécimes clínicos coletados foram realizadas a cada seis meses, sendo que a duração média da participação de cada sujeito no estudo foi de 21 meses.

Por outro lado, mais recentemente, Pirotta et al. (2004) conduziram um estudo duplo-cego, placebo-controlado com mulheres não grávidas em Melbourne (Austrália) e verificaram que comprimidos contendo *L. rhamnosus* e *Bifidobacterium longum* administrados durante seis dias por via oral (duas vezes ao dia) ou *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii*, *L. acidophilus* e *Streptococcus thermophilus* administrados por via vaginal (uma vez ao dia, no período da noite), não foram efetivos para a prevenção de CVV após tratamento com diferentes medicamentos antimicrobianos, quando comparado a pacientes que receberam placebo.

Por sua vez, um dos primeiros estudos descritos na literatura a respeito da utilização de lactobacilos no tratamento de pacientes com VB foi realizado por Fredricsson et al. (1989). Aqueles autores diagnosticaram a infecção com base na presença de três ou

quatro dos critérios propostos por Amsel et al. (1983) e a cura foi definida como ausência dos critérios ou presença de apenas um deles. As pacientes foram randomizadas para receberem durante sete dias, duas vezes ao dia, um dos seguintes tratamentos: 5mL de leite fermentado contendo *L. acidophilus* NCDO 1748 ($5x10^8$ a $2x10^9$ UFC/mL) (n=13), 5mL de geléia de ácido acético (n=15), 5mL de creme contendo estrógeno (n=16) ou metronidazol para uso vaginal (comprimido de 500mg) (n=15). Após quatro semanas do inicio da terapia, o grupo probiótico apresentou taxa de cura para VB de 7%, comparado a 18%, 6% e 93% nos grupos que utilizaram geléia de ácido acético, creme com estrógeno e metronidazol, respectivamente, demonstrando que o microrganismo empregado não foi capaz de curar a infecção.

Hallén, Jarstrand e Påhlson (1992) compararam a taxa de cura para VB em 57 mulheres com idade média de 24 anos que foram tratadas com probiótico ou placebo. O diagnóstico da infecção foi baseado na presença de três ou quatro dos critérios propostos por Amsel et al. (1983). As pacientes foram randomizadas para receber supositórios vaginais contendo *L. acidophilus* (10^{8-9} UFC/supositório) (n=28) ou placebo (n=29) duas vezes ao dia, durante seis dias. A taxa de cura de VB foi avaliada pela resolução dos sintomas. Na primeira reavaliação (7 a 10 dias após o inicio do tratamento), a taxa de cura de VB foi de 57% no grupo probiótico e 0% no grupo placebo (p<0,05). Três pacientes no grupo placebo apresentaram persistência dos sintomas e necessitaram de tratamento com metronidazol. No entanto, entre 20 e 40 dias após o inicio da terapia, as taxas de cura diminuíram para 21% no grupo probiótico e permaneceram em 0% no grupo placebo, não tendo sido detectada diferença estatística entre ambas.

Em um estudo duplo-cego, placebo-controlado, Eriksson et al. (2005) avaliaram os efeitos da suplementenção com lactobacilos na taxa de cura de 187 mulheres em um período de dois ciclos menstruais. Todas as pacientes receberam durante três dias tratamento com óvulos contendo clindamicina (100mg, uma vez ao dia, durante três dias) e em seguida fizeram uso (de forma aleatória) de tampões contendo linhagens de lactobacilos (*L. fermentum*, *L. casei-rhamnosus* e *L. gasserii*, 10^8 UFC de cada microrganismo) ou

placebo, durante o ciclo menstrual seguinte. Após o segundo período menstrual, as taxas de cura para VB (baseadas na ausência do critério de Amsel) determinadas nos grupos probiótico e placebo foram semelhantes, 56% e 62%, respectivamente.

Delia et al. (2006) avaliaram dois grupos de mulheres com VB, sendo que um deles foi tratado com supositórios vaginais contendo "*L. acidofilus*" e o outro recebeu suplementação oral com *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19 (por três meses). Os autores constataram que nos dois grupos houve redução dos sintomas da infecção, além de diminuição do pH vaginal e melhora do teste de "Whiff". No caso do grupo de mulheres que recebeu suplementação com lactobacilos para uso oral, verificou-se ainda um efeito benéfico a longo prazo, notadamente três meses após o final do tratamento. O efeito foi atribuído à capacidade de *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19 usado por via oral modular não apenas a microbiota vaginal, mas também a intestinal, otimizando a terapia empregada.

Mais recentemente, Larsson et al. (2008), realizaram um estudo duplo-cego, placebo-controlado no qual observaram que o uso de clindamicina tópica (2,0%, durante sete dias) seguida da inserção vaginal de cápsulas contendo cada uma 10^{8-9} UFC de ambos *L. gasseri* Lba EB01 - DSM 14869 e *L. rhamnosus* Lbp PB01 – DSM 14870 liofilizados, diariamente, por 10 dias durante três ciclos menstruais não melhorou a eficácia da terapia de VB durante o primeiro mês de tratamento, contudo prolongou o tempo para a ocorrência de recidiva, avaliada após seis meses de tratamento.

Apesar de algumas BAL avaliadas apresentarem potencial clínico, devido à limitação de estudos sobre os efeitos linhagem-específicos, pequenos grupos de pacientes avaliados, ausência de grupos controles e falta de dados quanto à estabilidade dos microrganismos testados, não é possível avaliar conclusivamente a efetividade de sua utilização no tratamento e/ou prevenção de infecções vaginais.

2. RELEVÂNCIA DO PRESENTE ESTUDO

Não foram encontrados estudos publicados em periódicos indexados em bases de dados científicos, a respeito da prevalência de espécies de lactobacilos na microbiota vaginal de mulheres brasileiras saudáveis, acometidas com CVV e VB. A obtenção desses dados é relevante para melhor compreensão da ecologia da microbiota vaginal, a fim de otimizar os tratamentos existentes para infecções vaginais. A utilização de métodos distintos de biologia molecular para avaliar as diferentes populações de lactobacilos vaginais nessas pacientes, pode contribuir para um melhor conhecimento das espécies presentes. Há carência de dados quanto à importância da produção de H_2O_2 por lactobacilos vaginais, comparando-se os diferentes grupos de pacientes saudáveis e com infecções vaginais.

Até o presente momento, estudos preliminares realizados em países estrangeiros com as duas linhagens de BAL probióticas, *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14, contaram com a participação de pacientes voluntárias para a avaliação da eficácia de uso desses microrganismos, dando-se maior ênfase ao tratamento de VB. Contudo, a habilidade de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 como co-adjuvantes no tratamento de CVV não é conhecida.

As infecções vaginais apresentam elevadas taxas de prevalência na população, estão associadas com considerável morbidade e são responsáveis por custos elevados para o sistema de saúde (FALAGAS; BETSI; ATHANASIOU, 2006).

Somente nos EUA, no ano de 1995 foram gastos aproximadamente US$ 1,8 bilhão de dólares com o tratamento de CVV e acredita-se que esse valor poderá atingir US$ 3,1 bilhões em 2014 (FOXMAN et al., 2000).

Os fatores de risco mais importantes associados com o nascimento de bebês prematuros incluem parto prematuro prévio e desenvolvimento de VB durante o período gestacional. A prevalência de recém-nascidos nessa condição é de 5% a 12% em países desenvolvidos e de até 40% nas regiões mais pobres, sendo a causa mais importante de mortalidade neonatal e problemas neurológicos a curto e longo prazo (EGAN et al., 2008).

Portanto, há necessidade do desenvolvimento de novos agentes com eficácia comprovada para a prevenção e tratamento de infecções vaginais.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Estudar as espécies de lactobacilos vaginais de mulheres saudáveis e diagnosticadas com infecções vaginais (CVV e VB) da cidade de Ribeirão Preto (São Paulo, Brasil), bem como avaliar a eficácia da utilização de microrganismos probióticos [*L. rhamnosus* GR-1 e *L. fermentum* RC-14 (Urex-Cap-5®)] no tratamento dessas patologias, quando co-administrados com medicamentos antimicrobianos tradicionais.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a prevalência de espécies de lactobacilos nas amostras vaginais de pacientes saudáveis e diagnosticadas com CVV e VB, coletadas por meio de zaragotas, através de método dependente e independente de cultivo (PCR-ARDRA e PCR-DGGE, respectivamente).

- Comparar a quantidade de H_2O_2 produzida pelos isolados de lactobacilos vaginais obtidos durante a primeira consulta médica, nos grupos de pacientes saudáveis e acometidas por CVV e VB.

- Isolar e caracterizar com provas bioquímicas, as espécies de leveduras presentes nas amostras vaginais coletadas.

- Avaliar se a ingestão oral diária de cápsulas contendo *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 é capaz de auxiliar no tratamento de infecções vaginais (CVV e VB), quando utilizado em associação com fluconazol (150mg) e tinidazol (2g), respectivamente.

- Avaliar o efeito *in vitro* de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 na modulação de infecção vaginal por *C. albicans*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Microrganismos probióticos

As linhagens de probióticos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 foram preparadas pela empresa Christian Hansen (Horsholm, Dinamarca) de acordo com as boas práticas de fabricação preconizadas pelo FDA. Os microrganismos foram liofilizados e colocados em cápsulas de gelatina de coloração branca (tamanho três e massa correspondente a 180mg), contendo $1x10^9$ células viáveis de cada uma das linhagens. Cápsulas de gelatina idênticas, porém contendo celulose e estearato de magnésio, foram preparadas pela mesma empresa e utilizadas como placebo. Este material foi doado à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), por meio de um "Termo de Transferência de Material" (Processo nº 05.1.1371.60.2) (Anexo 1).

4.2 Aspectos éticos, recrutamento de pacientes e equipe médica participante

O referido projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro de Saúde Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (CSE-FMRP-USP) (Protocolo nº 0146), durante a 38ª reunião extraordinária, realizada em 19 de abril de 2005 (Anexo 2).

As pacientes foram informadas sobre a pesquisa por meio do "Termo de Consentimento Livre e Esclarecido" dirigido às pacientes saudáveis (Apêndice 1) e às pacientes com infecções vaginais (Apêndice 2) e responderam a um questionário específico (Apêndice 3).

Neste trabalho foram estudadas 196 mulheres que foram alocadas em três grupos: (i) pacientes saudáveis (64 mulheres); (ii) pacientes diagnosticadas com CVV (68 mulheres) e (iii) pacientes diagnosticadas com VB (64 mulheres).

Os critérios de exclusão adotados foram: imunossupressão, desenvolvimento de processo inflamatório evidente na região genital devido a doenças sexualmente transmissíveis, gravidez, diagnóstico concomitante de tricomoníase ou infecção urinária, utilização de antimicrobianos sistêmicos ou intravaginais nos 14 dias precedentes à consulta

ginecológica, menstruação durante o período de coleta do material vaginal e histórico de resposta alérgica ao fluconazol e tinidazol.

As pacientes que integraram este estudo foram selecionadas e examinadas pela equipe de médicos ginecologistas em um de quatro centros de atendimento à saúde na cidade de Ribeirão Preto, afiliados com a USP: i) CSE-FMRP, ii) Hospital das Clínicas (HC)-FMRP, iii) Sistema Integrado de Saúde (SIS) e Centro de Saúde Vila Lobato (CSVL)-FMRP.

4.3 Procedimentos clínicos e laboratoriais adotados durante a consulta ginecológica

Durante a consulta, o médico ginecologista observou a presença e o aspecto do corrimento vaginal, determinou o pH vaginal através do contato de fita indicadora de pH na parede lateral da vagina (Acilit pH 0-6 – Merck, Darmstadt, Alemanha) e coletou três amostras vaginais, com o auxílio de duas zaragatoas e uma espátula de Ayres.

As pacientes consideradas saudáveis não apresentavam queixa de corrimento vaginal, exibiam conteúdo vaginal fisiológico e ausência de sinais e sintomas de infecção vaginal, bem como apresentaram esfregaços vaginais dominados por lactobacilos, corados pelo método de Gram modificado e observados sob microscopia óptica de imersão (KRUCZAK-FILIPOV; SHIVELY, 1992).

As pacientes foram diagnosticadas com CVV pela presença de *Candida* sp. nas amostras vaginais aliada aos sinais e sintomas da infecção. A detecção de *Candida* sp. nas amostras vaginais foi determinada por meio de um ou mais dos seguintes métodos: preparação com solução de KOH a 10% (p/v), coloração pelo método de Gram e cultura. Os sinais e sintomas considerados como típicos de CVV foram corrimento vaginal esbranquiçado, associado à queimação e prurido vaginal, dispareunia e disúria.

Por sua vez, as mulheres diagnosticadas com VB preencheram os critérios propostos por Amsel et al. (1983), segundo o qual o diagnóstico positivo da infecção é obtido pela presença de pelo menos três das seguintes determinações: i) pH vaginal superior a 4,5; ii) corrimento vaginal branco-acinzentado, aquoso e de aspecto homogêneo;

iii) desenvolvimento de odor semelhante a “peixe podre”, devido à reação entre a solução de KOH a 10% (p/v) e compostos orgânicos produzidos pelos microrganismos patogênicos (putrescina, cadaverina e trimetilamina) (PHEIFER et al., 1978) e iv) presença de “clue cells” no material vaginal observado sob microscopia com luz comum e aumento de 400X. As amostras vaginais coradas pelo método de Gram também foram visualizadas sob imersão (1000X), avaliadas de acordo com Nugent, Krohn e Hillier (1991) e classificadas como microbiota normal, intermediária ou VB, dependendo da quantidade e morfologia de bacilos Gram-positivos, bacilos Gram-negativos e cocobacilos Gram-variáveis presentes nos espécimes clínicos.

Uma das duas zaragatoas obtidas a partir da parede lateral vaginal de cada uma das pacientes foi empregada para o isolamento e avaliação de *Candida* spp. (de acordo com item 4.5.1) e *Lactobacillus* spp. (conforme itens 4.5.2 a 4.5.2.2), enquanto que a outra zaragatoa foi mantida a -20°C e empregada para a caracterização das espécies de lactobacilos através de técnica independente de cultivo (de acordo com itens 4.5.2.3 a 4.5.2.3.4).

4.4 Randomização do tratamento e consulta ginecológica para reavaliação

Da mesma forma, as pacientes diagnosticadas com CVV foram randomizadas para o tratamento com dose única de fluconazol (150mg) e suplementação com duas cápsulas contendo *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 ou duas cápsulas de placebo, para ingestão oral diária, durante 28 dias, no período da manhã, a contar do primeiro dia de uso do fluconazol.

Para a realização deste estudo prospectivo, de intervenção terapêutica, as pacientes diagnosticadas com VB foram randomizadas para o tratamento com dose única de tinidazol (2g – fracionada em quatro comprimidos de 500mg cada) e suplementação com duas cápsulas contendo *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 ou duas cápsulas de placebo, para ingestão oral no período da manhã, durante 28 dias, a contar do primeiro dia de uso do tinidazol.

Recipientes idênticos contendo cápsulas idênticas de probiótico e placebo foram recebidos do fabricante em caixas separadas, com colorações distintas e foram randomizados no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCFRP-USP por pessoas não diretamente ligadas à pesquisa. Nenhum dos investigadores obteve acesso ao código de randomização até a análise final dos dados obtidos. Número idêntico de frascos contendo cápsulas de probiótico e placebo foi acondicionado em embalagens plásticas e entregue ao investigador para que pudessem ser levadas aos centros de saúde onde foram aleatoriamente distribuídos às pacientes integrantes do estudo.

O tamanho dos grupos amostrais foi calculado em 30 sujeitos por grupo, baseando-se na premissa de obter uma diferença de aproximadamente 25% na taxa de cura entre os mesmos (poder do estudo estabelecido em 80%).

As pacientes foram devidamente instruídas para realizarem consulta ginecológica de retorno após quatro semanas de tratamento, para a colheita e avaliação de novas amostras vaginais, da mesma maneira como realizado durante a primeira consulta com a equipe clínica. Foi avaliado o relato da presença de quaisquer sintomas relacionados a infecções urogenitais (corrimento vaginal com ou sem odor vaginal fétido, sensação de queimação e/ou prurido vaginal, disúria, dispareunia) ou de possíveis efeitos colaterais relacionados ao probiótico, considerados como aqueles observados após o terceiro dia do início da terapia. Todos os voluntários declararam aderência ao protocolo de tratamento e, como medida de adesão, muitos retornaram os frascos vazios.

Uma das zaragatoas vaginais coletadas durante a segunda consulta ginecológica foi utilizada para o isolamento e caracterização de *Candida* spp. (conforme itens 4.5 a 4.5.1), enquanto que a outra zaragatoa foi mantida a -20°C e empregada para avaliação da presença de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14, através da reação de PCR utilizando-se iniciadores específicos para tais microrganismos (de acordo com item 4.5.2.4).

4.5 Caracterização de *Candida* spp. e *Lactobacillus* spp. a partir das amostras vaginais

O material obtido a partir da parede lateral vaginal de cada uma das voluntárias participantes neste trabalho, colhido com o auxílio de uma zaragatoa esterilizada, foi inserido em um tubo contendo 1,5mL de solução salina esterilizada (NaCl a 0,85%, p/v) e mantido sob refrigeração para processamento no laboratório de Microbiologia de Alimentos da FCFRP-USP. O material foi vigorosamente agitado a fim de permitir o desprendimento das células aderidas e alíquotas de 100µL foram retiradas da suspensão e empregadas para realização de diluições decimais seriadas em solução de salina esterilizada para semeadura, isolamento e identificação de *Candida* spp. e *Lactobacillus* spp., bem como enumeração das BAL.

4.5.1 *Candida* spp.

Para isolamento e identificação de leveduras do gênero *Candida*, alíquotas de 100µL provenientes de cada uma das diluições decimais obtidas no item 4.5 foram retiradas e semeadas em placas contendo o meio de cultura diferencial e seletivo Chromoagar® Candida (Probac, São Paulo) e incubadas em aerobiose a 37ºC durante 48 horas. Este meio de cultura apresenta em sua composição o antibiótico cloranfenicol (inibidor seletivo da multiplicação de bactérias) e possui uma mistura cromogênica, responsável pela identificação presuntiva de leveduras do gênero *Candida*, visto que as colônias adquirem coloração sugestiva de determinada(s) espécie(s) do microrganismo (WILLINGER; MANAFI, 1999). De acordo com o fabricante deste meio de cultivo, os isolados de *C. albicans* adquirem a coloração verde, enquanto que *C. tropicalis* e *C. krusei* apresentam pigmentação azul e rosa, respectivamente, enquanto que as demais espécies de leveduras do gênero *Candida* desenvolvem colônias de coloração branca a violeta.

A partir da amostra vaginal de cada uma das pacientes, foi escolhida uma colônia representante de cada tipo de pigmentação desenvolvida pelo microrganismo no meio cromogênico. As colônias selecionadas foram cultivadas em ASD (Ágar Sabouraud

Dextrose) (Oxoid) durante 24h a 37°C, após esse período foram mantidas à temperatura ambiente e posteriormente identificadas por provas bioquímicas (tubo germinativo e microcultivo, assimilação de fontes de carboidratos e nitrogênio, além de provas de fermentação de carboidratos), de acordo com Kurtzman e Fell (1998). O mesmo procedimento foi realizado para todos os isolados de leveduras obtidos nas amostras vaginais de pacientes saudáveis e com CVV.

4.5.2 *Lactobacillus* spp.

Para o isolamento, identificação e enumeração de BAL, alíquotas de 100µL provenientes de cada uma das diluições decimais obtidas no item 4.5 foram retiradas e semeadas em placas contendo o meio de cultura MRS (de Man, Rogosa & Sharpe) (Oxoid) e incubadas em jarras plásticas (Permution, Curitiba) com capacidade de 2,5L contendo envelopes geradores de atmosfera de anaerobiose (AnaeroGen™ – Oxoid). O meio MRS apresenta em sua composição, dentre outras substâncias, elevada concentração de glicose (20g/L), sendo seletivo para o desenvolvimento de BAL.

Para estimativa da população de lactobacilos nas amostras vaginais coletadas, foi necessário calcular a quantidade média de fluido vaginal contida nas zaragatoas obtidas, conforme método empregado por Hillier et al. (1993). Para tanto, dez zaragatoas, obtidas a partir de dez pacientes, foram pesadas antes e após a colheita do material vaginal, obtendo-se um valor médio de 0,083g (intervalo de 0,064g a 0,118g). Como as zaragotas foram introduzidas diretamente em tubos contendo 1,5mL de solução salina, constatou-se que a diluição inicial do fluido vaginal foi de aproximadamente 1:20 (p/v) (0,083g:1,5mL).

A partir de cada diluição das placas foi selecionado um exemplar de cada tipo de colônia, apresentando macro-morfologia distinta (branca ou transparente; pequena ou grande; com bordas regulares ou irregulares). As colônias selecionadas foram cultivadas em ágar MRS a 37°C durante 48h em atmosfera de anaerobiose (AnaeroGen™ – Oxoid) e avaliadas micro-morfologicamente através do emprego da coloração de Gram modificada (KRUCZAK-FILIPOV; SHIVELY, 1992). Os isolados característicos de lactobacilos

apresentaram-se na forma de bacilos ou cocobacilos Gram-positivos, não esporulados. Além disso, também foram realizadas as provas bioquímicas de catalase e oxidase (MACFADDIN, 2000), as quais são negativas para bactérias do gênero *Lactobacillus*. Os isolados presuntivamente identificados como *Lactobacillus* sp., foram identificados em espécies através da técnica de PCR-ARDRA (conforme item 4.5.2.1) e suas populações totais foram determinadas de acordo com três intervalos distintos: ≤ 10^3 UFC/mL, 10^4 a 10^6 UFC/mL e ≥10^7 UFC/mL, nos três grupos de pacientes avaliadas.

4.5.2.1 PCR-ARDRA (MOREIRA et al., 2005)

Os isolados sugestivos de lactobacilos foram acondicionados em tubos para congelamento contendo caldo MRS acrescido de 20% de glicerol e mantidos a –70ºC. Antes de serem analisadas, as culturas foram incubadas em atmosfera de anaerobiose em caldo MRS (Oxoid) e re-isoladas em ágar MRS (Oxoid).

4.5.2.1.1 Pré-tratamento das amostras e extração de DNA total

Isolados sugestivos de *Lactobacillus* sp. foram cultivados em 10mL de caldo MRS e incubados por 24 horas a 37ºC em câmara com atmosfera de anaerobiose (Forma Scientific Company, EUA). Para a obtenção de DNA cromossomal, as células foram lavadas com 10mL de água deionizada, o sedimento celular foi ressuspendido em solução de 1,0mL de cloreto de lítio (LiCl) (Sigma) 5mol/L e incubado por uma hora sob agitação constante (agitador para tubos Eppendorf, modelo Thermomixer 5436, Alemanha). As células foram lavadas novamente com 1,0mL de água deionizada e o sedimento celular foi ressuspendido em 1,0mL de tampão contendo 50mM de Tris HCl (ácido clorídrico) pH 8,0, 10mM de EDTA (Sigma), 10mg de lisozima/mL (Sigma) e 100µg de Rnase/mL (Promega). A suspensão obtida foi mantida por uma hora a 37ºC e centrifugada por dois minutos a 12.000*g* (Centrífuga Eppendorf, modelo 5417, Alemanha). O sobrenadante foi retirado e o sedimento celular obtido foi empregado para a extração de DNA, utilizando-se o *kit* Wizard® SV

Genomic DNA Purification System (Promega Corporation, EUA), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

O DNA total obtido de cada isolado bacteriano foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v), empregando-se o tampão TAE [40mM de tris-acetato (Sigma) e 1,0mM de EDTA (Sigma)], por aproximadamente uma hora a 100V. O gel obtido foi corado com brometo de etídio (BrEt) (Sigma) - concentração final de 0,5µg/mL e observado em transiluminador de luz ultravioleta (UV) (Transilluminator 4000, modelo Stratagene, EUA).

4.5.2.1.2 Amplificação por PCR da região gênica correspondente à fração 16S-23S do RNAr

A amplificação da região espaçadora intergência 16S-23S foi realizada de acordo com Tilsala-Timisjärvi e Alatossava (1997) utilizando-se os iniciadores 16-1A, 5'-GTCGGAATCGCTAGTAATCG-3' correspondente aos nucleotídeos 1361 a 1380 do gene 16S do RNAr de *Lactobacillus casei* e 23-1B, 5'-GGGTTCCCCCATTCGGA-3', correspondente aos nucleotídeos 123 a 113 do gene 16S do RNAr de *L. casei*. A mistura reacional (60µL) consistiu de 10pmol de cada iniciador (Invitrogen), 0,2mM de cada trifosfato deoxinucleotídeo (dNTPs) (Invitrogen), solução de tampão reacional com 1,5mM de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) (Invitrogen), 5,0 unidades (U) de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 6,0µL de DNA previamente extraído e 43,3µL de água Milli-Q® (Sigma) esterilizada. O programa de amplificação utilizado foi: 94ºC durante dois minutos, 35 ciclos (94ºC por 30 segundos, 55ºC por um minuto e 72ºC por um minuto) e 72ºC durante 10 minutos (Termociclador MJ Research Inc., modelo PTC-100, EUA).

Os produtos de PCR foram visualizados sob luz UV em gel de agarose a 1,5%, corado com BrEt (Sigma) (0,5µg/mL). A presença de três regiões intergênicas 16S-23S (correspondentes aos espaçadores grande, médio e pequeno) foi considerada confirmatória para a identificação de microrganismos do gênero *Lactobacillus* sp.

4.5.2.1.3 Digestões com enzimas de restrição

Os fragmentos amplificados foram submetidos à digestão por 12 enzimas de restrição, específicas para microrganismos do gênero *Lactobacillus*: *Sph*I, *Nco*I, *Nhe*I, *Ssp*I, *Sfu*I, *EcoR*V, *Dra*I, *Vsp*I, *Hinc*II, *EcoR*I, *Hind*III e *Avr*II (Promega, New England Biolabs, Roche e Invitrogen). Os produtos de PCR digeridos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% (p/v) e corado com BrEt (Sigma) (0,5µg/mL). A identificação das espécies dos isolados foi realizada por comparação entre o padrão de digestão dos espaçadores obtido e aqueles previamente caracterizados para diferentes espécies de lactobacilos, conforme perfis apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Perfis de digestão dos espaçadores amplificados por PCR da região intergênica 16S-23S de diferentes espécies de lactobacilos de origem humana, animal e alimentar

Identificação	*Sph*I	*Nco*I	*Nhe*I	*Ssp*I	*Sfu*I	*Eco*RV	*Dra*I	*Vsp*I	*Hinc*II	*Eco*RI	*Hind*III	*Avr*II
L. acidophilus	−−−	+++	−−−	−−−	+−−	−−−	−−−	−−−	−−−	+++	+++	+++
L. agilis	+++	−−−	+++	+++	−−−	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	−−−	−−−
L. alimentarius	+++	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	+++	+++	+−−	−−−	+++	−−−
L. animalis	+++	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	+++	+++	++−	−−−	+++	−−−
L. brevis	+++	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	+++	−−−
L. camelliae	+++	−−−	−−−	−−−	+−−	+++	+++	−−−	−−−	−−−	+++	−−−
L. casei	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	+++	+++	+++	−−−	−−−	+++	−−−
L. coleohominis	+++	+++	−−−	+++	−−−	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	−−−	−−−
L. crispatus	−−−	+++	−−−	−−−	+−−	+++	−−−	−−−	−−−	+++	+++	+++
L. delbrueckii	−−−	+++	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−
L. farciminis	+++	+−−	−−−	−−−	−−−	−−−	+++	+++	+−−	−−−	+++	−−−
L. ferintoshensis	+++	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	−−−	+++	+++	−−−	+++	−−−
L. fermentum	+++	−−−	+−−	−−−	−−−	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	−−−	−−−
L. fructivorans	+++	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	+++	+++	+−−	−−−	+++	−−−
L. frumenti	+++	+++	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	+++	+−−	−−−	−−−	−−−
L. gasseri	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	−−−	−−−	+−−	+++
L. hilgardii (a)	+++	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	−−−	+++	+++	−−−	+++	−−−
L. hilgardii (b)	+++	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	+++	−−−
L. jensenii	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−
L. johnsonii	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	−−−	−−−	+−−	−−−
L. mucosae	+++	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	−−−	−−−
L. murinus	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	+++	−−−	+−−	−−−	+++	−−−
L. nagelli	+++	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−
L. panis	+++	+++	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	−−−	−−−
L. pantheris	+++	+−−	+++	−−−	+++	+++	+++	−−−	−−−	+++	−−−	−−−
L. paralimentarius	+++	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	+++	+++	+−−	−−−	+++	−−−
L. paraplantarum	+++	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	−−−	+++	+++	−−−	−−−	−−−
L. pentosus	+++	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	−−−	+++	+++	−−−	−−−	−−−
L. perolens	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	+−−	−−−	+++	−−−
L. plantarum (a)	+++	−−−	−−−	+++	+−−	−−−	−−−	+++	+++	−−−	−−−	−−−
L. plantarum (b)	+++	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	−−−	+++	+++	−−−	−−−	−−−
L. pontis	+++	+++	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	−−−	−−−
L. reuteri (a)	+++	+++	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	+++	+−−	−−−	−−−	−−−
L. reuteri (b)	+++	+++	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	−−−	−−−
L. rhamnosus	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	+++	+++	−−−	+−−	−−−	+++	−−−
L. ruminis	−−−	−−−	−−−	+++	+++	−−−	+++	−−−	+−−	−−−	−−−	−−−
L. sakei	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	−−−	+++	−−−
L. salivarius	−−−	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−
L. sanfranciscencis	+++	−−−	+++	−−−	−−−	−−−	+++	+++	−−−	−−−	+++	−−−
L. vaginalis (a)	+++	+++	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	+++	−−−	−−−	−−+	−−−
L. vaginalis (b)	+++	+++	−−−	−−−	−−−	−−−	−−−	+++	+−−	−−−	−−+	−−−

Fonte: Moreira et al. (2005) com modificações

4.5.2.2 Produção de H_2O_2 pelos isolados de lactobacilos

Os isolados de lactobacilos vaginais obtidos durante a primeira consulta ginecológica de pacientes saudáveis, acometidas por CVV e VB e identificados através da técnica de PCR-ARDRA (conforme item 4.5.2.1), foram testados semi-quantitativamente para a produção de H_2O_2 (WILKS et al., 2004). Para isso, os isolados de lactobacilos (previamente conservados em caldo MRS adicionado de 20% de glicerol e mantidos a –70ºC) foram reativados em caldo MRS e incubados a 37ºC durante 24 horas. As culturas obtidas foram semeadas em placas contendo ágar MRS e incubadas sob anaerobiose a 37ºC durante 48h. As colônias obtidas foram colocadas em contato com uma tira específica impregnada com peroxidase (Merckoquant Peroxide Test; Merck, Darmstadt, Alemanha). Neste teste, a enzima transfere o peróxido de hidrogênio para um indicador redox orgânico, gerando um produto de oxidação azul, cuja intensidade, pode ser avaliada visualmente e comparada com a escala fornecida pelo fabricante. Desta maneira, a produção da substância pelos isolados testados foi expressa observando-se os seguintes intervalos: negativo (0), 1-3, 3-10, 10-30, 30-100 mg/L de H_2O_2 (Figura 9).

0 1 3 10 30 100 (mg/L de H_2O_2)

Figura 9. Escala para comparação visual, fornecida pelo *kit Merckoquant Peroxide Test* (Merck, Darmstadt, Alemanha), para a determinação da produção de H_2O_2 (expressa em mg/L) de isolados de lactobacilos vaginais provenientes de pacientes saudáveis e diagnosticadas com infecções vaginais (candidíase vulvovaginal e vaginose bacteriana).

4.5.2.3 PCR-DGGE (WALTER et al., 2000)

As populações de lactobacilos presentes nas amostras vaginais coletadas durante a primeira consulta com o médico ginecologista e armazenadas a -20°C também foram determinadas qualitativamente pela técnica independente de cultivo, PCR-DGGE (WALTER et al., 2000).

4.5.2.3.1 Extração de DNA das zaragatoas

As zaragatoas foram agitadas vigorosamente para o desprendimento das células em microtubos de polipropileno (Eppendorf) com capacidade de 1,5mL contendo 1,0mL de PBS (solução salina tamponada fosfatada), cuja composição é de 8g de NaCl (Sigma), 1,21g de $Na_2HPO_4.2H_2O$ (Sigma) e 0,34g de $NaH_2PO_4.H_2O$ (Sigma) por litro de água deionizada, pH 7,1. A suspensão obtida foi centrifugada a 10.000*g* durante cinco minutos (Centrífuga Eppendorf, modelo 5410, Alemanha) e lavada com 1,0mL de PBS. Este procedimento foi repetido e o DNA foi extraído com o *kit* Instagene® Matrix (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Canadá), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

4.5.2.3.2 Amplificação do DNA por PCR

A amplificação do DNA das amostras foi realizada segundo Walter et al. (2000), utilizando-se os iniciadores: LCG-1, 5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3' e LCG-2-GC, 5'-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGCCCGGGGGCACCGGGGGCATTYCACCGCTCACA TG-3'. Cada reação de PCR consistiu de 5,0µL de tampão para PCR 10X (Invitrogen), 1,25mM de $MgCl_2$ (Invitrogen), 40µg de albumina sérica bovina (New England Biolabs), 1,25µL de glicerol (Sigma), 5,0mM de dNTPs (Invitrogen), 50pmoL de cada iniciador (Invitrogen), 1,0U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 2,0µL de preparação de DNA e 33,05µL de água Milli-Q® (Millipore) esterilizada. O programa de amplificação utilizado foi: 94ºC durante dois minutos, 30 ciclos (94ºC por 30 segundos, 60ºC por um minuto e 72ºC por um minuto) e 72ºC durante 10 minutos (Termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf, Hamburg, Alemanha).

4.5.2.3.3 Preparação dos géis para DGGE

A preparação dos géis de gradientes desnaturantes e a separação eletroforética foram realizadas de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante do Sistema de Detecção Universal D-Code (Bio-Rad). Para obtenção do gradiente de concentração, as soluções desnaturantes empregadas na confecção dos géis de DGGE apresentaram concentrações de 30% [composta de 20mL de solução de acrilamida/bisacrilamida a 40% (BioRad), 2,0mL de TAE 50X, 2,0mL de solução de formamida (Fisher Scientific, EUA), 12,6g de uréia (EMD OmniPur, EUA) e água Milli-Q® (Millipore) (volume final: 100,0mL)] e 50% [composta de 20mL solução de acrilamida/bisacrilamida (BioRad) a 40%, 2,0mL de TAE 50X, 20mL de solução de formamida (Fisher Scientific), 21,0g de uréia (EMD OmniPur) e água Milli-Q® (Millipore) (volume final: 100,0mL)]. As soluções foram filtradas (filtros Millipore® com poros de 0,45µm) e armazenadas individualmente em frascos âmbar a 4ºC. A solução de TAE 50X era composta de 242g de tris-base (Sigma), 17,1mL de solução de ácido acético (Sigma), 0,5mol/L de solução de EDTA (Sigma) pH 8,0 e água Milli-Q® (Millipore), volume final de 100mL.

Para a montagem de cada um dos géis de DGGE, foram utilizadas duas seringas plásticas descartáveis com capacidade para 50mL, às quais foram adicionados individualmente 25mL de uma das soluções desnaturantes (30% ou 50%), 500µL do corante Dcode (constituído de 0,5% de azul de bromofenol (Sigma), 0,5% de xileno cianol (Sigma), ambos diluídos em TAE 1X) e agentes polimerizadores incluindo 95µL de solução de persulfato de amônio (Bio-Rad) a 10% (p/v) e 55µL da solução de Temed (N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamino) (Sigma), a qual foi adicionada por último. A seguir, as seringas foram encaixadas em um suporte específico (BioRad) e suas saídas foram conectadas a um manguito plástico com formato em Y. Na extremidade livre do manguito foi introduzida uma agulha e esta inserida a seguir na posição superior do "sanduíche" (formado pelas placas de vidro e seus respectivos espaçadores) e fixada com o auxílio de uma fita adesiva. O dispositivo presente no suporte para as seringas foi ativado para permitir o bombeamento das duas soluções em velocidades distintas e, por conseguinte, propiciou a formação do

gradiente de concentração desejado. A seguir foi então inserido um “pente” plástico apropriado na porção superior do “sanduíche” para formação dos poços. Os géis foram então deixados em repouso para polimerização durante um período entre 12 e 18 horas. Depois deste intervalo, 20µL de cada uma das amostras foram adicionados a 20µl de uma solução tampão para carregamento de concentração dupla [0,25mL de azul de bromofenol (2%, Sigma), 0,25mL de xileno cianol (2%, Sigma), 7,0mL de glicerol (Sigma) e 2,5mL de água destilada] e transferidos para os poços. O desenvolvimento eletroforético dos géis foi realizado a 130V em TAE 1X durante aproximadamente quatro horas. Após este intervalo, os suportes contendo os géis foram removidos e resfriados à temperatura ambiente. Os géis foram cuidadosamente removidos dos “sanduíches” e corados com BrEt (Sigma) (concentração final de 0,5µg/mL) por 15 minutos e visualizados em transiluminador de UV (Alpha Innotech Corporation, Alpha Imager™ 2000, San Leandro, Califórnia, EUA).

4.5.2.3.4 Excisão das bandas dos géis de DGGE, reamplificação e seqüenciamento

Os fragmentos de interesse foram excisados dos géis de DGGE com o auxilio de um bisturi esterilizado e transferidos individualmente para microtubos de polipropileno (Eppendorf) com capacidade para 1,5mL. Os fragmentos de gel foram então lavados em tampão para PCR 1X (Invitrogen) e incubados a 4ºC durante uma noite com 35µL do mesmo tampão. Cinco microlitros da suspensão obtida foram utilizados como molde para a amplificação em reação de PCR, com os iniciadores idênticos aos descritos no item 4.5.2.3.2, mas sem a terminação GC (WALTER et al., 2000). Os produtos de PCR obtidos foram purificados com o *kit* Qiagen (Germantown, Ohio, EUA), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. As seqüências dos fragmentos amplificados foram determinadas através do método da terminação da cadeia dideoxi (SLATKO et al., 2001). A avaliação das seqüências correspondentes à fração 16S do RNAr foi realizada com auxílio do banco de dados *GenBank* e algoritmo *BLAST*. A identificação das amostras foi determinada com base nos maiores escores obtidos.

4.5.2.4 Pesquisa de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 em amostras vaginais

Para determinar a presença ou ausência de *L. rhamnosus* GR-1 e/ou *L. reuteri* RC-14 nas zaragatoas congeladas contendo amostras de fluido vaginal das pacientes diagnosticadas com CVV e VB, após tratamento com o probiótico Urex-Cap-5®, foi utilizado um par de iniciadores específicos para amplificação das regiões gênicas correspondentes à fração 16S do RNAr de ambos os microrganismos: i) 5'-GAGAAGAACGTGCGTGAGAC-3' e ii) 5'-TAAGCCGAAGGCTTTCACAT-3'. O DNA presente nas zaragatoas vaginais obtidas durante a segunda consulta com o médico ginecologista e mantidas a -20ºC foi previamente extraído (de acordo com o item 4.5.2.3.1). Cada reação de PCR consistiu de 5,0µL de tampão para PCR 10X (Invitrogen), 1,25mM de $MgCl_2$ (Invitrogen), 40µg de albumina sérica bovina (New England Biolabs), 1,25µL de glicerol (Sigma), 5,0mM de dNTPs (Invitrogen), 50pmoL de cada iniciador (Invitrogen), 1,0U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 2,0µL de preparação de DNA e 33,05µL de água Milli-Q® (Millipore) esterilizada. O programa de amplificação empregado foi: 94ºC durante dois minutos, 30 ciclos (94ºC por 30 segundos, 60ºC por um minuto e 72ºC por um minuto) e 72ºC durante 10 minutos (Termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf, Hamburg, Alemanha).

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,0% (p/v), empregando-se o tampão TAE 1X por aproximadamente uma hora a 100V. O gel obtido foi corado com BrEt (Sigma) - concentração final de 0,5µg/mL e observado em transiluminador de luz UV (Alpha Innotech Corporation, Alpha ImagerTM 2000, San Leandro, Califórnia, EUA).

A determinação da presença ou ausência de *L. rhamnsous* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 nas amostras avaliadas foi realizada pela observação dos produtos de reação de PCR no gel de agarose 1,0% (p/v) que apresentavam o mesmo padrão de migração eletroforética dos controles positivos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14.

4.6 Avaliação do efeito *in vitro* de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 na modulação de infecção vaginal por *C. albicans*

Foi utilizado um modelo *in vitro* de candidíase vaginal (CV) para avaliar o possível efeito de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 na modulação de infecção de células epiteliais vaginais e indução da resposta inflamatória local por *C. albicans*. Foram estudados os efeitos anti-*Candida* de ambas as culturas dos microrganismos probióticos e/ou seus sobrenadantes livres de célula (SLC) e foram quantificadas as citocinas secretadas por uma linhagem celular vaginal humana, sob diferentes condições.

4.6.1 Linhagem celular epitelial humana

A linhagem celular epitelial VK2/E6E7 é originária da mucosa vaginal de uma mulher saudável, em idade fértil e foi imortalizada com papilomavírus humano 16/E6E7 (FICHOROVA; RHEINWALD; ANDERSON, 1997). As células VK2/E6E7 foram mantidas em meio de queratinócito sem soro (QSS) suplementado com 50µg de extrato pituitário bovino, 0,1ηg de fator de crescimento epidermal e 100U/mL de penicilina e estreptomicina (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA) a 37°C e 5,0% de dióxido de carbono (CO_2).

4.6.2 Linhagens de lactobacilos

Culturas de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 mantidas em freezer a -80°C em caldo MRS adicionado de 20% de glicerol, foram reativadas em caldo MRS (Becton Dickinson) a 37°C sob anaerobiose até atingirem aproximadamente 10^8 UFC/mL. SLC foram obtidos por centrifugação dos caldos das culturas a 3.000*g* durante 15 minutos a 4°C. A seguir, as preparações foram filtradas em filtros com poros de 0,20µm de diâmetro (Corning, EUA) e neutralizadas (pH 7,0) com solução esterilizada de hidróxido de sódio (NaOH) a 1N. Os sedimentos celulares foram ressuspendidos em PBS, centrifugados a 3.000*g* durante 15 minutos a 4°C (Centrífuga Beckman, modelo GS-6, EUA) e ressuspendidos no meio QSS sem a adição de antibióticos (concentração final de 10^7 UFC/mL).

4.6.3 Linhagem de *C. albicans*

C. albicans 3153a (ATCC 28367) foi cultivada em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) (Becton Dickinson, EUA) a 25°C durante 24h, atingindo a fase estacionária de crescimento. Os blastoconídeos foram coletados, lavados com PBS e enumerados com o auxílio de um hematocitômetro (Hausser Scientific, Horsham, Pensilvânia, EUA), pelo método de exclusão pelo azul de tripan (Sigma) (TOLNAI, 1975).

4.6.4 Modelo *in vitro* para candidíase vaginal e desenho do estudo de desafio

Para a realização dos ensaios *in vitro*, dois dias antes da infecção das células VK2/E6E7 por *C. albicans* 3153a, aproximadamente $8{,}0 \times 10^4$ células de VK2/E6E7 por poço foram transferidas para placas de 24 poços (Becton Dickinson, Sparks, Maryland, EUA) e cultivadas no meio QSS completo até obtenção de 90% de confluência, verificado através do microscópio invertido (Zeiss Axioskop, Alemanha).

No dia da infecção (T=0), em um dos poços, o sobrenadante foi coletado e as células VK2/E6E7 foram enumeradas. Dos demais poços, foi retirado o meio de cultura e as células foram lavadas com PBS e o meio QSS sem a adição de antibióticos foi adicionado. Foram colocados 10ng/mL de TNF-α nos poços utilizados como controles positivos para a produção de citocinas. Para o modelo de infecção, $2{,}0 \times 10^4$ UFC/mL de *C. albicans* foram adicionados em cada poço e incubados durante 6 horas a 37°C (T=6h). Após este intervalo, o sistema foi desafiado com: i) *L. rhamnosus* GR-1 (10^7 UFC/mL); ii) SLC obtido a partir de *L. rhamnosus* GR-1 [1:10 (v/v)]; iii) *L. reuteri* RC-14 (10^7 UFC/mL); iv) SLC obtido a partir de *L. reuteri* RC-14 [1:10 (v/v)]; v) *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 (10^7 UFC/mL cada); e vi) SLC obtido a partir de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 [1:10 (v/v)]. Após o desafio, o sistema foi incubado por um intervalo adicional de 6 horas (T=12h) e os sobrenadantes foram coletados empregados para determinação das populações de células VK2/E6E7, lactobacilos e *C. albicans* e posterior quantificação de citocinas. As placas foram incubadas por mais 12h (T=24h) e os sobrenadantes foram utilizados para quantificação de células VK2/E6E7, lactobacilos e *C. albicans*. Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.6.5 Quantificação das populações de células VK2/E6E7, *C. albicans* e lactobacilos

As populações de células VK2/E6E7 foram determinadas nos intervalos de tempo T=0, 6h, 12h e 24h com o auxílio de um hematocitômetro (Hausser Scientific, Horsham, Pensilvânia, EUA), utilizando-se o método de exclusão pelo azul de tripan (Sigma) (TOLNAI, 1975). As populações de *C. albicans* 3153a foram obtidas nos tempos T= 6h, 12h e 24h, por meio da realização de diluições seriadas das amostras em PBS esterilizado e semeadura de 100µL na superfície de placas contendo o meio Chromagar® Candida (Oxoid) e incubação por 48h a 37ºC em aerobiose. As populações de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 foram determinadas nos tempos T= 6h, 12h e 24h pela realização de diluições seriadas das amostras em PBS esterilizado e semeadura de 100µL na superfície de placas contendo o ágar MRS adicionado de 200µg/mL de miconazol, seguido da incubação durante 48h a 37ºC em atmosfera de anaerobiose.

4.6.6 Coleta do sobrenadante para quantificação de citocinas e quimiocinas

Nos intervalos de tempo correspondentes a T=0, 6h e 12h os sobrenadantes foram aspirados, centrifugados a 12.000*g* durante cinco minutos e armazenados a -80°C. Foram posteriormente avaliadas as concentrações das citocinas IL-6, IL-8, IL-1α, IP-10, VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) e RANTES (célula T normal, expressa e secretada, regulada sob ativação) através de testes comerciais de imunoensaios com múltiplos biomarcadores, de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante (Linco*plex*, Millipore Corp., EUA). Para a leitura foi empregado um sistema de leitura automática (Bio-Plex™ 200, Bio-Rad, Hercules, Canadá), baseado na técnica de fluorescência Luminex® xMAP™ (Luminex Corp., Austin, Texas, EUA). Os níveis das citocinas (determinados em pg/mL) foram automaticamente calculados pela comparação com curvas analíticas e com o auxílio do programa *Bio-Plex Manager* (versão 4.1.1, Bio-Rad, EUA).

4.7 Análise estatística

O teste de variância ANOVA de uma via (nível de significância estabelecido em $p<0,05$) foi utilizado para comparações entre diferentes grupos de pacientes incluídas neste trabalho, com relação a características comportamentais e demográficas, bem como para as taxas de prevalência de colonização vaginal pelas espécies de lactobacilos. O mesmo teste estatístico foi utilizado para a comparação entre o número de isolados de lactobacilos vaginais produtores e não produtores de H_2O_2 nos três grupos de pacientes avaliados. Sempre que foram detectadas diferenças estatísticas, o teste Qui-quadrado foi utilizado e o nível de significância foi estabelecido em $p<0,25$. Os três grupos de pacientes foram comparados entre si para populações de lactobacilos vaginais em três intervalos distintos com $p<0,05$ sendo considerado estatisticamente significante. As comparações aos pares entre os grupos foram realizadas com diferenças consideradas estatisticamente significantes ao nível de 0,017 para permitir a utilização do teste de Bonferroni no ajuste de comparações múltiplas.

As comparações entre a distribuição no número de diferentes espécies de lactobacilos vaginais encontradas por paciente, bem como a taxa de produção de H_2O_2 pelos isolados foram avaliadas pelo uso do teste de Kruskal-Wallis (nível de significância estabelecido em $p<0,05$). Sempre que foram observadas diferenças significativas, o teste de Wilcoxon para duas amostras foi empregado e o nível de significância estabelecido em $p<0,25$.

A comparação entre os resultados obtidos pela utilização das técnicas de PCR-ARDRA e PCR-DGGE na identificação das espécies de *Lactobacillus* sp., foi realizada com a utilização do coeficiente de concordância Kappa.

Para a comparação dos resultados clínico-laboratoriais obtidos entre os grupos de pacientes com infecções vaginais tratados com medicamento tradicional e suplementados com as culturas probióticas ou placebo, foram utilizados os testes de Qui-quadrado e o teste exato de Fisher bi-caudal. Em todos os casos, o nível de significância adotado foi estabelecido em $p<0,05$.

As análises estatísticas acima citadas e a determinação do tamanho dos grupos amostrais foram realizadas com o auxílio do programa SAS, versão 9.1 (SAS Institute Inc., EUA).

Os dados referentes às concentrações de citocinas produzidas constitutivamente pelas células VK2/E6E7 e aquelas induzidas pela infecção com *C. albicans* 3153a, foram avaliados descritivamente e pela comparação dos valores médios por meio de testes estatísticos. Para confirmação das tendências observadas, foi utilizado o teste T de *Student* não pareado, com nível de significância estabelecido em $p<0,05$. Para avaliar o efeito de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 e seus respectivos SLC (sozinhos ou combinados) sobre as populações de *C. albicans*, bem como comparar os níveis de citocinas produzidos pelas células VK2/E6E7 (ou VK2/E6E7 infectadas com a levedura), o teste ANOVA de uma via com nível de significância estabelecido em $p<0,05$ foi utilizado. Sempre que diferenças significativas foram obtidas, o teste de Bonferroni foi utilizado e o nível de significância foi estabelecido em $p<0,05$. Para estas análises, foi utilizado o programa Sigma Stat, versão 2.03 (Systat Software Inc., EUA).

5. RESULTADOS

5.1 Características demográficas e comportamentais dos três grupos de pacientes integrantes deste estudo

Durante o período de maio de 2005 a maio de 2007, 196 pacientes foram triadas em quatro centros de saúde da cidade de Ribeirão Preto afiliados com a USP e integraram o presente estudo. As principais características demográficas e comportamentais dos três grupos de pacientes avaliadas, compreendendo 64 mulheres saudáveis, 68 mulheres diagnosticadas com CVV e 64 mulheres diagnosticadas com VB, estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8 – Características demográficas e comportamentais das pacientes que integraram o presente estudo. Os resultados estão expressos como números absolutos e porcentagens, respectivamente

	Saudáveis[1]	CVV[2]	VB[3]	*p*
Idade média (intervalo)	31,2±8,4 (18 a 47)	28,9±8,7 (16 a 51)	30,2±10,8 (16 a 50)	0,367
Banho de assento com produtos químicos	16 (25,0)	19 (27,9)	12 (18,8)	0,453
Menstruação regular	48 (75,0)	47 (69,1)	39 (60,9)	0,228
Uso de qualquer método contraceptivo	40 (62,5)	46 (67,6)	40 (62,5)	0,774
Uso de método contraceptivo hormonal	28 (43,8)	32 (47,1)	32 (50,0)	0,778

[1] grupo com 64 pacientes saudáveis; [2] grupo com 68 pacientes diagnosticadas com candidíase vulvovaginal (CVV) e [3] grupo com 64 pacientes diagnosticadas com vaginose bacteriana (VB).

Os resultados revelaram similaridades entre os cinco parâmetros avaliados nos três grupos de pacientes integrantes do presente estudo (p >0,05).

5.2 Isolamento, enumeração e identificação de *Lactobacillus* spp. através da técnica de PCR-ARDRA e comparação com os resultados obtidos com a técnica independente de cultivo, PCR-DGGE

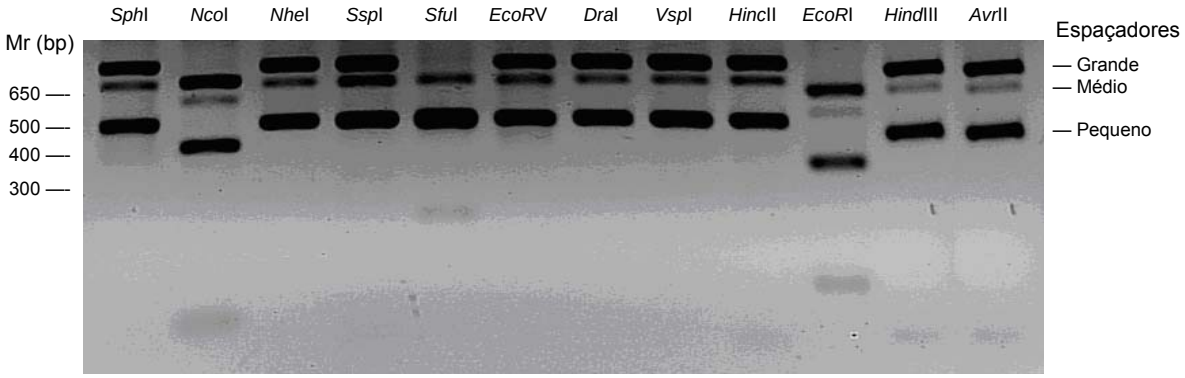
A partir dos três grupos de pacientes avaliados, foram selecionados 426 isolados em ágar MRS (150, 157 e 119 correspondendo àqueles provenientes das pacientes saudáveis, diagnosticadas com CVV e VB, respectivamente). A coloração pelo método de Gram e a avaliação por testes bioquímicos, permitiu caracterizar 262 isolados como bacilos Gram-positivos, catalase e oxidase negativos. O número total de isolados identificados como *Lactobacillus* spp. pela técnica de PCR-ARDRA (MOREIRA et al., 2005) foi de 173, sendo 73 isolados obtidos a partir do grupo de mulheres saudáveis, 78 isolados do grupo de pacientes com CVV e 22 isolados do grupo de pacientes com VB. Os resultados referentes à enumeração das populações de lactobacilos vaginais obtidos nos três grupos de pacientes integrantes deste estudo estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9 – Populações de lactobacilos nas amostras vaginais colhidas de pacientes saudáveis e diagnosticadas com infecções vaginais

Grupos de mulheres	$\leq 10^3$ (UFC/mL)		10^4 a 10^6 (UFC/mL)		$\geq 10^7$ (UFC/mL)		Total	
	No. pacientes	%	No. pacientes	%	No. pacientes	%	No. pacientes	%
Saudáveis	13	20,3	8	12,5	43	67,2	64	100,0
Candidíase vulvovaginal	9	13,2	10	14,7	49	72,1	68	100,0
Vaginose bacteriana	27	42,2	19	29,7	18	28,1	64	100,0

De acordo com a análise estatística, pelo método dependente de cultivo (PCR-ARDRA), nos grupos de mulheres saudáveis e diagnosticadas com CVV as populações de lactobacilos vaginais não diferiram entre si (p=0,543), mas ambos os grupos apresentaram populações mais elevadas do microrganismo quando comparados ao grupo de mulheres diagnosticadas com VB ($p < 0,001$).

De acordo com a técnica de PCR-ARDRA foram identificadas 13 espécies de lactobacilos vaginais. As figuras 10 a 24 ilustram os diferentes perfis de restrição referentes à digestão dos três espaçadores intergênicos [grande (G), médio (M) e pequeno (P)] da região 16S-23S obtidos pela técnica de PCR-ARDRA. *L. reuteri* e *L. vaginalis* apresentaram dois perfis distintos de digestão com o conjunto de enzimas de restrição utilizado, que foram designadas com as letras A e B (Figuras 18 e 19; 23 e 24, respectivamente).



G	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
M	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
P	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

Figura 10. Perfil de restrição da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus acidophilus***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb).

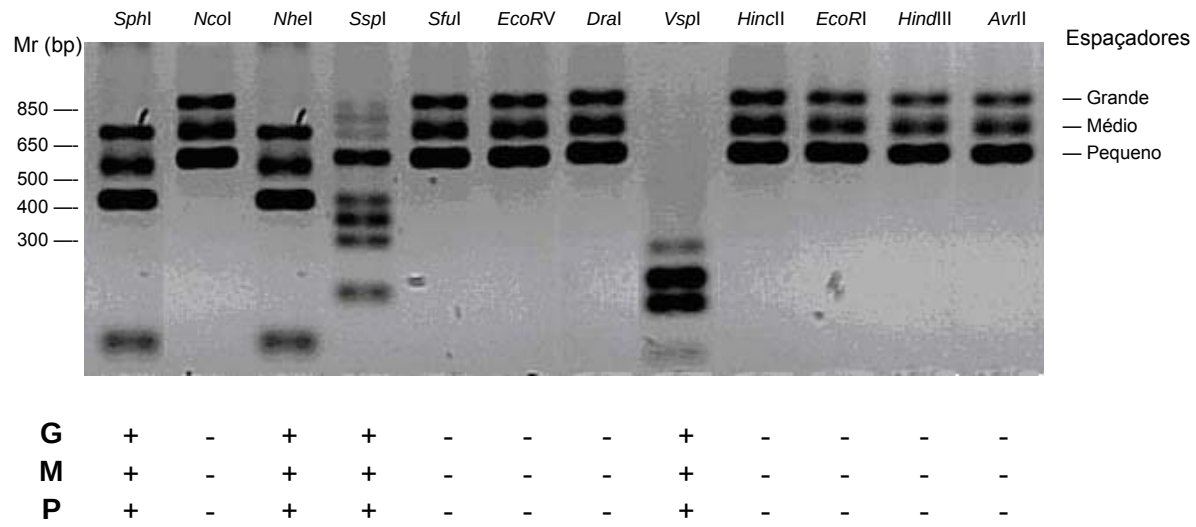


Figura 11. Perfil de restrição da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus agilis***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb).

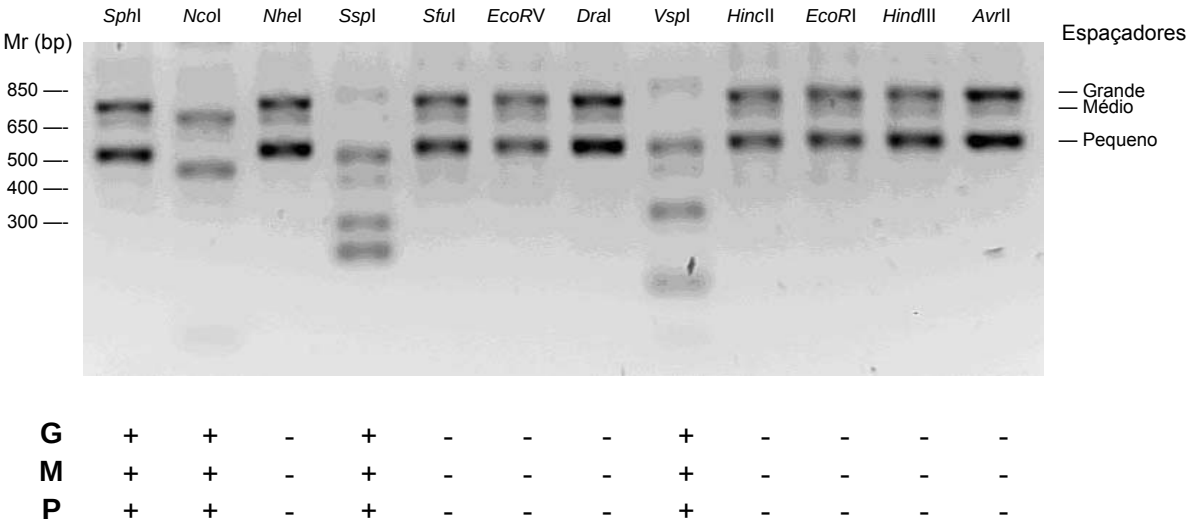
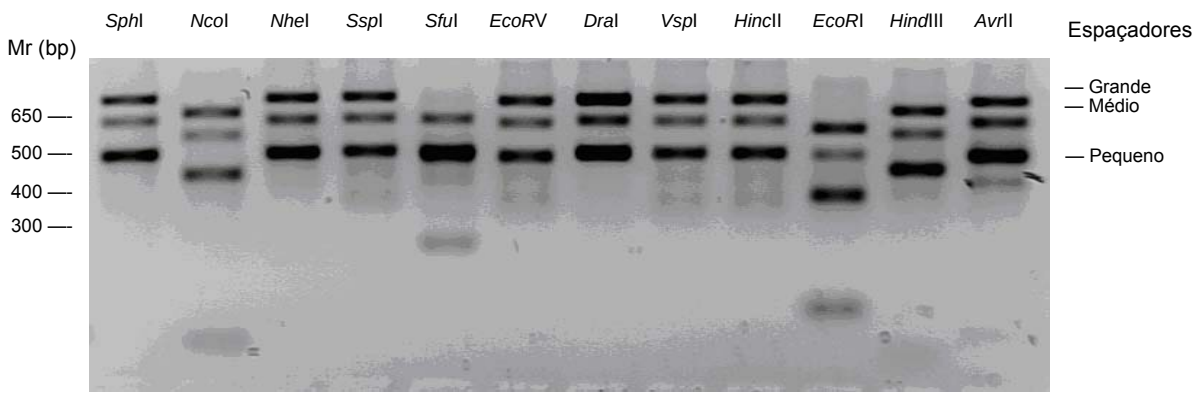
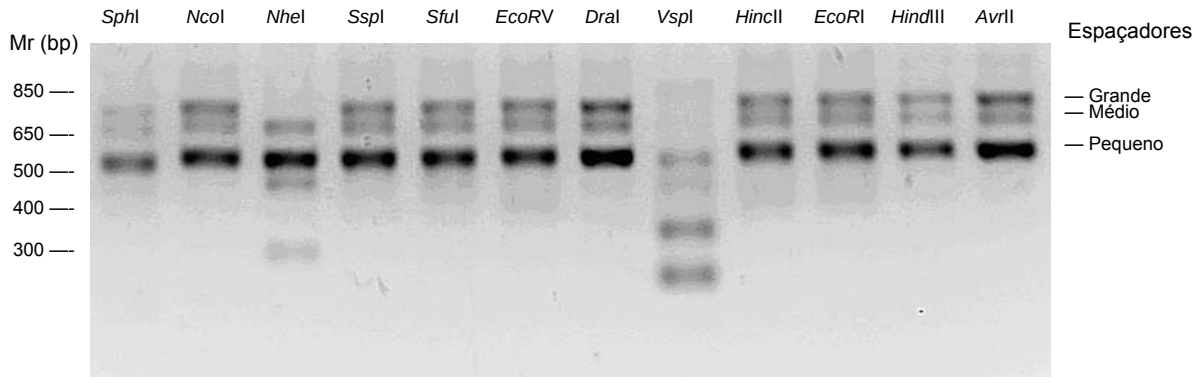


Figura 12. Perfil de restrição da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus coleohominis***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb).



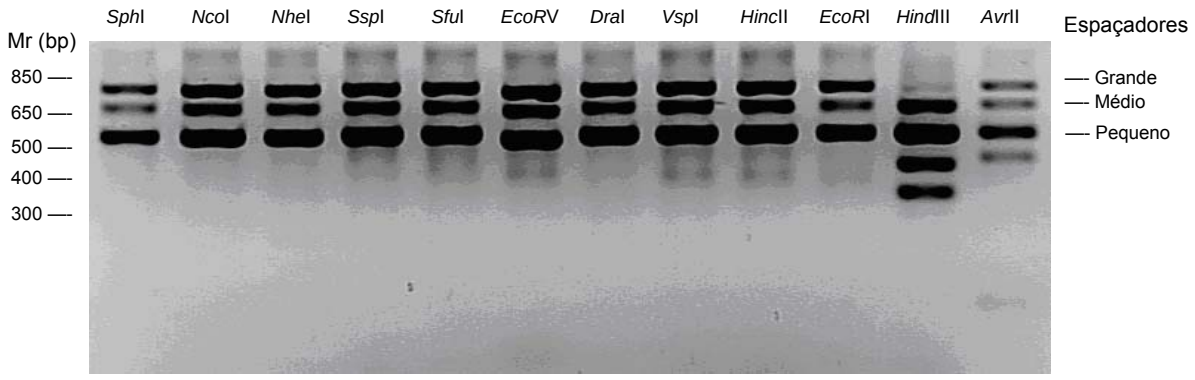
G	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+
M	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+
P	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+

Figura 13. Perfil de restrição da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus crispatus***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb).



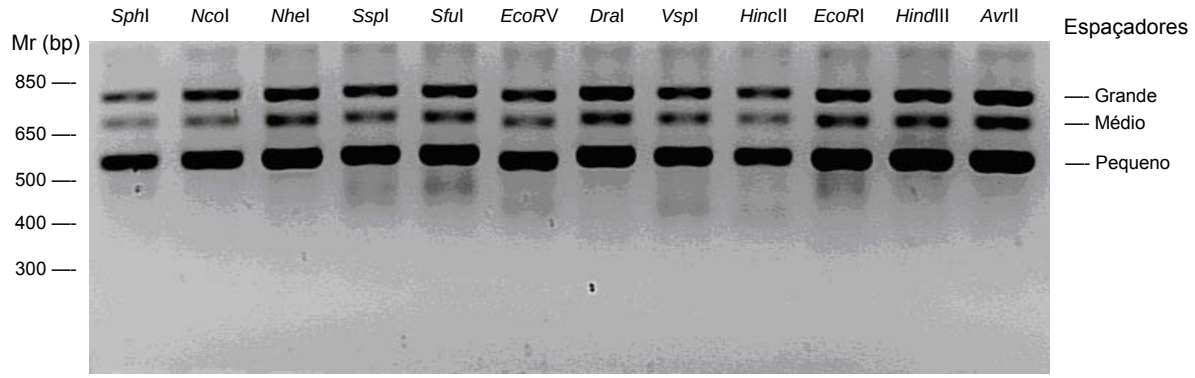
G	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
P	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Figura 14. Perfil de restrição da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus fermentum***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb).



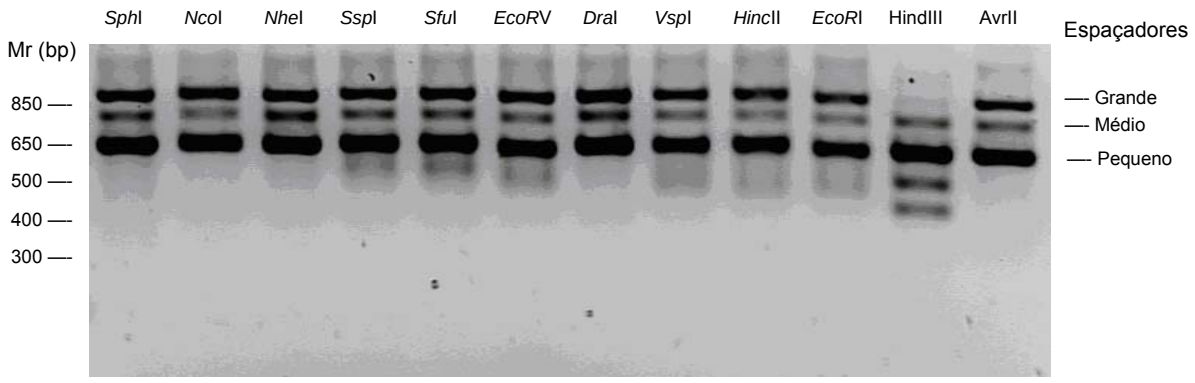
G	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
M	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
P	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+

Figura 15. Perfil de restrição da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus gasseri***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb).



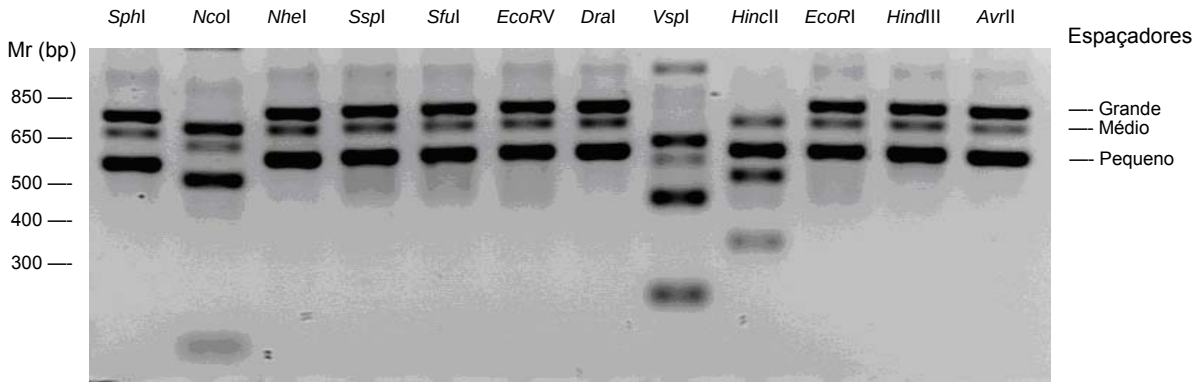
G	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
M	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
P	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Figura 16. Perfil de restrição da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus jensenii***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb).



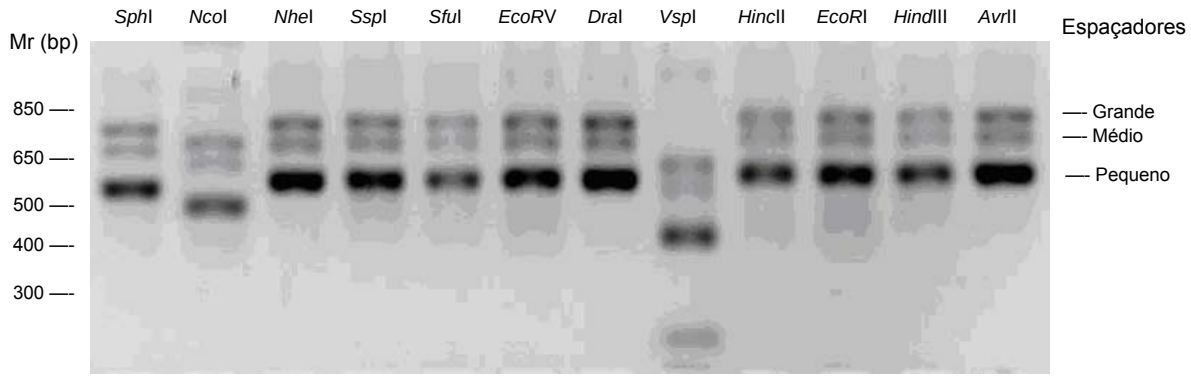
G	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
M	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
P	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Figura 17. Perfil de restrição da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus johnsonii***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb).



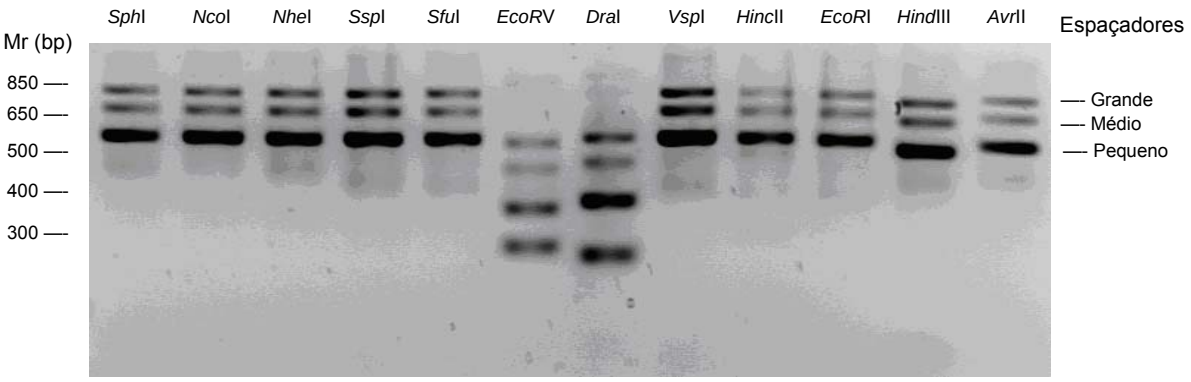
G	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
M	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
P	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Figura 18. Perfil de restrição A da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus reuteri***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb).



G	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
P	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Figura 19. Perfil de restrição B da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus reuteri***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb).



G	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-
M	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
P	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-

Figura 20. Perfil de restrição da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus rhamnosus***, obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb).

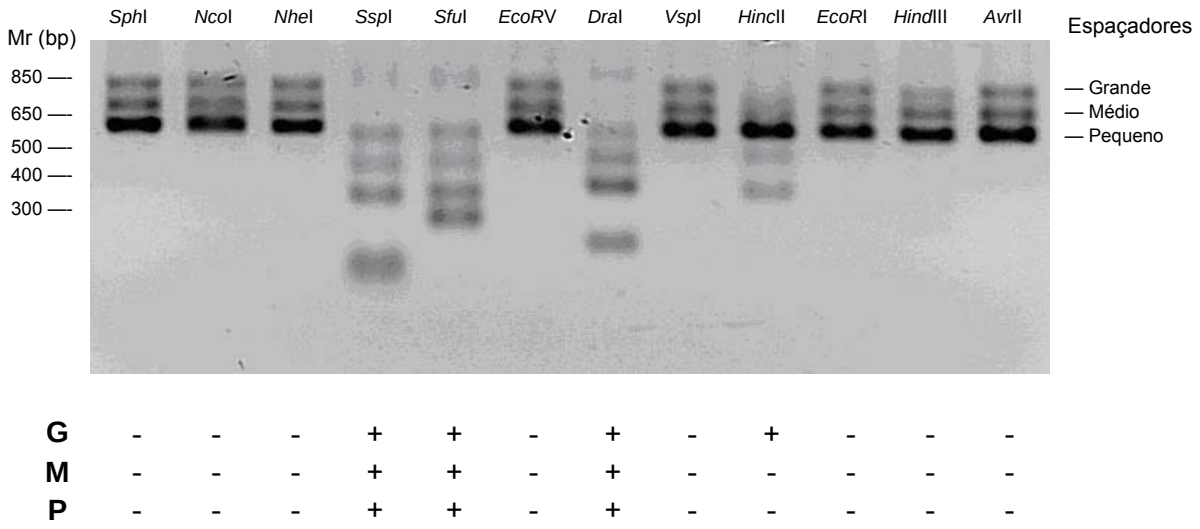


Figura 21. Perfil de restrição da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus ruminus*, **obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb).

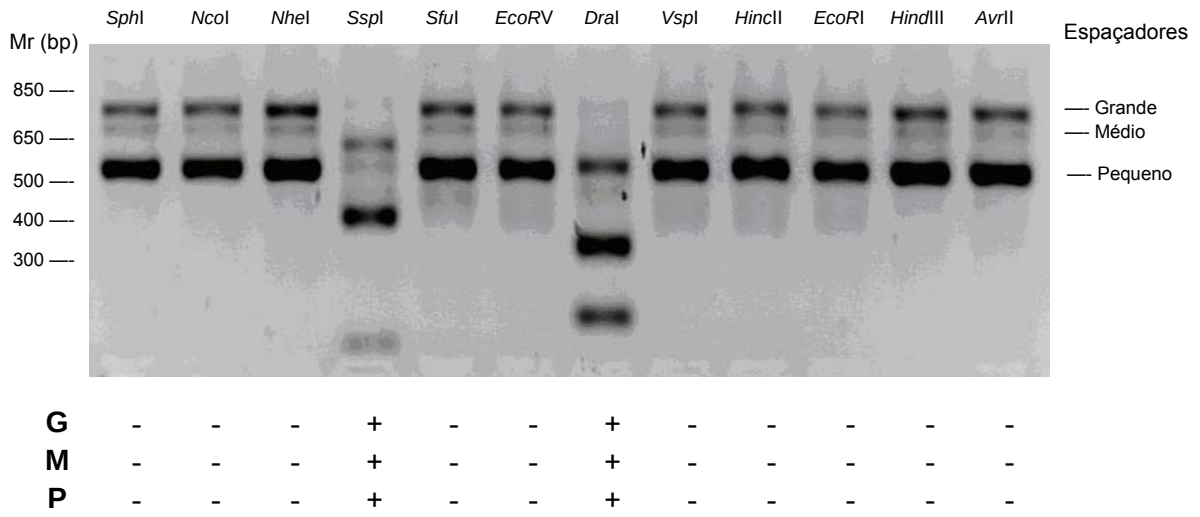
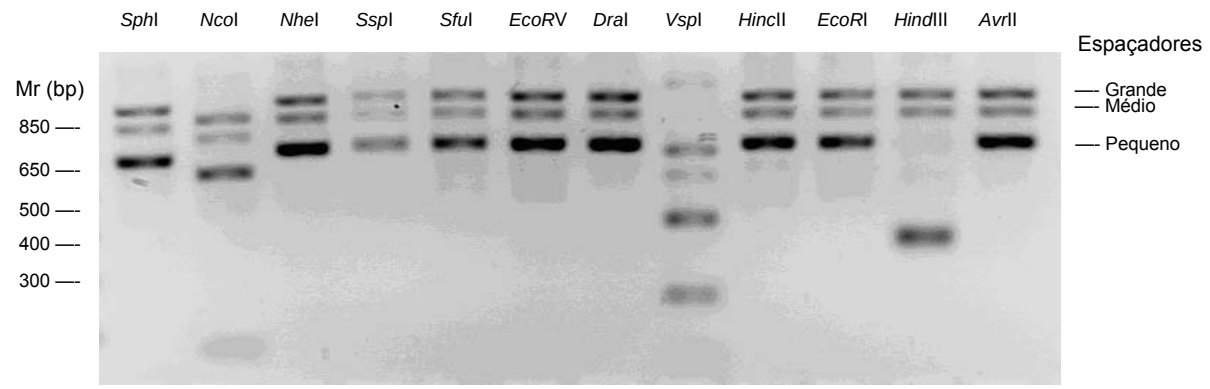
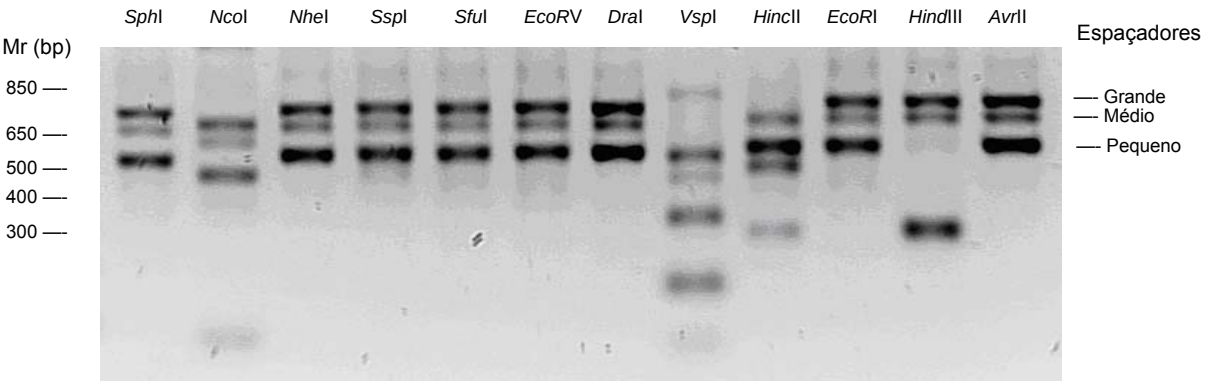


Figura 22. Perfil de restrição da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus salivarius*, **obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb).



G	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
P	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-

Figura 23. Perfil de restrição A da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus vaginalis*, **obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb).



G	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
M	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
P	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-

Figura 24. Perfil de restrição B da digestão de três espaçadores intergênicos 16S-23S de *Lactobacillus vaginalis*, **obtido de amostra vaginal de paciente integrante do presente estudo, identificado através da técnica de PCR-ARDRA.** A amplificação por PCR das regiões espaçadoras de RNAr foi realizada, os amplicons foram clivados com 12 enzimas de restrição e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 100V durante 50 minutos. Os sinais positivos e negativos significam, respectivamente, clivagem positiva ou negativa para os amplicons de PCR grande (G), médio (M) e pequeno (P). O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à esquerda e expresso em pares de base (pb).

De acordo com os resultados obtidos com a técnica de PCR-ARDRA, 87,5%, 88,2% e 32,8% das mulheres saudáveis, diagnosticadas com CVV e VB (respectivamente) mostraram-se colonizadas por pelo menos uma espécie de *Lactobacillus* vaginal (máximo de três espécies de lactobacilo por mulher) (Figura 25).

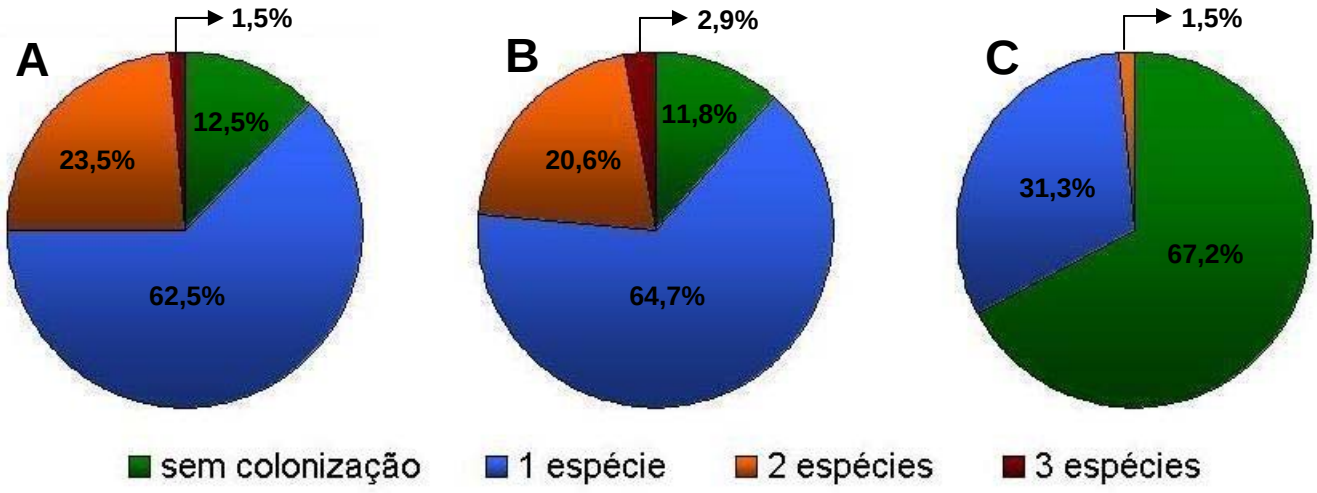


Figura 25. Prevalência de pacientes saudáveis (A), diagnosticadas com candidíase vulvovaginal (B) e vaginose bacteriana (C), não colonizadas, colonizadas por uma, duas ou três espécies de lactobacilos vaginais, determinada através da técnica de PCR-ARDRA.

Com os resultados da técnica independente de cultivo (PCR-DGGE), foi possível dectectar amostras positivas para *Lactobacillus* em 98,4%, 94,1% e 57,8% das amostras de exsudatos vaginais de mulheres saudáveis, diagnosticadas com CVV e VB, respectivamente, com o máximo de duas espécies por paciente (Figura 26).

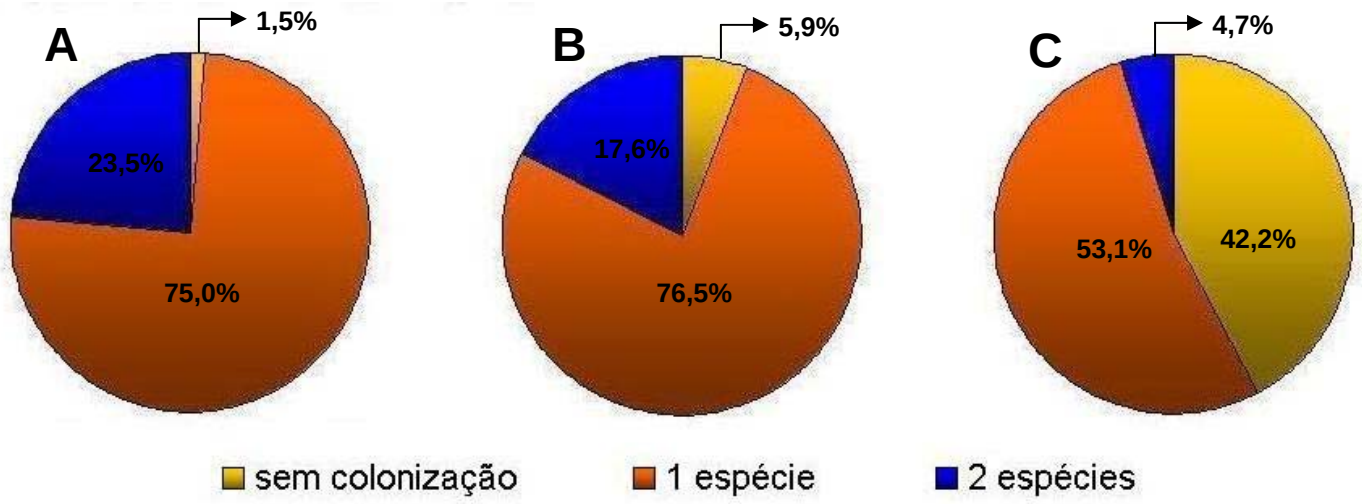


Figura 26. Prevalência de pacientes saudáveis (A), diagnosticadas com candidíase vulvovaginal (B) e vaginose bacteriana (C), não colonizadas, colonizadas por uma ou duas espécies de lactobacilos vaginais, determinada através da técnica de PCR-DGGE.

Não foram observadas diferenças estatísticas na taxa de colonização por lactobacilos vaginais entre os grupos de mulheres saudáveis e diagnosticadas com CVV (p>0,05) por nenhum dos métodos (PCR-ARDRA e PCR-DGGE), enquanto que ambas foram estatisticamente diferentes quando comparadas àquela obtida para o grupo de pacientes com VB (p<0,001).

De acordo com a técnica de PCR-ARDRA, 62,5% das mulheres saudáveis apresentaram amostras vaginais com uma única espécie de *Lactobacillus* (Figura 25), semelhante (64,7%) àquela determinada pelo método de PCR-DGGE (Figura 26). No grupo de mulheres diagnosticadas com CVV, 64,7% estavam colonizadas por apenas uma espécie de *Lactobacillus* de acordo com a técnica de PCR-ARDRA (Figura 25), comparado a 76,5% obtido através da metodologia de PCR-DGGE (Figura 26). No entanto, no grupo de pacientes com VB, apenas 31,3% das amostras foram positivas para uma espécie de *Lactobacillus* de acordo com o método de PCR-ARDRA (Figura 25), comparado a 53,1% obtido através da técnica independente de cultivo - PCR-DGGE (Figura 26).

A prevalência global (expressa em porcentagem) dos isolados de lactobacilos vaginais identificados pela técnica de PCR-ARDRA, obtidos nos grupos de pacientes saudáveis e diagnosticadas com CVV e VB está mostrada na Figura 27. O isolado mais prevalente no grupo de mulheres saudáveis foi *L. crispatus* (37,0%), seguido por *L. johnsonii* (16,4%) e *L. jensenii* (11,0%). No grupo de pacientes diagnosticadas com CVV, *L. crispatus* foi o microrganismo mais freqüentemente isolado (35,9%), seguido por *L. jensenii* (21,8%) e *L. gasseri* (19,2%). Nos indivíduos com VB, no entanto, *L. gasseri* (36,4%) foi o isolado mais prevalente, seguido por *L. crispatus* (18,2%) e *L. jensenii* (13,7%).

De acordo com o método de PCR-DGGE também foram detectadas 13 espécies de lactobacilos nas amostras vaginais analisadas, sendo *L. iners* o microrganismo mais prevalente nos três grupos de pacientes integrantes do estudo: 48,7% das pacientes saudáveis, 44,7% das pacientes com CVV e 65,0% das pacientes com VB (Figura 27).

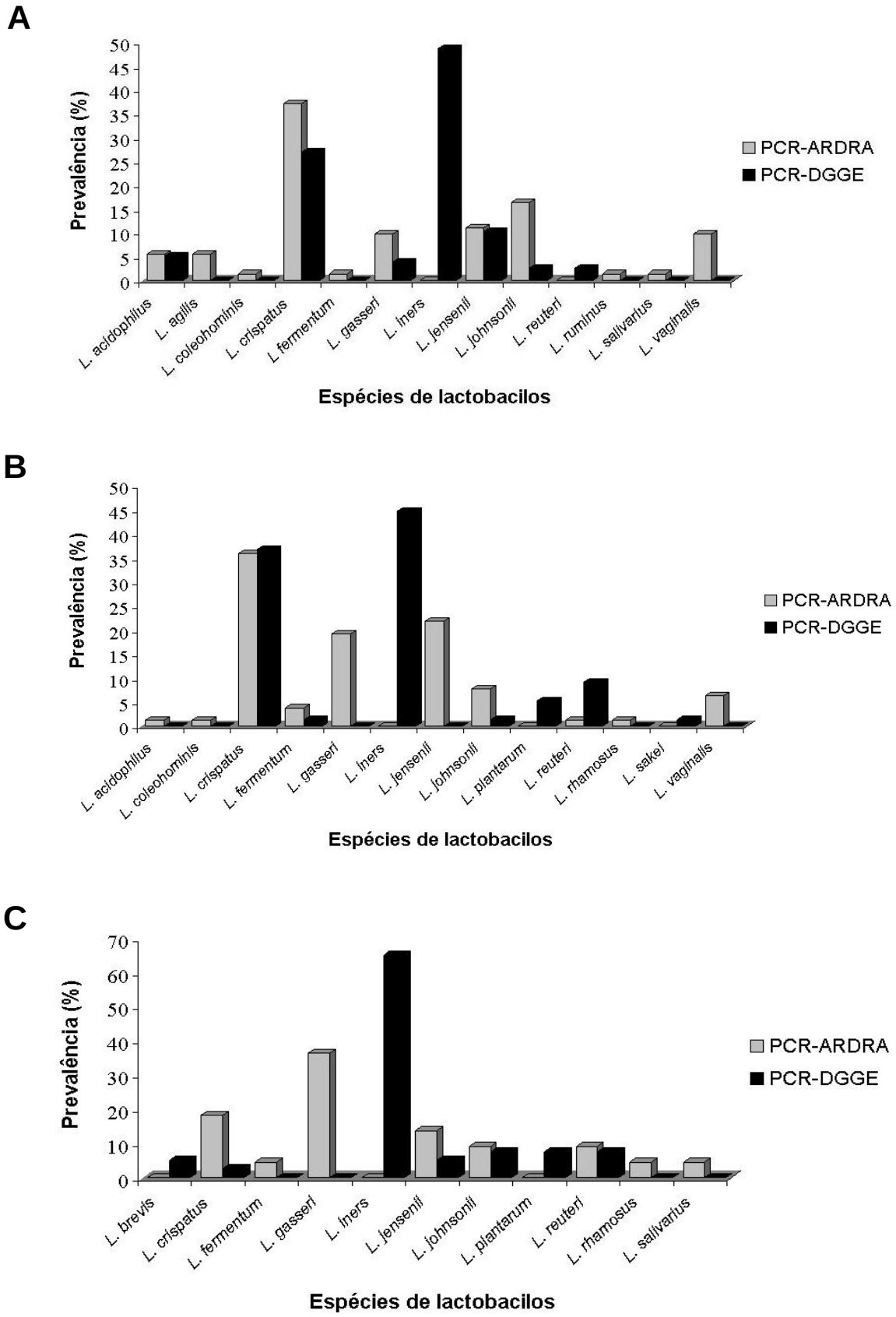


Figura 27. Prevalência de lactobacilos vaginais obtidos a partir de três grupos de pacientes: 64 mulheres saudáveis (A), 68 mulheres diagnosticadas com candidíase vulvovaginal (B) e 64 mulheres diagnosticadas com vaginose bacteriana (C), de acordo com os resultados obtidos através das técnicas de PCR-ARDRA e PCR-DGGE.

Os resultados obtidos com a técnica de PCR-ARDRA revelaram que dentre as pacientes saudáveis colonizadas simultaneamente por duas espécies de lactobacilos, as combinações mais prevalentes foram *L. acidophilus* e *L. crispatus* (três mulheres), *L. crispatus* e *L. johnsonii*, *L. johnsonii* e *L. vaginalis*, além de *L. agilis* e *L. johnsonii* (duas mulheres cada). Apenas uma das mulheres saudáveis estava colonizada por três espécies de lactobacilos (*L. crispatus*, *L. vaginalis* e *L. jensenii*). No grupo de pacientes diagnosticadas com CVV, *L. crispatus* e *L. jensenii* foram detectados em cinco amostras vaginais, enquanto que *L. fermentum* e *L. gasseri* foram identificados a partir de duas pacientes. Uma paciente com CVV estava colonizada por *L. gasseri*, *L. jensenii* e *L. crispatus* enquanto uma outra exibiu amostra vaginal positiva para *L. gasseri*, *L. jensenii* e *L. johnsonii*. No grupo de pacientes diagnosticadas com VB, foi determinada a presença simultânea de *L. gasseri* e *L. johnsonii* em apenas uma paciente, enquanto que as demais pacientes deste grupo colonizadas por lactobacilos, exibiram amostras positivas para apenas uma espécie do microrganismo.

A técnica de PCR-DGGE também permitiu evidenciar pacientes saudáveis colonizadas simultaneamente por duas espécies de lactobacilos, sendo as combinações mais freqüentes de *L. crispatus* e *L. iners* (sete pacientes), *L. acidophilus* e *L. iners*, além de *L. jensenii* e *L. iners* (duas pacientes cada). No grupo de pacientes com CVV, *L. crispatus* e *L. iners* também foi a combinação mais prevalente (sete pacientes), seguida por *L. iners* e *L. plantarum* (duas pacientes). No grupo de pacientes com VB, *L. jensenii* e *L. iners*, *L. plantarum* e *L. reuteri*, além de *L. crispatus* e *L. iners* foram as combinações entre espécies de lactobacilos mais freqüentes (uma paciente cada).

As figuras 28, 29 e 30 ilustram resultados de géis de DGGE obtidos a partir de amostras vaginais de pacientes saudáveis, diagnosticadas com CVV e VB, respectivamente.

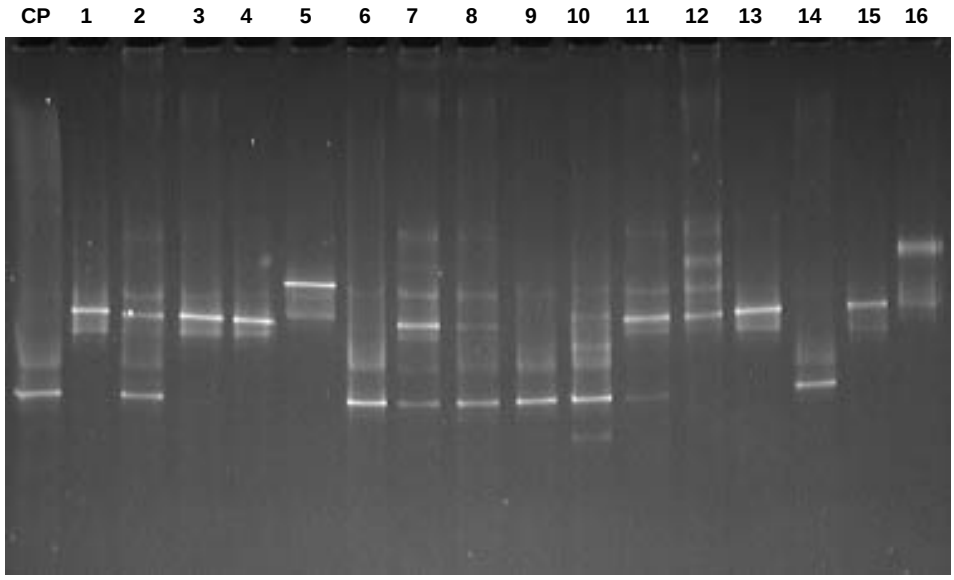


Figura 28. Fotografia de gel obtido em testes de DGGE, exibindo as bandas de DNA do controle positivo (CP) *L. iners* 13385 e obtidas a partir de pacientes saudáveis (numeradas de 1 a 16).

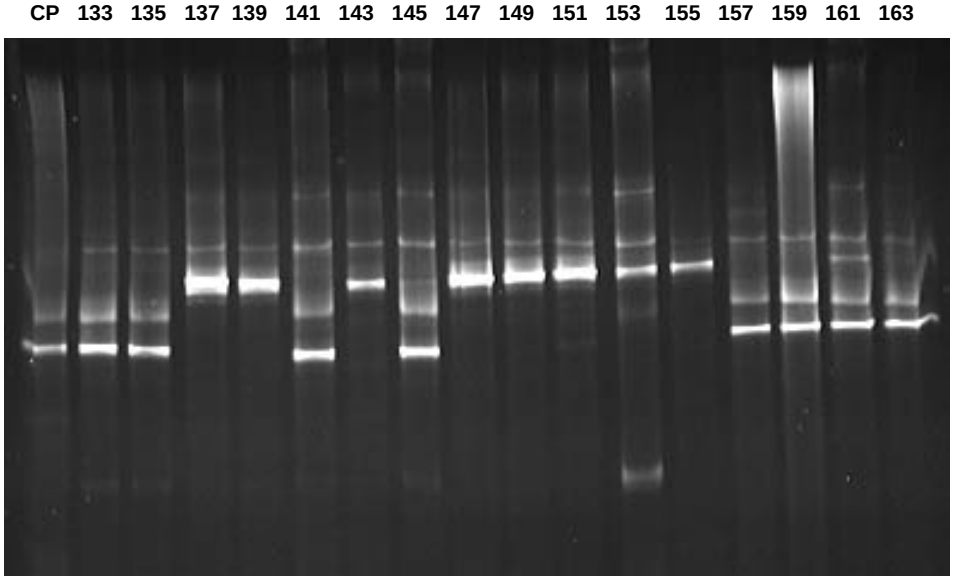


Figura 29. Fotografia de gel obtido em testes de DGGE, exibindo as bandas de DNA do controle positivo (CP) *L. iners* 13385 e obtidas a partir de pacientes diagnosticadas com candidíase vulvovaginal (numeradas de 133 a 163).

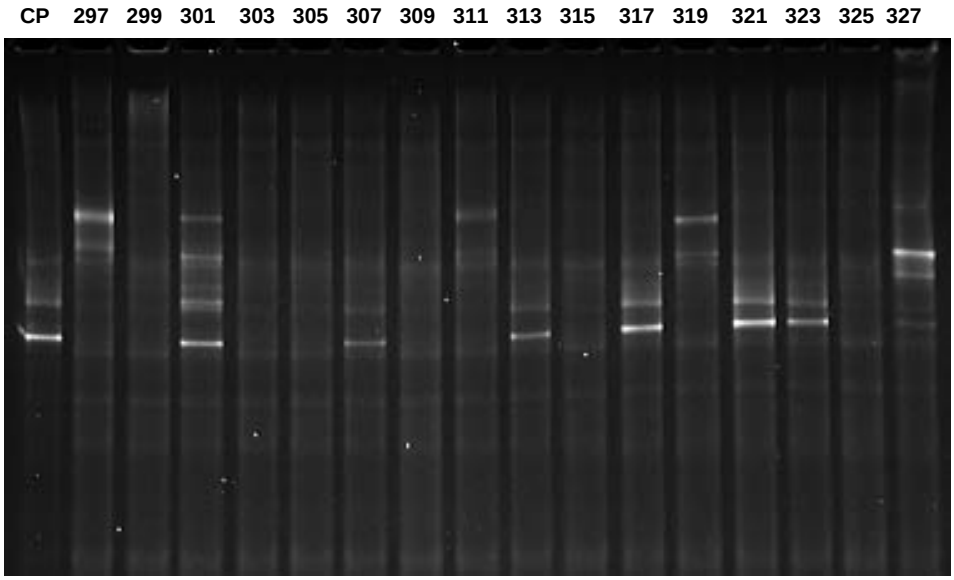


Figura 30. Fotografia de gel obtido em testes de DGGE, exibindo as bandas de DNA do controle positivo (CP) *L. iners* 13385 e obtidas a partir de pacientes diagnosticadas com vaginose bacteriana (numeradas de 297 a 327).

Pela utilização de PCR-ARDRA não foi possível detectar *L. brevis*, *L. iners*, *L. plantarum* e *L. sakei*, enquanto que PCR-DGGE não permitiu a detecção de *L. agilis*, *L. coleohominis*, *L. ruminus* e *L. salivarius* nas amostras avaliadas.

A taxa de concordância entre os resultados obtidos com as técnicas de PCR-ARDRA e PCR-DGGE para a identificação de lactobacilos vaginais nos três grupos de pacientes, revelou um grau de concordância entre moderado e bom para *L. crispatus* (Coeficiente de Kappa=0,531), contudo, para todas as demais espécies de lactobacilos avaliadas, pequena ou nenhuma concordância foi verificada.

5.3 Produção de H_2O_2 pelos isolados de lactobacilos

O número absoluto e a prevalência geral (expressa em porcentagem) dos lactobacilos vaginais que não produziram H_2O_2 nos grupos de mulheres saudáveis, diagnosticadas com CVV e VB foram, respectivamente, um (1,4%) (Tabela 10), dois (2,6%) (Tabela 11) e sete (31,8%) (Tabela 12) ($p<0,05$). Os isolados correspondentes a *L. crispatus* e *L. johnsonii* produziram, comparativamente, as maiores taxas médias de H_2O_2 frente àqueles obtidos a partir do grupo de pacientes com VB ($p<0,05$), no qual somente dois isolados (*L. jensenii* e *L. johnsonii*) foram capazes de produzir altas concentrações de H_2O_2 (entre 30 e 100 mg/L).

Tabela 10 – Resultados semi-quantitativos da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por diferentes espécies de lactobacilos vaginais obtidos a partir de 64 mulheres saudáveis, que foram triadas em centros de saúde da cidade de Ribeirão Preto afiliados com a Universidade de São Paulo, no período de maio a setembro de 2005

Espécies de lactobacilos (No. de isolados testados)	No. de isolados produtores de H_2O_2 (mg/L)				
	Negativo	**1-3**	**3-10**	**10-30**	**30-100**
L. agilis (4)	0	0	2	1	1
L. coleohominis (1)	0	0	1	0	0
L. crispatus (27)	1	0	9	15	2
L. fermentum (1)	0	1	0	0	0
L. gasseri (7)	0	0	3	4	0
L. jensenii (8)	0	0	1	7	0
L. johnsonii (12)	0	0	2	3	7
L. reuteri (0)	0	0	0	0	0
L. rhamnosus (0)	0	0	0	0	0
L. ruminus (1)	0	0	1	0	0
L. salivarius (1)	0	0	0	1	0

Tabela 11 – Resultados semi-quantitativos da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por diferentes espécies de lactobacilos vaginais obtidos a partir de 68 mulheres diagnosticadas com candidíase vulvovaginal, que foram triadas em centros de saúde da cidade de Ribeirão Preto afiliados com a Universidade de São Paulo, no período de setembro de 2006 a maio de 2007

Espécies de lactobacilos (No. de isolados testados)	No. de isolados produtores de H_2O_2 (mg/L)				
	Negativo	**1-3**	**3-10**	**10-30**	**30-100**
L. acidophilus (1)	0	0	0	0	1
L. agilis (0)	0	0	0	0	0
L. coleohominis (1)	0	0	0	1	0
L. crispatus (28)	0	3	9	9	7
L. fermentum (3)	0	1	1	1	0
L. gasseri (15)	2	0	6	3	4
L. jensenii (17)	0	1	0	6	10
L. Johnsonii (6)	0	0	0	2	4
L. reuteri (1)	0	0	1	0	0
L. rhamnosus (1)	0	0	0	0	1
L. ruminus (0)	0	0	0	0	0
L. salivarius (0)	0	0	0	0	0
L. vaginalis (5)	0	0	3	1	1

Tabela 12 – Resultados semi-quantitativos da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por diferentes espécies de lactobacilos vaginais obtidos a partir de 64 mulheres diagnosticadas com vaginose bacteriana, que foram triadas em centros de saúde da cidade de Ribeirão Preto afiliados com a Universidade de São Paulo, no período de setembro de 2006 a maio de 2007

Espécies de lactobacilos (No. de isolados testados)	**No. de isolados produtores de H_2O_2 (mg/L)**				
	Negativo	**1-3**	**3-10**	**10-30**	**30-100**
L. acidophilus (0)	0	0	0	0	0
L. agilis (0)	0	0	0	0	0
L. coleohominis (0)	0	0	0	0	0
L. crispatus (4)	1	3	0	0	0
L. fermentum (1)	0	1	0	0	0
L. gasseri (8)	3	1	3	1	0
L. jensenii (3)	1	0	0	1	1
L. johnsonii (2)	0	0	1	0	1
L. reuteri (2)	1	1	0	0	0
L. rhamnosus (1)	1	0	0	0	0
L. ruminus (0)	0	0	0	0	0
L. salivarius (1)	0	1	0	0	0
L. vaginalis (0)	0	0	0	0	0

5.4 Isolamento e identificação de leveduras do gênero *Candida*

A taxa de colonização no grupo de mulheres saudáveis por leveduras do gênero *Candida* foi de 26,6% (17/64). Neste grupo, quatro pacientes exibiram amostras vaginais com a presença simultânea de *C. tropicalis* e *C.* não-*albicans*.

No grupo de pacientes diagnosticadas com CVV, 80,9% (55/64) das pacientes apresentaram leveduras do gênero *Candida* quando avaliadas pelo método de cultura. Neste grupo foi obtido um total de 56 isolados do microrganismo, sendo que apenas uma paciente estava simultaneamente colonizada por duas espécies (*C. albicans* e *C. krusei*).

A figura 31 mostra os aspectos macroscópicos típicos dos isolados pertencentes ao gênero *Candida*, obtidos após a semeadura e incubação do material vaginal em meio Chromagar® Candida (Probac – São Paulo) (incubados a 37ºC por 48h).

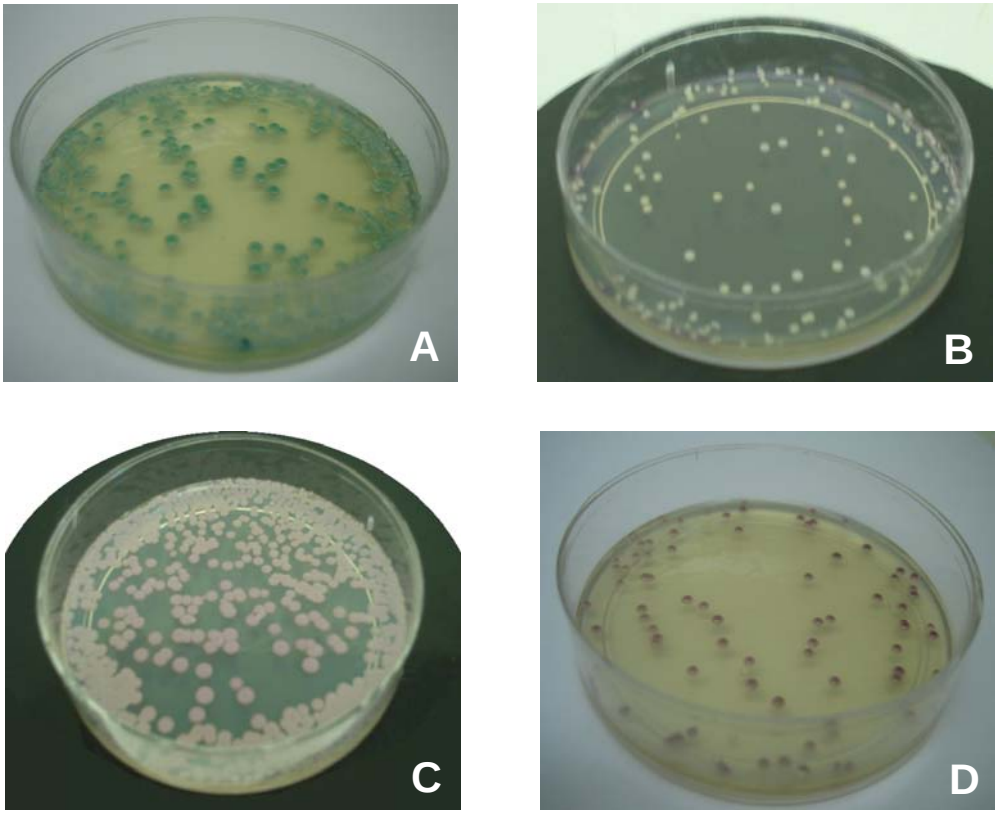


Figura 31. Diferentes aspectos macroscópicos de colônias de leveduras pertencentes ao gênero *Candida*, obtidas a partir de amostras vaginais de pacientes saudáveis e com candidíase vulvovaginal, após semeadura em superfície em meio de cultura seletivo e diferencial [Chromagar® Candida (Probac – São Paulo)] e incubação por 48 horas a 37ºC: verdes (A), brancas (B), rosas (C) e roxas (D) (Autoria: Rafael Chacon Ruiz Martinez).

Nas figuras 32 e 33, respectivamente, está mostrada a distribuição das espécies de *Candida* nos grupos de mulheres saudáveis e diagnosticadas com CVV, identificadas através de testes bioquímicos (KURTZMAN; FELL, 1998), a partir dos isolados obtidos no meio Chromagar® Candida.

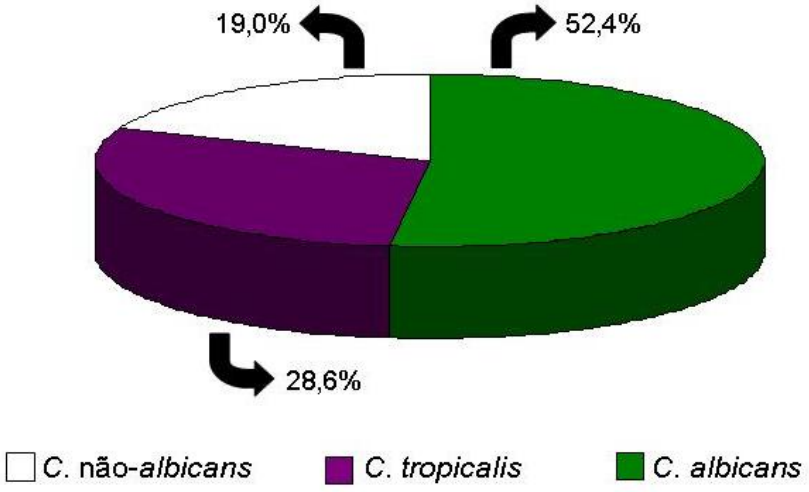


Figura 32. Distribuição de leveduras do gênero *Candida*, isoladas do grupo de 64 pacientes saudáveis, identificadas presuntivamente no meio Chromagar® Candida e confirmadas com provas bioquímicas, de acordo com Kurtzman e Fell (1998).

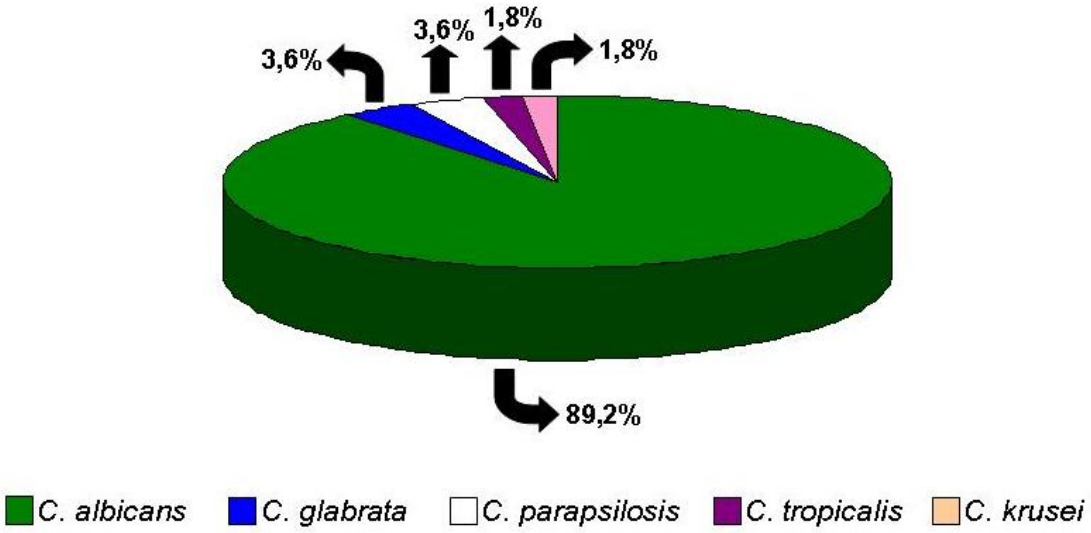


Figura 33. Distribuição de leveduras do gênero *Candida*, isoladas do grupo de 68 pacientes diagnosticadas com candidíase vulvovaginal, identificadas presuntivamente no meio Chromagar® Candida e confirmadas com provas bioquímicas de acordo com Kurtzman e Fell (1998).

Todos os isolados de leveduras que apresentaram colônias verdes nas placas de Chromagar® Candida foram confirmados bioquimicamente como *C. albicans*.

No grupo de mulheres saudáveis, todos os seis isolados de coloração roxa no meio Chromagar® Candida foram identificados como *C. tropicalis* através de testes bioquímicos, enquanto que no grupo de pacientes diagnosticadas com CVV, dentre os quatro isolados que também apresentaram coloração roxa, dois (50,0%) foram identificados como *C. glabrata*, um (25,0%) como *C. tropicalis* e um (25,0%) como *C. parapsilosis*.

Um único isolado de coloração rosa no meio Chromagar® Candida, obtido a partir de uma paciente com CVV, foi identificado por provas bioquímicas como *C. krusei*.

Dentre os isolados de leveduras obtidos no grupo de pacientes saudáveis, quatro eram brancos no meio Chromagar Candida® e todos foram identificados como *C.* não-*albicans*. A partir do grupo de pacientes diagnosticadas com CVV, o único isolado de cor branca no Chromagar® Candida foi identificado como *C. parapsilosis*, compatível com resultado de identificação fornecido pelo fabricante do meio cromogênico.

5.5 Avaliação da eficácia da utilização de microrganismos probióticos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 e medicamento antimicrobiano nas pacientes diagnosticadas com CVV

Sessenta e oito mulheres foram diagnosticadas com CVV pela presença de sintomatologia típica da infecção (corrimento vaginal esbranquiçado, aliado à queimação e/ou prurido vaginal, dispareunia e disúria) e detecção de *Candida* sp. por meio de solução de KOH a 10% (p/v) e/ou coloração pelo método de Gram e/ou cultura. Entretanto, somente 55 pacientes foram consideradas para análises estatísticas, pois 13 tiveram amostras negativas para *Candida* sp. por método de cultivo, considerado como o padrão ouro para o diagnóstico de CVV (CHATWANI et al., 2007).

Aleatoriamente, um grupo de 29 mulheres foi tratado com dose única de fluconazol (150mg) e suplementação diária com cápsulas de probiótico e, um segundo grupo de 26 pacientes recebeu como tratamento fluconazol e placebo. Todas as pacientes relataram adesão ao tratamento. Os resultados das características demográficas e comportamentais, bem como os sinais, sintomas e achados microbiológicos das pacientes dos dois grupos estão reunidos na Tabela 13. *C. albicans* representou 93,3% de todos os isolados no grupo do probiótico e 84,6% no grupo placebo.

Tabela 13 – Características demográficas e comportamentais, sinais e resultados das determinações laboratoriais das pacientes diagnosticadas com candidíase vulvovaginal (CVV), obtidas durante primeira consulta com o médico ginecologista, que foram triadas em centros de saúde da cidade de Ribeirão Preto afiliados com a Universidade de São Paulo, no período de setembro de 2006 a maio de 2007. Os resultados estão expressos como números absolutos e porcentagens, respectivamente

Observação	Grupo fluconazol e probiótico[1] (n=29)	Grupo fluconazol e placebo[2] (n=26)
Idade média (intervalo)	29,1 ± 7,5 (16 a 46)	26,9 ± 7,8 (16 a 42)
Uso de métodos contraceptivos	17 (58,6)	18 (69,2)
Uso de métodos hormonais contraceptivos	12 (41,4)	14 (53,8)
Menstruação regular	19 (65,5)	20 (76,9)
CVV recorrente (auto-informado)	11 (37,9)	5 (19,2)
Corrimento vaginal associado a pelo menos um dos seguintes sintomas: sensação de prurido, ardor vaginal, dispareunia e/ou disúria	29 (100,0)	26 (100,0)
Teste de “Whiff” positivo	1 (3,4)	1 (3,8)
Escore de Nugent indicativo de vaginose bacteriana	0 (0,0)	0 (0,0)
pH vaginal inferior a 4,5	27 (93,1)	25 (96,2)
Presença de *Candida* (método de cultura)	29 (100,0)*	26 (100,0)**
Presença de *Candida* (preparações de KOH 10%)	28 (96,6)	23 (88,5)
Presença de *Candida* (esfregaços vaginais corados pelo método de Gram)	25 (86,2)	21 (80,8)

[1] grupo com 29 mulheres randomizadas para serem tratadas com dose única de fluconazol (150mg) e duas cápsulas do probiótico oral (*L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14) para uso diário, no período da manhã, durante quatro semanas. [2] grupo com 26 mulheres randomizadas para serem tratadas com dose única de fluconazol (150mg) e duas cápsulas do placebo oral para uso diário, no período da manhã, durante quatro semanas. **C.* não-*albicans* foi detectada em 6,7% das amostras: *C. glabrata* (um isolado) e *C. krusei* (um isolado). ***C.* não-*albicans* foi detectada em 15,4% das amostras: *C. glabrata* (um isolado), *C. parapsilosis* (dois isolados) e *C. tropicalis* (um isolado).

No dia 28, ao término do tratamento, a comparação entre o grupo tratado com fluconazol e probiótico e o grupo tratado com fluconazol e placebo revelou que mais pacientes (89,7%) tratadas com fluconazol e probiótico exibiram cura da CVV, considerada como ausência de corrimento vaginal, prurido, queimação, dispareunia e/ou disúria e amostras vaginais negativas para *Candida* pelo método de cultura (p<0,05) (Tabela 14).

Tabela 14 – Determinações obtidas após quatro semanas de tratamento, comparando-se pacientes com candidíase vulvovaginal tratadas com dose única de fluconazol (150mg) e suplementadas com probiótico oral ou cápsulas de placebo, utilizadas diariamente durante quatro semanas. Os resultados estão expressos como números absolutos e porcentagens, respectivamente

Resultado	Fluconazol e probiótico (n=29)	Fluconazol e placebo (n=26)	*p**
Corrimento vaginal associado a pelo um dos seguintes sintomas (sensação de prurido e ardor vaginal, dispareunia e/ou disúria)	3 (10,3)	9 (34,6)	0,030
Presença de *Candida* através do método de cultura	3 (10,3)	10 (38,5)	0,014
Teste de “Whiff” positivo	1 (3,4)	2 (7,7)	0,598 φ
pH vaginal > 4,5	2 (6,9)	1 (3,8)	> 0,999 φ
Escore de Nugent indicativo de VB	0 (0,0)	2 (7,7)	0,219 φ

* Para a análise das proporções, o teste de Qui-quadrado foi utilizado, exceto onde φ foi assinalado. Nestes casos, o teste exato de Fisher bi-cauldal foi empregado.

Ao final do tratamento, também foi realizada uma análise estatística somente com as pacientes que apresentaram auto-relato de episódios recorrentes de CVV. Neste caso, mais mulheres no grupo placebo eram positivas, pelo método de cultura, para leveduras do gênero *Candida* do que as do grupo probiótico (80,0% e 18,2%, respectivamente) ($p<0,05$) (Tabela 15). Contudo não houve diferença estatística na taxa de cura clínica (remissão dos sintomas) quando ambos os grupos foram confrontados ($p>0,05$) (Tabela 15).

Tabela 15 – Determinações obtidas após quatro semanas de tratamento, comparando-se pacientes com candidíase vulvovaginal recorrente (auto-relatado) tratadas com dose única de fluconazol (150mg) e suplementadas com probiótico oral ou cápsulas de placebo diariamente, no período da manhã, durante quatro semanas. Os resultados estão expressos como números absolutos e porcentagens, respectivamente

Resultado	Fluconazol e probiótico (n=11)	Fluconazol e placebo (n=5)	*p**
Corrimento vaginal associado com pelo um dos seguintes sintomas (sensação de prurido e ardor vaginal, dispareunia e/ou disúria)	2 (18,2)	2 (40,0)	0,547
Presença de *Candida* através do método de cultura	2 (18,2)	4 (80,0)	0,036
Teste de “Whiff” positivo	0 (0,0)	1 (20,0)	0,313
pH vaginal > 4,5	1 (9,1)	0 (0,0)	> 0,999
Escore de Nugent indicativo de VB	0 (0,0)	1 (20,0)	0,313

* Para a análise das proporções, o teste exato de Fisher bi-caudal foi utilizado.

Dentre as seis pacientes diagnosticas com CVV causada por *C.* não-*albicans*, as taxas de cura não diferiram entre os grupos avaliados [1/2 (50,0%) e 2/4 (50,0%) para os grupos probiótico e placebo, respectivamente] (p>0,05).

Das pacientes que receberam fluconazol e probiótico, duas (6,9%) relataram o aumento do apetite, uma (3,4%) episódio de dor de cabeça persistente e uma outra (3,4%) ocorrência de fezes líquidas. No entanto, não é possível assegurar que tais sintomas estejam relacionados ao tratamento com as BAL probióticas.

5.6 Avaliação da eficácia da utilização de microrganismos probióticos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 e medicamento antimicrobiano nas pacientes diagnosticadas com VB

As mulheres diagnosticadas com VB participantes deste estudo relataram alta adesão ao tratamento. As características demográficas e comportamentais, bem como os sinais e sintomas da infecção por VB e os resultados das determinações laboratoriais obtidos para as 64 mulheres integrantes do estudo estão mostradas na Tabela 16. As pacientes que auto-relataram apresentar VB recorrente, estavam distribuídas ao acaso de maneira homogênea nos dois grupos: oito (25,0%) e sete (21,9%) no grupo probiótico e placebo, respectivamente.

Tabela 16 – Características demográficas e comportamentais, sintomas, sinais e determinações laboratoriais das pacientes diagnosticadas com vaginose bacteriana (VB), obtidas durante primeira consulta com o médico ginecologista, que foram triadas em centros de saúde da cidade de Ribeirão Preto afiliados com a Universidade de São Paulo, no período de setembro de 2006 a maio de 2007. Os resultados estão expressos como números absolutos e porcentagens, respectivamente

Observação	Tinidazol e probiótico[1] (n=32)	Tinidazol e placebo[2] (n=32)
Idade média (intervalo)	30,0 ± 10,9 (16 a 51)	30,3 ± 10,7 (16 a 50)
Uso de métodos contraceptivos	21 (65,6)	19 (59,4)
Menstruação regular	19 (59,4)	20 (58,8)
VB recorrente (auto-reportado)	8 (25,0)	7 (21,9)
Teste de Amsel positivo	32 (100,0)	32 (100,0)
pH vaginal > 4,5	31 (96,9)	29 (90,6)
Corrimento vaginal branco e/ou homogêneo e/ou aquoso	32 (100,0)	32 (100,0)
Teste de “Whiff” positivo	32 (100,0)	31 (96,9)
Odor vaginal fétido (auto-reportado)	30 (93,8)	28 (87,5)
Escore de Nugent indicativo de BV	31 (96,9)	32 (100,0)

[1] grupo com 32 mulheres randomizadas para serem tratadas com dose única de tinidazol (2g) e duas cápsulas de probiótico (*L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14) oral para uso diário, no período da manhã, durante quatro semanas. [2] grupo com 32 mulheres randomizadas para serem tratadas com dose única de tinidazol (2g) e duas cápsulas do placebo oral para uso diário, no período da manhã, durante quatro semanas.

Na figura 34 estão apresentados os resultados obtidos após as quatro semanas de tratamento, revelando que de acordo com o escore de Nugent, um número maior de pacientes (75,0%) que receberam tinidazol e probiótico apresentou esfregaços vaginais normais quando comparado àquelas que receberam tinidazol e placebo (34,4%) (*p*=0,011). Além disso, na figura 34 também pode ser verificado que mais pacientes no grupo placebo (46,9%) exibiram microbiota vaginal indicativa de vaginose bacteriana quando comparadas àquelas alocadas no grupo probiótico (12,5%) (*p*=0,003).

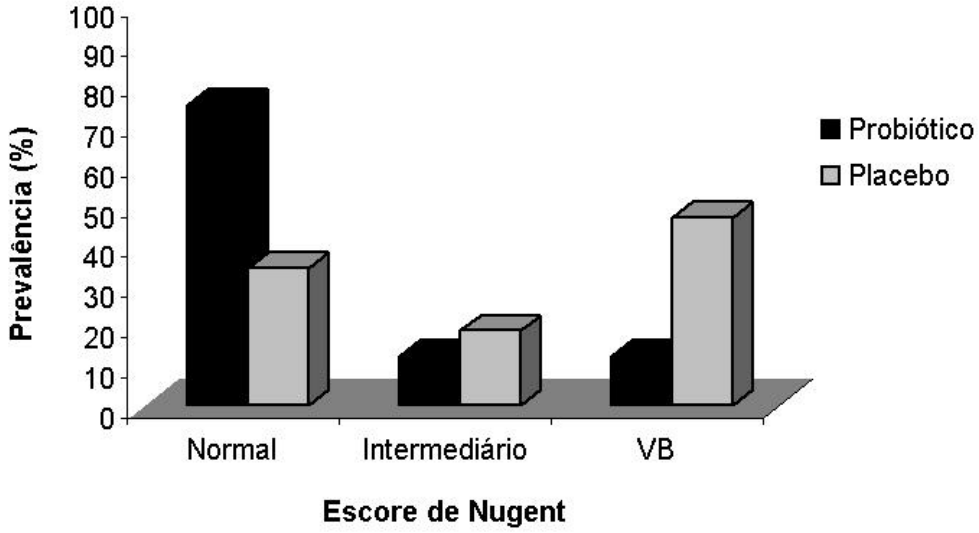


Figura 34. Prevalência de mulheres com microbiota vaginal normal, intermediária ou indicativa de vaginose bacteriana, avaliadas de acordo com o escore de Nugent após quatro semanas de tratamento com dose única de tinidazol (2g) e suplementação com duas cápsulas diárias de probiótico (*L. rhamnosus GR-1* e *L. reuteri* RC-14) ou placebo, durante quatro semanas, sendo que cada grupo compreendia 32 pacientes.

De acordo com a Tabela 17, pode ser verificado que ao final do período de tratamento, mais pacientes no grupo probiótico apresentaram teste de Amsel negativo em comparação ao grupo placebo (*p*=0,001). Assim, a taxa de cura obtida no grupo tratado com tinidazol mais probiótico, foi de 87,5% *versus* 50,0%, obtido no grupo tratado com tinidazol mais placebo (*p*<0,05).

Tabela 17 – Determinações obtidas após quatro semanas de tratamento, comparando-se pacientes com vaginose bacteriana tratadas com dose única de tinidazol (2g) e suplementadas com probiótico oral (*L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14) ou cápsulas de placebo, utilizadas no período da manhã, diariamente durante quatro semanas. Os resultados estão expressos como números absolutos e porcentagens, respectivamente

Resultado	Tinidazol e probiótico (n=32)	Tinidazol e placebo (n=32)	*p**
Teste de Amsel positivo	4 (12,5)	16 (50,0)	0,001
pH vaginal > 4,5	9 (28,1)	17 (53,1)	0,042
Corrimento vaginal branco e/ou homogêneo e/ou aquoso	6 (18,8)	18 (56,3)	0,002
Teste de “Whiff” positivo	6 (18,8)	18 (56,3)	0,002
Odor vaginal fétido (auto-reportado)	3 (9,4)	9 (28,1)	0,055

* O teste de Qui-quadrado foi utilizado exceto quando inválido (contagens inferiores a cinco), nestes casos o teste exato de Fisher bi-caudal foi empregado.

Também foi observado que quatro pacientes no grupo placebo (12,5%) e uma no grupo probiótico (3,1%) desenvolveram CVV pós-tratamento, embora não tenha sido observada diferença estatística entre ambos (*p*=0,474).

Dentre as pacientes que auto-afirmaram sofrer de VB recorrente e utilizaram o probiótico, 25,0% apresentaram teste de Amsel positivo após tratamento, comparado com 42,9% no grupo placebo, embora não tenha sido observada diferença estatística entre ambos (p>0,05). O mesmo foi obtido em relação ao teste de Nugent, segundo o qual 75,0% das pacientes no grupo probiótico exibiram microbiota vaginal “normal“ *versus* 42,9% no grupo placebo (p=0,315).

Apenas uma paciente (3,1%) do grupo que recebeu tinidazol e probiótico referiu um episódio de dor de cabeça persistente, não sendo possível afirmar se este sintoma estava relacionado ao tratamento, nem mesmo diferenciar o possível efeito do tinidazol e do probiótico.

5.7 Pesquisa de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14

Ao final do tratamento, a determinação da presença ou ausência de *L. rhamnosus* GR-1 e/ou *L. reuteri* RC-14 nas amostras vaginais obtidas de pacientes que receberam suplementação com cápsulas do probiótico, revelou que 44,8% (13/29) das mulheres com CVV exibiram amostras positivas para o(s) microrganismo(s), enquanto que no grupo de pacientes com VB apenas 12,5% (4/32) apresentaram as BAL probióticas em sua microbiota vaginal.

A Figura 35 mostra uma fotografia de gel de agarose a 1,5% (p/v) obtido para determinar a presença ou ausência de *L. rhamnosus* GR-1 e/ou *L. reuteri* RC-14 nas amostras vaginais de pacientes diagnosticadas com CVV, após tratamento com fluconazol e as BAL probióticas.

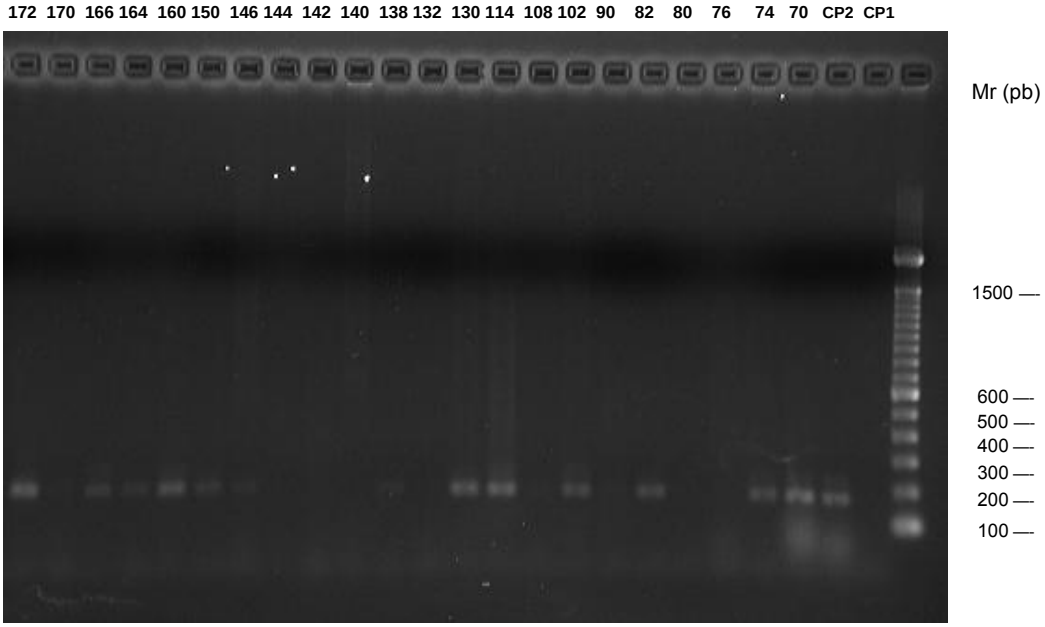


Figura 35. Fotografia de gel de agarose a 1,5% (p/v) exibindo as bandas de DNA dos controles positivos (CP) *L. rhamnosus* GR-1 (CP1) e *L. reuteri* RC-14 (CP2) e aquelas obtidas a partir de pacientes diagnosticadas com candidíase vulvovaginal (numeradas de 70 a 172) após tratamento com dose única de fluconazol (150mg) e suplementação com probiótico oral, utilizado no período da manhã, diariamente durante quatro semanas. O marcador de peso molecular (Mr) está mostrado à direita e expresso em pares de base (pb).

5.8 Resultados dos experimentos *in vitro* para avaliação do efeito de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 na modulação de infecção vaginal por *C. albicans*

Neste estudo, no tempo T=0, as células VK2/E6E7 produziram altas concentrações de IL-8 (57,17 ρg/mL), IL-1α (28,44 ρg/mL) e VEGF (113,36 ρg/mL), quando comparadas às concentrações determinadas para IL-6, IP-10 e RANTES (4,45 ρg/mL, 12,43 ρg/mL e 16,20 ρg/mL, respectivamente).

Após seis horas de incubação a 37ºC e 5,0% de CO_2, grandes quantidades de IL-1α (107,39 ρg/mL) e VEGF (52,71 ρg/mL) e pequenas concentrações de IL-8 (15,33 ρg/mL), RANTES (6,60 ρg/mL), IP-10 (4,64 ρg/mL) e IL-6 (4,54 ρg/mL) foram determinadas nos sobrenadantes obtidos a partir das células VK2/E6E7 (Figura 36a). Comparativamente, após seis horas de co-incubação com TNF-α, a produção de IL-6 foi aumentada (duas vezes), bem como a de IL-8 (5,5 vezes) e de IP-10 (duas vezes) pelas células VK2/E6E7 ($p<0,05$), quando comparado àquela obtida com as células VK2/E6E7 cultivadas isoladamente. Contudo, não foi observada diferença estatística na produção de IL-1α, RANTES e VEGF pelas células VK2/E6E7 na presença de TNF-α, determinada em T=6h (Figura 36a).

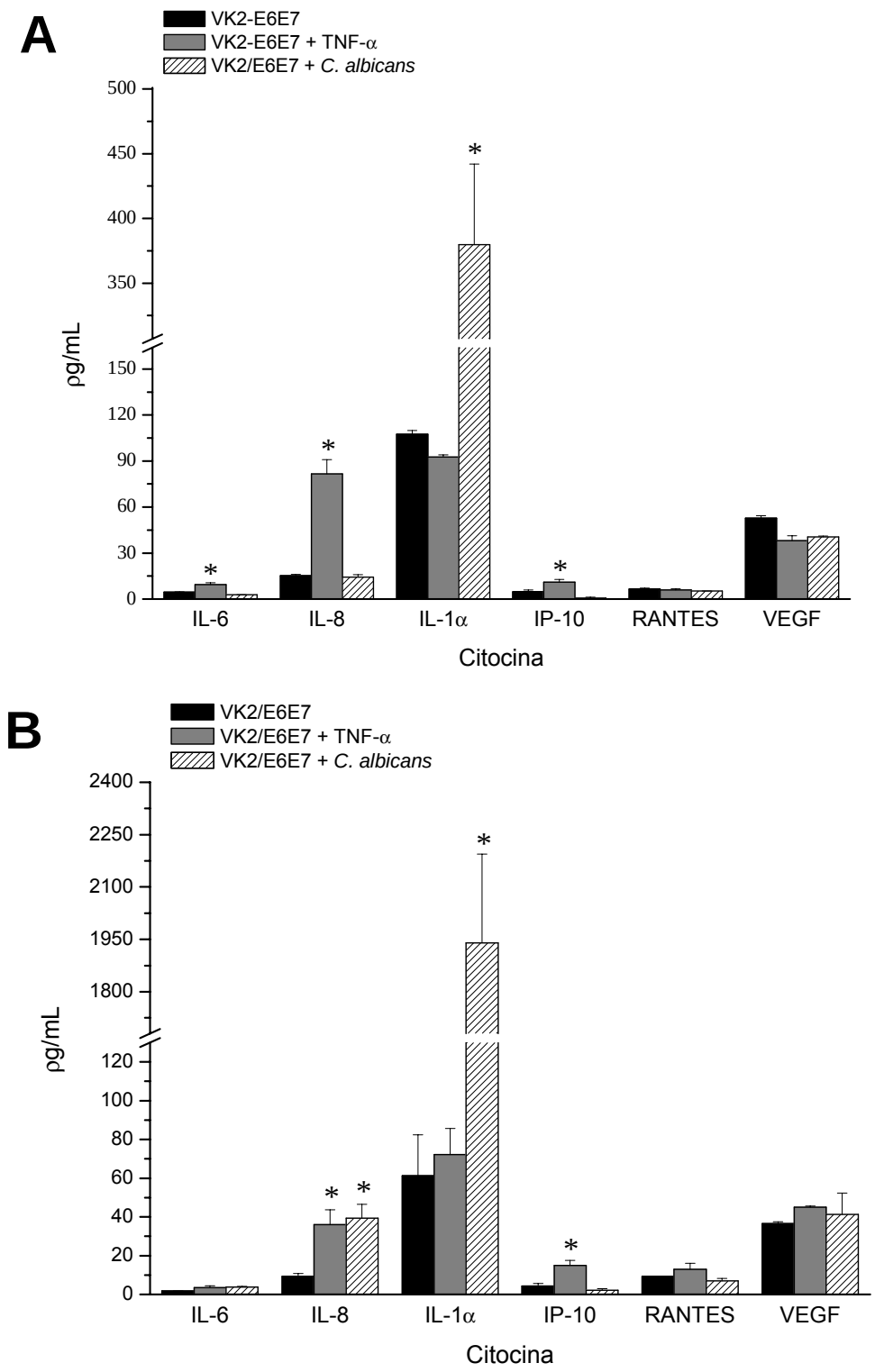


Figura 36. Produção de IL-6, IL-8, IL-1α, IP-10, RANTES e VEGF (expressa em ρg/mL) por células epiteliais vaginais VK2/E6E7 cultivadas isoladamente ($8{,}0 \times 10^4$ células/poço testado), crescida com 10ng/mL de TNF-α e infectadas com *C. albicans* 3153a ($2{,}0 \times 10^4$ UFC/mL). Os resultados foram obtidos após 6h (A) e 12h (B) de incubação a 37°C. TNF-α foi utilizado como controle positivo e os asteriscos indicam as condições nas quais as concentrações de citocinas foram significativamente diferentes ($p<0{,}05$) quando comparadas àquelas obtidas com VK2/E6E7 cultivadas isoladamente. São mostrados resultados médios de experimentos realizados em duplicata.

No tempo T=12h, TNF-α estimulou um aumento na produção de todas as citocinas pelas células VK2/E6E7; mas apenas para IL-8 e IP-10 foi observada diferença estatística quando comparado às concentrações obtidas no cultivo da linhagem celular isoladamente (p<0,05) (Figura 36b).

Após seis horas de incubação a 37ºC, a população de células VK2/E6E7 permaneceu estável (aproximadamente $8{,}0 \times 10^4$ células/poço). No intervalo de T=12h, as populações da linhagem celular diminuíram (cerca de $1{,}0 \times 10^4$ células/mL) nos poços contendo *C. albicans*, demonstrando que a levedura foi capaz de afetar a viabilidade celular das células epiteliais vaginais. *C. albicans* estimulou um forte aumento na secreção de IL-1α pelas células VK2/E6E7, observado em T=6h (três vezes; p<0,05; Figura 36a) e T=12h (31 vezes; p<0,05; Figura 36b). A secreção de IL-8 pelas células VK2/E6E7 foi aumentada pela infecção por *C. albicans* somente após 12h de co-cocultivo (Figura 36b). A levedura não afetou as concentrações de IL-6, IP-10, RANTES e VEGF secretadas pelas células epiteliais, determinadas em T=6h (Figura 36a) e T = 12h (Figura 36b).

Quando as células VK2/E6E7 infectadas com *C. albicans* foram desafiadas com cultura ou SLC de *L. reuteri* RC-14 ou *L. rhamnosus* GR-1 (individualmente ou combinados), os resultados determinados no intervalo de tempo T=12h indicaram que apenas SLC de *L. reuteri* RC-14 (sozinho e em combinação com SLC de *L. rhamnosus* GR-1) induziram um aumento na produção de IL-8 pelas células epiteliais vaginais (p<0,05; Figura 37). Além disso, as células VK2/E6E7 infectadas com *C. albicans* produziram níveis mais elevados de IP-10 quando desafiadas com SLC de *L. rhamnosus* GR-1 (sozinho e em combinação com SLC de *L. reuteri* RC-14) (p<0,05; Figura 37). Nenhuma outra condição testada afetou a produção de IL-6, IL-1α, RANTES e VEGF (p>0,05; Figura 38).

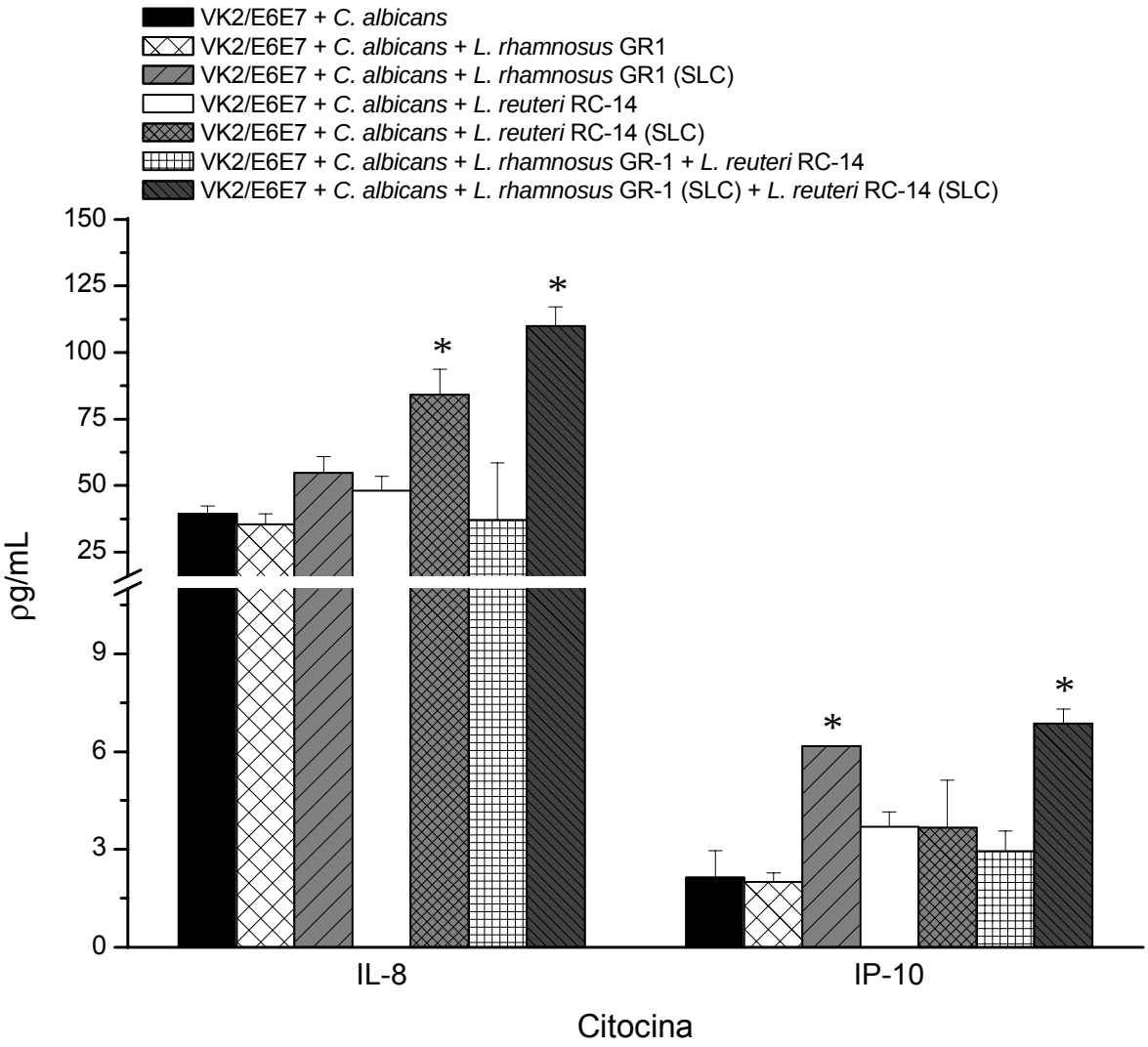


Figura 37. Produção de IL-8 e IP-10 (expressa em pg/mL) pela linhagem celular epitelial VK2/E6E7 ($8{,}0 \times 10^4$ células/poço testado) infectada com *C. albicans* 3153a ($2{,}0 \times 10^4$ UFC/mL), não desafiada ou desafiada com: i) *L. rhamnosus* GR-1 (10^7 UFC/mL); ii) SLC de *L. rhamnosus* GR-1 [1:10 (v/v)]; iii) *L. reuteri* RC-14 (10^7 UFC/mL); iv) SLC de *L. reuteri* RC-14 [1:10 (v/v)]; v) *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 (10^7 UFC/mL cada) e vi) SLC de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 [1:10 (v/v)]. Os resultados foram obtidos após 12h de incubação a 37°C e os asteriscos indicam as condições nas quais as concentrações de citocinas foram estatisticamente diferentes ($p<0{,}05$) quando comparados àquelas obtidas com VK2/E6E7 cultivada com *C. albicans* 3153a. São mostrados resultados médios de experimentos realizados em duplicata.

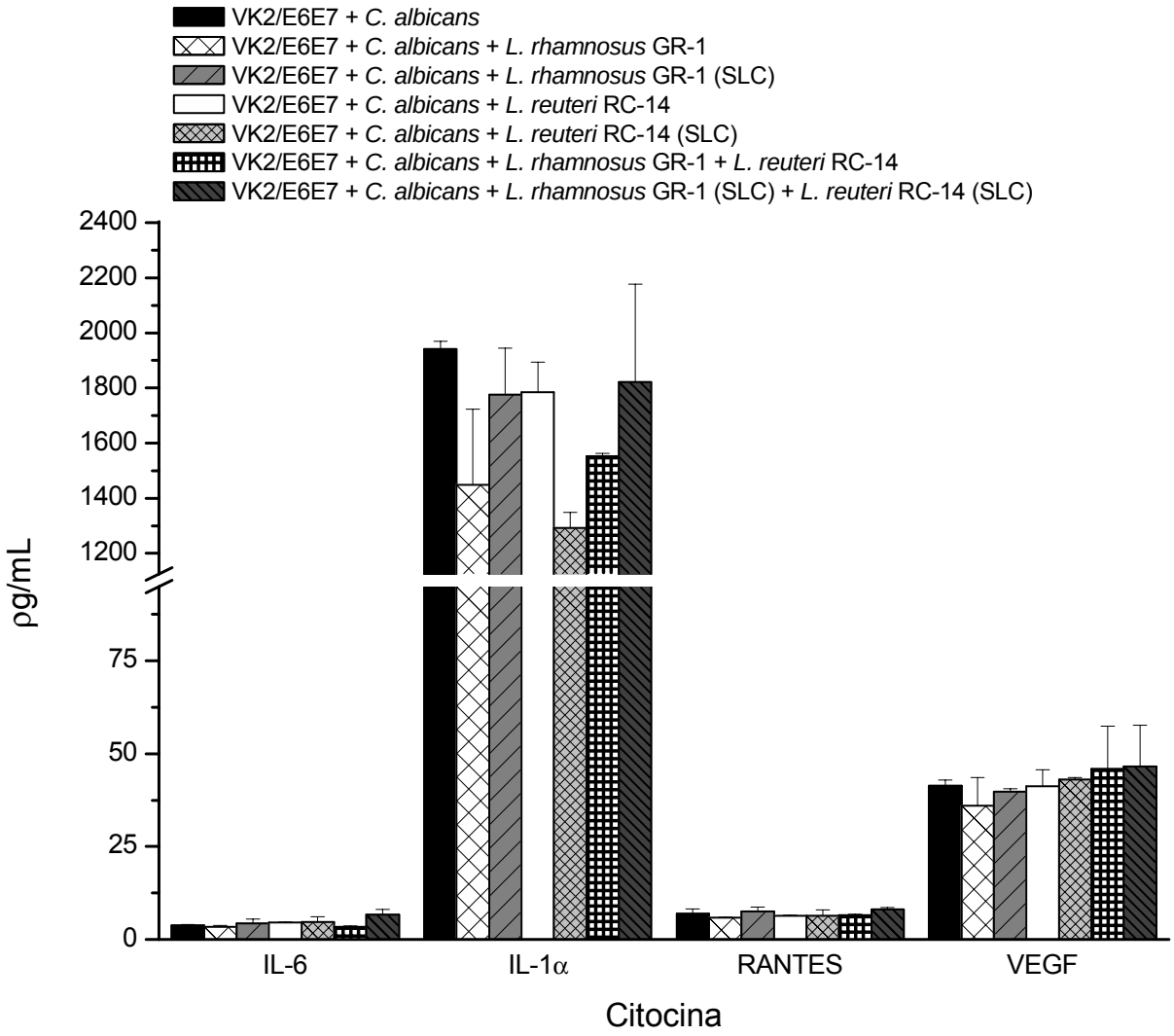


Figura 38. Produção de IL-6, IL-1α, RANTES e VEGF (expressa em pg/mL) pela linhagem celular epitelial VK2/E6E7 (8,0x10^4 células/poço testado) infectada com *C. albicans* 3153a (2,0x10^4 UFC/mL), não desafiada ou desafiada com: i) *L. rhamnosus* GR-1 (10^7 UFC/mL); ii) SLC de *L. rhamnosus* GR-1 [1:10 (v/v)]; iii) *L. reuteri* RC-14 (10^7 UFC/mL); iv) SLC de *L. reuteri* RC-14 [1:10 (v/v)]; v) *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 (10^7 UFC/mL cada) e vi) SLC de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 [1:10 (v/v)]. Os resultados foram obtidos após 12h de incubação a 37°C e os asteriscos indicam as condições nas quais as concentrações de citocinas foram estatisticamente diferentes (p<0,05) quando comparados àquelas obtidas com VK2/E6E7 cultivada com *C. albicans* 3153a. São mostrados resultados médios de experimentos realizados em duplicata.

Nas culturas de células VK2/E6E7 não desafiadas com *C. albicans* às quais foram adicionados cultura ou SLC de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 (sozinhos ou em combinação), a concentração de IL-8 determinada em T=12h indicou estimulação da produção da citocina (p>0,05; Figura 38). Além disso, a cultura de *L. reuteri* RC-14 foi capaz de elevar a secreção de IP-10 pelas células vaginais (p<0,05; Figura 39).

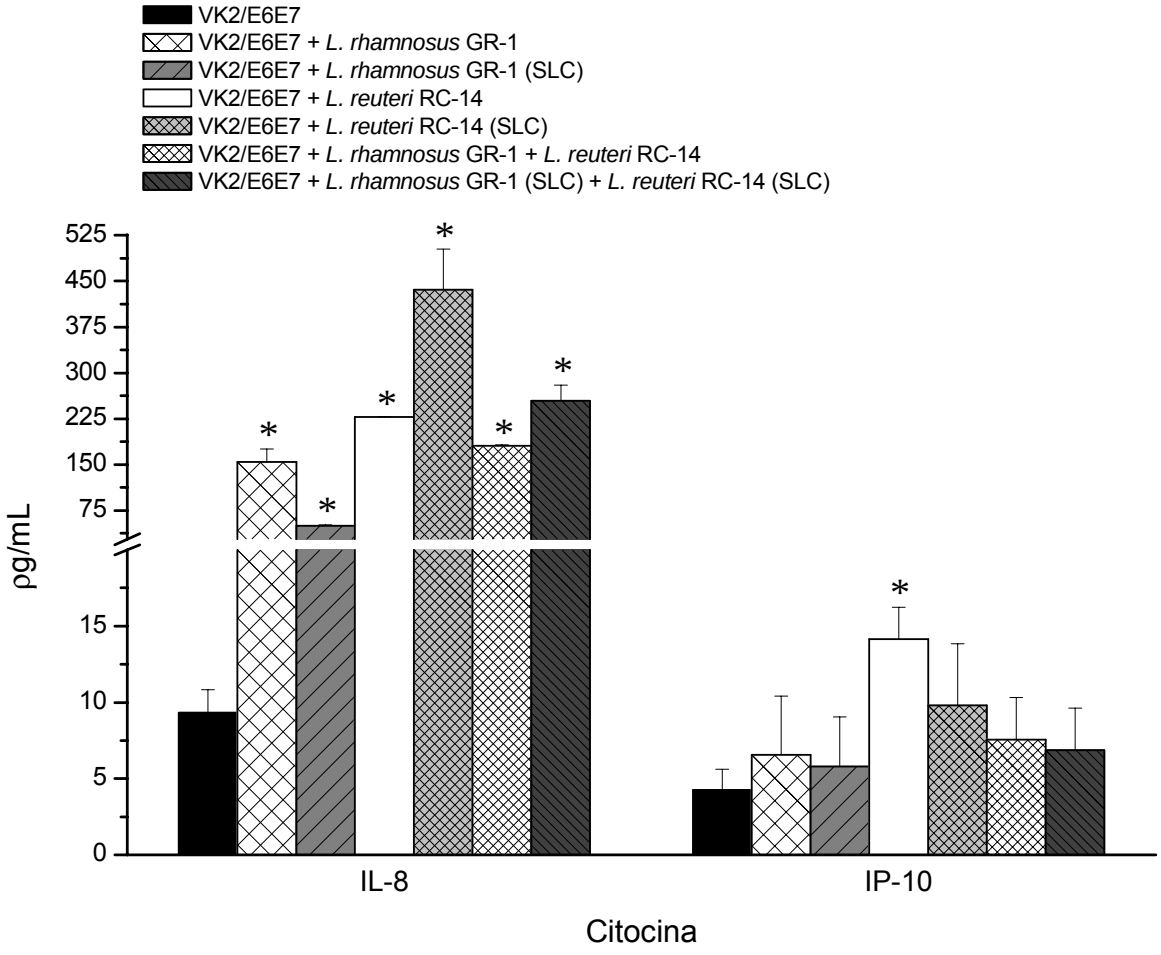


Figura 39. Produção de IL-8 e IP-10 (expressa em ρg/mL) pela linhagem celular epitelial VK2/E6E7 (8,0x10^4 células/poço testado) na presença de: i) *L. rhamnosus* GR-1 (10^7 UFC/mL); ii) SLC de *L. rhamnosus* GR-1 [1:10 (v/v)]; iii) *L. reuteri* RC-14 (10^7 UFC/mL); iv) SLC de *L. reuteri* RC-14 [1:10 (v/v)]; v) *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 (10^7 UFC/mL cada) e vi) SLC de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 [1:10 (v/v)]. Os resultados foram obtidos após 12h de incubação a 37°C e os asteriscos indicam as condições nas quais as concentrações de citocinas foram estatisticamente diferentes (p<0,05) quando comparadas àquelas obtidas com VK2/E6E7 cultivada isoladamente. São mostrados resultados médios de experimentos realizados em duplicata.

As populações de lactobacilos obtidas em T=6h, 12h e 24h permaneceram estáveis em todos os experimentos (cerca de 10^7 UFC/mL) (Figura 39). As populações de *C. albicans* determinadas em T=6h e T=12h foram semelhantes em todas as condições testadas (p>0,05) (Figura 40). No tempo T=24h, a população de *C. albicans* cultivada sozinha (controle) atingiu $4{,}0 \times 10^6$ UFC/mL (6,5 log UFC/mL), em comparação a $3{,}0 \times 10^5$ UFC/mL (5,5 log UFC/mL), verificada na presença de cultura de *L. reuteri* RC-14 isoladamente ou em combinação com cultura de *L. rhamnosus* GR-1 (p<0,05) (Figura 40).

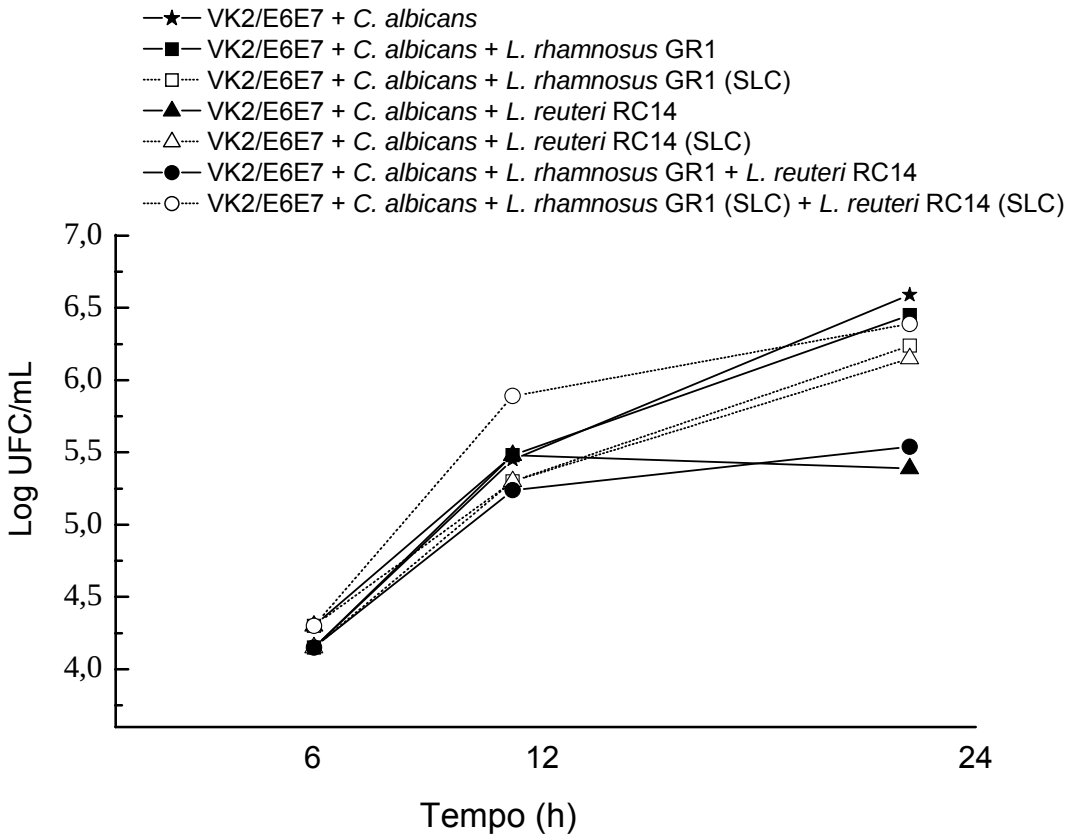


Figura 40. Enumeração (log UFC/mL) de *C. albicans* 3153a após 6h, 12h e 24h de incubação a 37°C em placas de 24 poços contendo a linhagem de célula epitelial vaginal VK2/E6E7 (controle) e desafiada com: i) *L. rhamnosus* GR-1 (10^7 UFC/mL); ii) SLC de *L. rhamnosus* GR-1 [1:10 (v/v)]; iii) *L. reuteri* RC-14 (10^7 UFC/mL); iv) SLC de *L. reuteri* RC-14 [1:10 (v/v)]; v) *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 (10^7 UFC/mL cada) e vi) SLC de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 [1:10 (v/v)]. As populações de *C. albicans* 3153a em T=24h nas condições iii) e iv) foram estatisticamente diferentes (p<0,05) quando comparadas àquelas obtidas no controle. São mostrados resultados médios de experimentos realizados em duplicata.

6. DISCUSSÃO

6.1 Caracterização de *Lactobacillus* spp. a partir das amostras vaginais obtidas

Os lactobacilos são reconhecidos como vitais na manutenção do equilíbrio vaginal, impedindo a multiplicação de agentes patogênicos e microrganismos oportunistas que podem predispor a doenças infecciosas (HILLIER et al., 1988). Acredita-se que a manutenção de uma microbiota vaginal normal seja importante para a saúde ginecológica e bem-estar geral da paciente (AROUTCHEVA et al., 2001; ZHOU et al., 2004).

Na última década, diversas técnicas moleculares (incluindo aquelas baseadas na reação de PCR e métodos de genotipagem) têm se tornado cada vez mais importantes para a identificação e diferenciação de espécies de isolados de *Lactobacillus* (VENTURA, 2000; HOLZAPFEL, 2001). No presente estudo, dois métodos moleculares, um baseado no cultivo prévio de microrganismos (PCR-ARDRA) e outro independente de cultivo (PCR-DGGE) foram utilizados para caracterizar as espécies de lactobacilos presentes em amostras vaginais obtidas de mulheres saudáveis, acometidas por CVV e VB. A detecção e identificação adequadas de microrganismos presentes no trato vaginal são imprescindíveis para conhecer a dinâmica da microbiota deste sítio anatômico. Isto é fundamental para uma melhor compreensão de processos infecciosos do trato vaginal, a fim de que possam ser tomadas medidas profiláticas ou terapêuticas adequadas, por exemplo, através da utilização de medicamentos antimicrobianos e/ou culturas probióticas (REID, 1999; STOYANTCHEVA; DANOVA; BOUDAKOV, 2006).

No presente estudo, os três grupos de pacientes avaliadas apresentavam características demográficas e comportamentais semelhantes ($p>0,05$) (Tabela 8). De acordo com os dados da enumeração das populações de isolados sugestivos de lactobacilos, foram obtidas contagens similares nos grupos de pacientes saudáveis e diagnosticadas com CVV ($p>0,05$), enquanto que o grupo de pacientes diagnosticadas com VB exibiu as menores populações de lactobacilos ($p<0,001$) (Tabela 9). Resultados semelhantes foram observados por Sobel e Chaim (1996), enquanto que Zdolsek et al. (1995) e Demirezen (2002) determinaram populações mais elevadas de lactobacilos em

pacientes diagnosticadas com CVV em comparação com pacientes saudáveis.

Pela técnica de PCR-ARDRA, 87,5% (56/64) das pacientes saudáveis incluídas neste estudo apresentaram lactobacilos nas amostras vaginais avaliadas. Resultados semelhantes foram relatados por Fontaine, Claydon e Taylor-Robinson (1996) e Mijac et al. (2006), nos quais, respectivamente, 88,6% e 86% das pacientes saudáveis estavam colonizadas por espécies de lactobacilos.

Ainda de acordo com a técnica de PCR-ARDRA, 88,2% (60/68) das amostras vaginais obtidas das pacientes diagnosticadas com CVV foram positivas para espécies de lactobacilos, taxa semelhante (81,5%) àquela obtida por Mijac et al. (2006).

No presente estudo 32,8% (21/64) das amostras vaginais provenientes de pacientes diagnosticadas com VB apresentavam *Lactobacillus* spp., de acordo com a técnica de PCR-ARDRA. Este gênero não foi detectado em nenhuma amostra de um grupo de dez mulheres acometidas por VB, em estudo conduzido por Stoyancheva, Danova e Boudakov (2006), enquanto que Mijac et al. (2006), identificaram lactobacilos em 58,0% das pacientes diagnosticadas com a infecção.

Embora a metodologia de PCR-DGGE tenha sido capaz de detectar mais pacientes colonizadas por lactobacilos (Figura 26) do que a técnica de PCR-ARDRA (Figura 25), ambas apresentaram limitações: PCR-ARDRA não permitiu a detecção de *L. brevis*, *L. iners*, *L. plantarum* e *L. sakei*. *L. iners* não se multiplica nos meios de cultivo normalmente empregados para o isolamento de lactobacilos, como o ágar MRS (FALSEN et al., 1999) e isto pode explicar porque esta espécie não foi detectada com esta técnica. Paralelamente, por PCR-DGGE não foram detectados *L. agilis*, *L. coleohominis*, *L. ruminus* e *L. salivarius* em qualquer uma das amostras avaliadas, provavelmente devido às pequenas populações desses microrganismos nos espécimes clínicos avaliados.

Com o uso da técnica de PCR-ARDRA, foi observado que o isolado mais prevalente no grupo de mulheres saudáveis era *L. crispatus* (37,0%), seguido por *L. johnsonii* (16,4%) e *L. jensenii* (11,0%), enquanto que a técnica de PCR-DGGE revelou *L. iners* como a espécie mais freqüentemente identificada em todos os grupos de pacientes

avaliados: 48,7% nas saudáveis, 44,7% nas diagnosticadas com CVV e 65,0% nas diagnosticadas com VB (Figura 27).

Este estudo revelou a ocorrência de espécies semelhantes de *Lactobacillus* vaginais em pacientes saudáveis brasileiras, quando comparadas àquelas encontradas em mulheres de países com ambiente, dieta e localização geográfica notadamente distintos, incluindo Nigéria (ANUKAM et al., 2006c) e Canadá (BURTON; REID, 2002), nas quais *L. iners* foi o microrganismo mais prevalente, determinado através da utilização de método independente de cultivo (PCR-DGGE). Este resultado é bastante interessante, pois a dieta é um fator muito importante para a colonização do TGI e da vagina por espécies de lactobacilos (ANTONIO; RABE; HILLIER, 2005), evidenciando a necessidade de mais estudos sobre a origem desses microrganismos.

No trabalho de Vásquez et al. (2002), foi realizado o cultivo de BAL a partir de amostras vaginais de mulheres saudáveis da Suécia e foi observado que a maior parte dos microrganismos isolados foi identificada como *L. crispatus* (48,0%) e *L. gasseri* (30,0%), utilizando técnica de tipagem por RAPD (DNA polimórfico amplificado randomicamente / *Randomly Amplified Polymorfic DNA*) e identificação por PCR-TGGE (Reação em cadeia da polimerase – Eletroforese em gel de gradiente de temperatura / *Polymerase chain reaction – Denaturating gradient gel temperature*) e seqüenciamento do DNA que codifica para a porção 16S do RNAr. Song et al. (1999a) verificaram que *L. crispatus* foi o microrganismo mais prevalente em um grupo de mulheres japonesas, através da identificação dos isolados pela metodologia de hibridização DNA-DNA. Da mesma maneira, *L. crispatus* também foi o microrganismo mais prevalente em amostras vaginais de mulheres da Coréia e Uganda, avaliadas por PCR da fração 16S do RNAr (JIN et al., 2007).

Alguns estudos apontam resultados distintos quanto à prevalência de espécies de lactobacilos vaginais em pacientes saudáveis de diferentes regiões do mundo. Stoyancheva, Danova e Boudakov (2006) avaliaram 30 pacientes saudáveis da Bulgária e identificaram *L. fermentum* como o microrganismo mais prevalente (40,9%), identificado pela técnica de ARDRA, ribotipagem e emprego de PCR com iniciadores específicos. Por sua vez, Mijac et

al. (2006) avaliaram 35 mulheres saudáveis da Sérvia e Montenegro e observaram que os lactobacilos vaginais mais prevalentes (isolados em meio MRS e identificados através de testes de fermentação de carboidratos) corresponderam a *L. acidophilus* (38,5%).

No entanto, os métodos fenotípicos tradicionais podem ser inadequados para distinguir espécies de *Lactobacillus* taxonomicamente relacionadas. Song et al. (1999b) compararam a identificação de 172 linhagens de lactobacilos de origem humana, através de método bioquímico (API 50 CHL, bioMérieux, Inc., Marcy-L'Etoile, França) e por ensaio de hibridização DNA-DNA. Aqueles autores observaram que apenas 52 linhagens (30,2%) foram adequadamente identificadas em espécies, com o emprego do *kit*. Por sua vez, Boyd, Antonio e Hillier (2005) utilizaram um teste baseado na fermentação de carboidratos (API 50 CH, bioMérieux, Inc., Marcy l´Etoile, França) para comparar a eficácia deste dispositivo na identificação de sete linhagens de referência de lactobacilos e 90 cepas do microrganismo identificadas pela análise de DNA cromossomal. O sistema de identificação baseado em provas bioquímicas exibiu resultados divergentes na identificação de todas as sete linhagens de referência avaliadas e apenas quatro lactobacilos (do grupo de 90 previamente isolados e identificados através de análise genômica) apresentaram resultados compatíveis com ambas as metodologias.

Desse modo a utilização de técnicas moleculares para identificação de *Lactobacillus* sp. é altamente recomendável, conforme realizado neste trabalho.

No grupo de pacientes diagnosticadas com CVV, considerando-se os resultados obtidos com a técnica de PCR-ARDRA, *L. crispatus* foi o microrganismo mais freqüentemente isolado (35,9%), seguido por *L. jensenii* (21,8%) e *L. gasseri* (19,2%), enquanto que Mijac et al., (2006) identificaram *L. acidophilus* como o microrganismo mais prevalente (37,5%) num grupo de mulheres com CVV avaliado.

No grupo de VB, *L. gasseri* (36,4%) foi o isolado mais freqüentemente identificado com o emprego da técnica de PCR-ARDRA no presente estudo, seguido por *L. crispatus* (18,2%) e *L. jensenii* (13,7%). Song et al. (1999a) também determinaram *L. gasseri* (33,3%) como o microrganismo mais prevalente na microbiota vaginal de dez mulheres com VB, mas

Mijac et al. (2006) relataram que *L. plantarum* (20,0%) foi o microrganismo mais prevalente num grupo de mulheres diagnosticadas com a infecção.

Vitali et al. (2007) utilizaram um método integrado, baseado em PCR-DGGE e PCR em tempo real para avaliar a estrutura e dinâmica das comunidades bacterianas em fluidos vaginais de mulheres saudáveis e diagnosticadas com CVV e VB. Aqueles autores também demonstraram que *L. iners* foi o microrganismo mais prevalente nos três grupos de pacientes avaliados, com a técnica de PCR-DGGE, semelhante aos resultados aqui obtidos. Além disso, Vitali et al. (2007) observaram que as amostras vaginais de pacientes saudáveis e com CVV eram dominadas por lactobacilos, embora tenham sido observadas diferenças na composição das espécies desses microrganismos entre os grupos.

No presente estudo, *L. crispatus* e *L. iners* foram as espécies mais prevalentes nas amostras vaginais nos grupos de pacientes saudáveis e diagnosticadas com CVV (determinadas através das técnicas de PCR-ADRA e PCR-DGGE, respectivamente), mas não é possível afirmar se a população dessas espécies era superior a outras, uma vez que foram utilizados métodos qualitativos. Para a avaliação quantitativa dessas populações, poderia ser empregada a técnica de PCR em tempo real, conforme realizado por Vitali et al. (2007).

Os resultados obtidos pelas técnicas dependente (PCR-ARDRA) e independente de cultivo (PCR-DGGE) para a identificação das populações de lactobacilos vaginais evidenciaram a importância da utilização de métodos de detecção e identificação complementares para melhor avaliação da prevalência de diferentes espécies do microrganismo.

Foi observado que mais de 60,0% das pacientes saudáveis e diagnosticadas com CVV estavam colonizadas por apenas uma espécie de *Lactobacillus* (Figuras 25 e 26). Isto pode estar relacionado à exclusão competitiva entre as espécies, pré-colonização por uma determinada espécie de lactobacilo ou ainda, fatores do próprio hospedeiro que poderiam influenciar fortemente quais espécies seriam capazes de colonizar o ecossistema vaginal (ZHOU et al., 2004).

Dentre as pacientes saudáveis, 25,0% e 23,5% estavam colonizadas por mais de uma espécie de lactobacilo, de acordo com as técnicas de PCR-ARDRA e PCR-DGGE, respectivamente. Antonio, Hawes e Hillier (1999) avaliaram amostras vaginais provenientes de 215 mulheres saudáveis e verificaram que 8% delas estavam colonizadas simultaneamente por mais de uma espécie de lactobacilo. Por sua vez, Mijac et al. (2006), verificaram que 11% das mulheres saudáveis que participaram daquele estudo estavam colonizadas por duas espécies de lactobacilos. No presente trabalho, a combinação mais prevalente de espécies de lactobacilos nas amostras vaginais obtidas de pacientes saudáveis foi *L. acidophilus* e *L. crispatus* (três mulheres, determinado através do método de PCR-ARDRA) e *L. crispatus* e *L. iners* (sete mulheres, determinado através da técnica de PCR-DGGE). Pascual et al. (2006) obtiveram resultados distintos, verificando como combinações mais freqüentes: *L. jensenii* e *L. fermentum*, além de *L. gasseri* e *L. acidophilus*. Antonio, Hawes e Hillier (1999) detectaram *L. crispatus* e *L. jensenii* em aproximadamente 50% das pacientes colonizadas por duas espécies de lactobacilos. De acordo com um estudo publicado por Redondo-Lopez, Cook e Sobel (1990) acreditava-se que duas mulheres não poderiam estar colonizadas pelas mesmas combinações de espécies de lactobacilos, em contradição com os resultados obtidos no presente estudo e com aqueles verificados pelos pesquisadores acima relatados (ANTONIO; HAWES; HILLIER, 1999; MIJAC et al., 2006; PASCUAL et al., 2006).

6.1.1 Determinação semi-quantitativa da produção de H_2O_2 por lactobacilos vaginais

A detecção da produção de H_2O_2 de lactobacilos isolados da microbiota vaginal é comumente realizada por método qualitativo em placa, com a utilização de peroxidase incorporada em meio contendo ágar e o reagente tetrametilbenzidina (ESCHENBACH et al., 1989; HAWES et al., 1996; MARTIN et al., 1999; MIJAC et al., 2006). Somente alguns estudos determinaram quantitativamente a produção de H_2O_2 por lactobacilos vaginais (FONTAINE; TAYLOR-ROBINSON, 1990; BERTHIER, 1993; TOMÁS; BRU; NADER-

MACÍAS, 2003). No presente trabalho, foi utilizado um método semi-quantitativo para a determinação das taxas de H_2O_2 produzidas pelos isolados de lactobacilos.

Foi observado que 98,6% dos isolados recuperados de mulheres saudáveis deste estudo produziram H_2O_2, sendo que a exceção foi um único representante da espécie *L. crispatus*. Estes resultados comparam-se às maiores concentrações encontradas por outros autores (59% a 96%) (ESCHENBACH et al., 1989; AL-MUSHRIF; JONES, 1998; ANTONIO; HAWES; HILLIER, 1999; PASCUAL et al., 2006; STRUS et al., 2006).

Antonio, Hawes e Hillier (1999) verificaram que H_2O_2 é comumente produzido por linhagens de *L. crispatus* e *L. jensenii* (95% e 94% das linhagens testadas, respectivamente) e que se trata de uma característica incomum dentre as linhagens de *L. iners* e *L. gasseri* (9% e 7% das linhagens testadas, respectivamente). Esses resultados indicam que, embora essas quatro espécies de microrganismos estejam filogeneticamente relacionadas, diferem entre si quanto à importância na ecologia microbiana da vagina humana (ENNAHAR; CAI; FUJITA, 2003).

Em contraposição aos dados obtidos por Antonio, Hawes e Hillier (1999), no presente trabalho, todos os sete isolados identificados como *L. gasseri* obtidos a partir do grupo de mulheres saudáveis foram capazes de produzir H_2O_2 ainda que em baixas concentrações (3-30 mg/L), quando comparado com as demais espécies isoladas do mesmo grupo de pacientes.

No presente estudo, 97,4% dos isolados identificados como *Lactobacillus* sp., provenientes de amostras vaginais de pacientes diagnosticadas com CVV, foram capazes de sintetizar H_2O_2. Mijac et al. (2006) também verificaram uma alta prevalência de lactobacilos produtores de H_2O_2 (77,0%), isolados de amostras vaginais de pacientes com CVV. Os presentes resultados encontram-se no limite superior de concentrações de H_2O_2 anteriormente relatados, especialmente no caso de dez isolados obtidos a partir do grupo de pacientes com CVV e identificados como *L. jensenii*, os quais produziram $\geq$ 30mg de H_2O_2/L. Tais achados e a ausência de diferença estatística entre a prevalência de lactobacilos vaginais produtores de H_2O_2 nos grupos de mulheres saudáveis e diagnosticadas com CVV,

sugerem fortemente que H_2O_2, *per si*, não protege contra infecções fúngicas. A ausência de efeito desta substância sobre o desenvolvimento de leveduras do gênero *Candida* pode estar correlacionada à capacidade que as leveduras possuem de sintetizar a enzima catalase, que degrada o H_2O_2 (RODIER et al., 1999).

Os dados obtidos aqui são apoiados por alguns estudos realizados *in vitro*, nos quais foi demonstrado que a produção de H_2O_2 por lactobacilos parece não ser o principal mecanismo na inibição direta de *Candida* (STRUS et al., 2005; KAEWSRICHAN; PEEYANANJARASSRI; KONGPRASERTKIT, 2006). Segundo Ström et al. (2002), diversos compostos antifúngicos (incluindo dipeptídeos cíclicos, ácido piroglutâmico e lactonas produzidos por espécies de *Lactobacillus*) e a modulação do sistema imune, desempenham um papel crucial na proteção do hospedeiro frente à CVV.

A depleção da população de lactobacilos produtores de H_2O_2 é inerente à VB (FREDRICKS; FIEDLER; MARRAZZO, 2005; MIJAC et al., 2006). Os achados deste estudo corroboram essas evidências e indicam que a presença daqueles microrganismos não está necessariamente associada à proteção contra a CVV.

A quantidade exata de H_2O_2 presente no epitélio vaginal é incerta, mas é provável que as concentrações desta substância sejam menores neste sítio anatômico quando comparados àqueles obtidos em cultivos de lactobacilos *in vitro*. Isto poderia estar relacionado ao baixo potencial de óxido-redução no trato vaginal, devido ao consumo de oxigênio por organismos presentes neste ecossistema (LARSEN, 1993; TOMÁS; BRU; NADER-MACÍAS, 2003). Apesar disso, é indiscutível a importância do H_2O_2 produzido pelas espécies de lactobacilos na manutenção de uma microbiota vaginal saudável, uma vez que o peróxido e diversas ROS geradas a partir dela, são letais a diversos microrganismos patogênicos, especialmente aqueles que produzem pequenas quantidades das enzimas catalase e peroxidase (AROUTCHEVA et al., 2001; KULLISAAR et al., 2002).

6.2 Caracterização de *Candida* spp. a partir das amostras vaginais obtidas

No grupo de pacientes saudáveis, dentre as 17 mulheres (de um grupo de 64; 26,6%) que estavam colonizadas por *Candida*, 52,4% dos isolados obtidos corresponderam à espécie *C. albicans* e 47,6% a *C.* não *albicans* (29,6% identificadas como *C. tropicalis* e 19,0% como *Candida* sp.) Além disso, em quatro das 17 (23,5%) mulheres que apresentavam amostras vaginais positivas para a levedura, foi encontrada colonização mista por espécies de *C.* não *albicans*.

De acordo com Kent (1991) e Sobel (1993), *C. albicans* corresponde entre 80% e 85% do total de leveduras do gênero *Candida* isoladas da microbiota vaginal de pacientes assintomáticas. Tais resultados contrastam com aqueles verificados no presente estudo, no qual isolados identificados como *C.* não-*albicans* apresentaram elevada prevalência. No entanto, Abu-Elteen, Abdul Malek e Abdul Wahid (1997) relataram a prevalência de *C. albicans* e de *C.* não-*albicans* em 60,7% e 39,3%, respectivamente, nas amostras vaginais obtidas de um grupo de mulheres da Jordânia, para as quais *C. glabrata* e *C. parapsilosis* representaram 20,6% e 14,7% do total de leveduras isoladas, respectivamente. Bauters et al. (2002) também obtiveram resultados semelhantes quanto às taxas de isolamento desses microrganismos em mulheres assintomáticas: *C. albicans* (68,3%), seguido de *C. glabrata* (16,3%) e *C. parapsilosis* (8,9%).

Neste estudo, a prevalência de *C. albicans* em relação ao total de 64 mulheres saudáveis foi de 17,2% (11/64). Estudos indicam que 10% a 55% das mulheres saudáveis, completamente assintomáticas, exibem cultura positiva para *C. albicans* (LINDNER et al., 1978; BARTLETT; POLK, 1984; SOBEL, 1993). O isolamento dessa e de outras espécies de *Candida*, na ausência de sintomatologia da infecção, indica que esses microrganismos são comensais no epitélio vaginal ou pode estar relacionado a tratamento prévio inadequado, uso de medicação antifúngica insuficiente, resistência do microrganismo a fármacos ou ainda recolonização (GIRALDO et al., 2000).

Embora a colonização vaginal seja um pré-requisito para o desenvolvimento da CVV (LEON et al., 2002), a erradicação completa de *Candida* da microbiota vaginal é

improvável (SOBEL et al., 1998).

A presença de *Candida* sp. em mulheres assintomáticas tem implicações importantes na conduta terapêutica a ser adotada em possíveis episódios de infecções vaginais, pois há possibilidade de uma linhagem colonizadora resistente a um determinado medicamento tornar-se predominante na microbiota vaginal em pacientes imunossuprimidas (MATHEMA et al., 2001). Além disso, a difusão desta linhagem através de contato sexual é uma possibilidade a ser considerada (BARCHESI et al., 1995).

No grupo de pacientes diagnosticadas com CVV, a maior parte dos isolados de leveduras (89,2%) foi identificada como *C. albicans*, seguida de espécies de *C.* não-*albicans* (Figura 33). Prevalência semelhante (89,5%) de *C. albicans* em amostras vaginais obtidas de pacientes com CVV da região sul da China entre 2003 e 2006, foi observada por Fan, Liu e Li (2008). Grande freqüência de isolamento de *C. albicans* (superior a 84%) também foi verificada por Paulitsch et al. (2006) que analisaram dados referentes ao monitoramento do microrganismo durante um período de cinco anos em pacientes da Áustria com a infecção. No entanto, diversos estudos têm relatado uma maior prevalência (superior a 50,0%) de espécies de *C.* não-*albicans* em pacientes diagnosticadas com CVV em diversas partes do mundo (RIVERA-SÁNCHEZ; FLORES-PAZ; ARRIAGA-ALBA, 2006; CETIN et al., 2007; MOHANTY et al., 2007).

O Chromagar® Candida, utilizado no presente trabalho, é um meio de cultura seletivo e diferencial para leveduras do gênero *Candida*, pois apresenta em sua composição uma mistura cromogênica, que ao reagir com enzimas secretadas pelos microrganismos alvos, é capaz de identificá-los de maneira presuntiva, através do desenvolvimento de colônias com diferentes pigmentações, características de cada espécie (WILLINGER; MANAFI, 1999). Na rotina de laboratórios da área de micologia médica, o meio de cultura ASD é o mais utilizado para o isolamento de fungos patogênicos. No entanto, a identificação de leveduras por meio de características morfológicas das colônias nesse meio de cultura é inviável, dificultando a detecção de culturas mistas. Desta maneira, a utilização do

Chromagar® Candida, pode ter contribuído para uma melhor detecção de diferentes espécies de *Candida* no presente estudo.

Todos os isolados de leveduras que foram identificados bioquimicamente como *C. albicans*, obtidos a partir dos grupos de pacientes saudáveis e diagnosticadas com CVV, apresentaram 100% de concordância em relação aos resultados presuntivos obtidos com o Chromagar® Candida (colônias com pigmentação verde). No entanto, no caso de espécies de *C.* não-*albicans*, observou-se discrepância entre a identificação presuntiva dos isolados obtidos através da pigmentação das colônias e confirmação por provas bioquímicas para *C. tropicalis*, as quais apresentaram coloração roxa no Chromagar® Candida, enquanto que de acordo com o fabricante do meio de cultura, a pigmentação típica das colônias do microrganismo seria azul metálica. Esses resultados estão em contraste com aqueles obtidos no estudo de Odds e Bernaerts (1994), segundo o qual as taxas de especificidade e sensibilidade do meio cromogênico na identificação presuntiva de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. krusei* excederam 99% em relação às três espécies. Outros estudos publicados também relataram a alta sensibilidade e especificidade do meio Chromagar® Candida no isolamento e identificação de leveduras presentes em amostras clínicas (PFALLER; HOUSTON; COFFMAN, 1996; FREYDIÈRE; BUCHAILLE; GILLE, 1997; HOSPENTHAL et al., 2006), embora somente provas bioquímicas permitam a identificação confirmatória dessas leveduras.

6.3 Tratamento de CVV com fluconazol e microrganismos probióticos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14: estudo duplo-cego, placebo-controlado

Com base na teoria de que CVV é resultado, ou causa, do rompimento das condições que garantem a integridade da microbiota vaginal, várias tentativas para prevenir a infecção utilizando-se lactobacilos já foram relatadas (HILTON; RINDOS; ISENBERG, 1995; WILLIAMS et al., 2001; PIROTTA et al., 2004), apresentando resultados controversos.

Hilton, Rindos e Isenberg (1992) realizaram um estudo randomizado controlado, no qual pacientes com CVV recorrente que consumiram iogurte contendo *L. acidophilus* durante seis meses, apresentaram um menor número de episódios da infecção, quando comparado àquele determinado durante os seis meses em que restringiram totalmente o consumo de iogurte. Resultado promissor também foi relatado por Williams et al. (2001) que verificaram que a utilização intravaginal de *L. acidophilus* ou de clotrimazol, foi capaz de prevenir o desenvolvimento de CVV em pacientes HIV-positivas, em comparação com a utilização de placebo. No entanto, Pirotta et al. (2004) relatou que a administração oral ou vaginal de BAL não foi efetiva na prevenção de CVV pós-tratamento com diferentes agentes antimicrobianos, em comparação ao grupo de pacientes que utilizou placebo.

De acordo com Falagas, Betsi e Athanasiou (2006) uma revisão cuidadosa de estudos investigando o papel de probióticos na prevenção de CVV sugere que a maior parte deles apresenta importantes falhas metodológicas. No caso específico do estudo conduzido por Hilton, Rindos e Isenberg (1992), por exemplo, houve a avaliação de pequeno número de pacientes e a falta de informações importantes, como a confirmação por método de cultura de episódios recorrentes da infecção anteriores à participação no teste clínico proposto pelos pesquisadores.

No presente estudo, os microrganismos probióticos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 foram empregados como co-adjuvantes no tratamento de pacientes diagnosticadas com CVV, as quais também receberam dose única de fluconazol (150mg). Foi observado que a suplementação diária com cápsulas para uso oral durante quatro semanas, contendo as linhagens probióticas resultou em taxa de cura superior da infecção (89,7%)

(determinada clínica e microbiologicamente), quando comparada àquela obtida com a utilização de medicamento antifúngico tradicional e cápsulas de placebo (65,4%) (p<0,05) (Tabela 14).

De acordo com Vacheva-Dobrevski et al. (2004), 59,7% das pacientes diagnosticadas com CVV que foram tratadas com dose única de fluconazol (150mg) apresentaram cura para a condição, semelhante àquela verificada no presente estudo para o grupo de pacientes que receberam fluconazol e placebo. No entanto, maiores taxas de para a infecção foram determinadas no estudo de Mikamo et al. (1998). Aqueles pesquisadores acompanharam mulheres diagnosticadas com CVV e randomicamente tratadas com dose única de fluconazol (150mg) (n=50), itraconazol (administração oral, 200mg, durante três dias) (n=50) ou clotrimazol (uso intravaginal, 100mg, durante seis dias) e observaram que as taxas de cura para a infecção, determinadas entre 5 a 15 dias foram de 80,0%, 92,0% e 72,0% (respectivamente), em comparação a 76,0%, 88,0% e 58,0% (respectivamente) determinadas após 30 a 60 dias do início do tratamento.

Este é, portanto, o primeiro relato da capacidade de microrganismos comprovadamente probióticos aumentar a eficácia de um agente antifúngico no tratamento de CVV. O único estudo previamente descrito na literatura científica que relatava o efeito benéfico da utilização de lactobacilos como agentes terapêuticos para CVV, foi publicado por Hilton, Rindos e Isenberg (1995), no qual mulheres com sintomas da infecção utilizaram supositórios vaginais contendo *Lactobacillus* GG e apresentaram melhora clínica dentro de uma semana. Contudo, de acordo com Jeavons (2003), a interpretação do estudo conduzido por Hilton, Rindos e Isenberg (1995) deve ser cuidadosa, uma vez que apenas cinco pacientes apresentaram amostras vaginais positivas para a infecção na etapa de pré-tratamento, o grupo amostral avaliado foi pequeno e não foi incluído um grupo controle. Além disso, de acordo com os critérios propostos pela FAO/WHO (2002) foram utilizados microrganismos que não são comprovadamente probióticos e, finalmente, há pouca evidência de que lactobacilos *per si* possam curar CVV.

Os mecanismos envolvidos na maior taxa de cura de CVV observados no presente

estudo com a administração de probiótico não foram elucidados, não sendo possível avaliar se houve influência de metabólitos ativamente produzidos pelas bactérias láticas no aumento da taxa de cura com o probiótico *versus* placebo.

As razões que poderiam explicar a maior taxa de cura no grupo de mulheres diagnosticadas com CVV e que recebeu suplementação com as culturas probióticas, poderiam envolver: (i) modulação imune do intestino delgado, grosso e da vagina (LOREA BAROJA et al., 2007), (ii) inibição da multiplicação de *C. albicans* na microbiota vaginal (REID; KIM; KÖHLER, 2006) e (iii) ascensão reduzida de leveduras do reto para o trato vaginal (REID et al., 2003).

De acordo com um estudo publicado por Corić et al. (2006), 27,0% das pacientes tratadas com dose única de fluconazol (150mg) apresentaram amostras vaginais positivas para *Candida* spp., determinado após 14 dias do início do tratamento, em comparação com 31,0%, observado com a utilização de 200mg de clotrimazol intravaginal administrado durante três dias consecutivos. O-Prasertsawat e Bourlert (1995), avalariam um grupo de mulheres diagnosticadas com CVV que foram randomicamente tratadas com dose única de fluconazol (150mg) ou itraconazol (100mg, supositório vaginal, duas vezes ao dia) e observaram que as taxas de cura micológica determinadas após quatro semanas foram de 60,4% e 66,0%, respectivamente. Resultado semelhante foi obtido em nosso estudo, no grupo de pacientes tratadas com dose única de fluconazol e placebo (61,5%), também determinado após quatro semanas de tratamento, pelo método de cultura. Por outro lado, a taxa de cura micológica no grupo de pacientes tratadas com fluconazol e suplementadas com cápsulas do probiótico foi de 89,7% pelo método de cultura. Este fato, aliado à remissão dos sinais e sintomas típicos da infecção, também indicaram o sucesso na cura de CVV pela suplementação com microrganismos probióticos na maior parte dos indivíduos.

Neste trabalho, dentre as seis pacientes diagnosticadas com CVV causada por *C.* não-*albicans*, as taxas de cura não diferiram entre os grupos probiótico e placebo (p>0,05). Também não houve diferença estatística nas taxas de cura da infecção quando foram avaliados subgrupos de pacientes que auto-afirmaram sofrer de CVV recorrente. Esses

dados sugerem que mais estudos são necessários para avaliar o papel dos microrganismos probióticos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 no tratamento de pacientes acometidas por CVV devido a espécies de *C.* não-*albicans*, bem como frente àquelas que não respondem adequadamente à terapia medicamentosa tradicional.

É preciso um monitoramento cuidadoso para avaliar possíveis efeitos adversos de microrganismos probióticos, especialmente se são realizados procedimentos invasivos, ou no caso de pacientes que apresentem grande risco de bacteremia, incluindo indivíduos imunocomprometidos (BOYLE; ROBINS-BROWNE; TANG, 2006; BESSELINK et al., 2008; MADSEN, 2008). No presente estudo, somente pacientes imunocompetentes foram incluídas e um pequeno número de efeitos adversos foi relatado, embora os mesmos não pudessem ser definitivamente associados com a utilização dos microrganismos probióticos.

Os resultados positivos obtidos neste trabalho com a co-administração de microrganismos probióticos e fluconazol para o tratamento de CVV, encorajam a realização de projetos correlatos incluindo, por exemplo, combinação entre probióticos e outros compostos azólicos, diferentes formas e regimes de administração de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 e seguimento de pacientes por um período mais prolongado, para avaliação de recorrências.

6.4 Tratamento de VB com tinidazol e microrganismos probióticos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14: estudo duplo-cego, placebo-controlado

De acordo com Marrazzo et al. (2006), dada a elevada prevalência de VB, há uma necessidade urgente para o desenvolvimento de tratamentos efetivos para esta condição e prevenção de recorrências. Embora muitas pacientes não apresentem corrimento e odor característicos da infecção (KLEBANOFF et al., 2004), VB é responsável por complicações ginecológicas e obstétricas, além de apresentar um efeito adverso na qualidade de vida das pacientes (KARASZ; ANDERSON, 2003; LARSSON; FORUM, 2005). Assim, muitas mulheres procuram tratamentos alternativos para o tratamento e prevenção da condição (NERI; RABINDERSON; KAPLAN, 1994; BOSKEY, 2005; PATEL et al., 2008).

De acordo com um estudo de revisão publicado por Larsson e Forsum (2005) as taxas de cura de VB em mulheres tratadas com metronidazol por via oral ou tópica e clindamicina (uso tópico), determinadas após quatro semanas do inicio do tratamento, não excederam 60% a 70%.

Um derivado nitroimidazólico de segunda geração, o tinidazol, foi utilizado neste estudo ao invés do agente clássico metronidazol, por proporcionar melhor adesão ao tratamento com a utilização de dose única, atingir altas concentrações no sangue e nos tecidos, ser mais bem tolerado, apresentar menos efeitos colaterais, toxicidade reduzida e uma meia-vida mais prolongada (BAGNOLI, 1994). Além disso, o tinidazol é mais lipossolúvel, penetrando nas membranas celulares de maneira mais efetiva (JOKIPII et al., 1997).

Os resultados do presente trabalho, com a utilização de dose única de tinidazol (2g) e suplementação com cápsulas contendo os microrganismos probióticos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14, indicaram uma taxa de cura para VB mais elevada (87,5%), em comparação àquela verificada em pacientes que foram suplementadas com placebo (50,0%) ($p<0,05$), fornecendo evidência científica para a utilização de microrganismos certificadamente probióticos como terapia complementar no tratamento da infecção.

Embora a taxa de cura observada no grupo de pacientes do presente estudo que

recebeu tinidazol e placebo tenha sido relativamente baixa (50,0%), ela foi superior à observada por Livengood et al. (2007). Aqueles autores avaliaram um grupo de 235 pacientes e obtiveram uma taxa de cura de 36,8% com a utilização de 1g de tinidazol diariamente por cinco dias e de 27,4% com 2g de tinidazol diariamente por dois dias, quando comparada a apenas 5,1% observada com a utilização de placebo (p<0,001). Além disso, Livengood et al. (2007) constataram que a incidência de CVV pós-tratamento nas pacientes que utilizaram os dois regimes de tinidazol foi pequena, 5,2% para as pacientes tratadas com 1g de tinidazol e 2,6% para as pacientes tratadas com 2g de tinidazol. Essas taxas foram inferiores àquela verificada no presente estudo para as pacientes que fizeram uso de tinidazol e placebo (12,5%), mas foi similar àquela verificada para o grupo de mulheres tratadas com tinidazol e probiótico (3,1%).

A taxa de cura de 87,5% obtida com a utilização de tinidazol e probiótico no presente estudo, está de acordo com um estudo prévio publicado por Anukam et al. (2006a). Aqueles autores realizaram um estudo duplo-cego, placebo-controlado e observaram que a combinação de metronidazol (500mg, duas vezes ao dia, durante sete dias) e uso diário de cápsulas contendo *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 foi mais efetiva no tratamento de VB do que aquela a utilização de metronidazol e placebo (taxas de cura de 88,0% e 40,0%, respectivamente, obtidas após 30 dias do início da terapia).

Sob condições normais, a população de lactobacilos vaginais endógenos da paciente é restabelecida após o tratamento com o agente antimicrobiano, conferindo proteção frente à infecção. De acordo com Anukam et al. (2006), a utilização adicional de probióticos almeja otimizar esse processo, levando à melhora do tratamento da condição e cura.

Em outro estudo realizado por Anukam e colaboradores (2006b), foi determinada a eficácia da utilização por cinco dias de cápsulas para uso vaginal contendo *L. rhamnosus* e *L. reuteri* RC-14 *versus* metronidazol gel vaginal (0,75%). As taxas de cura da infecção obtidas por aqueles autores foram de 80,0% *versus* 45,0% (observada no 6º dia), 85,0% *versus* 45,0% (15º dia) e 90,0% *versus* 55,0% (30º dia), respectivamente para o probiótico e

medicamento tradicional.

Larsson e Forsum (2005) afirmaram que os critérios de diagnóstico e de determinação da taxa de cura de VB variam consideravelmente na literatura. Além disso, há diferenças nos períodos considerados para reavaliação (de sete a 30 dias). Segundo os mesmos autores, é recomendável que a avaliação seja feita entre 21 e 30 dias após o início do tratamento, pois sete dias é um período muito curto.

Barrons e Tassone (2008) revisaram diversos ensaios clínicos que empregaram lactobacilos no tratamento de VB e observaram que em alguns deles, não houve evidência científica suficiente para recomendação de seu uso para tal finalidade. Tal afirmação foi particularmente válida, entre outros, para os trabalhos conduzidos por Hallén, Jarstrand e Påhlson (1992) e Fredricsson et al. (1989). Além dos pesquisadores terem observado que a utilização de *L. acidophilus* por via vaginal não foi efetiva quando comparada ao uso de placebo (HALLÉN; JARSTRAND; PÅHLSON, 1992) ou metronidazol (FREDRICSSON et al., 1989), foram detectados problemas quanto à escassa documentação de efeitos linhagem-específicos e ausência da determinação da viabilidade dos microrganismos empregados, bem como de relatos sobre a ocorrência de possíveis efeitos colaterais.

Por outro lado, Delia et al. (2006) observaram que a utilização de lactobacilos por via oral e/ou supositórios vaginais foi capaz de reduzir os sintomas de VB em um grupo de mulheres avaliadas, sendo que a combinação entre as duas vias de administração resultou em um efeito benéfico a longo prazo, observado três meses após o final do tratamento. Além disso, Larsson et al. (2008), realizaram um estudo duplo-cego, placebo-controlado no qual observaram que o uso de clindamicina tópica seguida da inserção vaginal de cápsulas contendo *L. gasseri* Lba EB01 - DSM 14869 e *L. rhamnosus* Lbp PB01 – DSM 14870 liofilizados, diariamente por um período de 10 dias durante três ciclos menstruais, embora não tenha aumentando as taxas de cura de VB após 30 dias, prolongou o tempo para a recidiva da infecção.

No presente estudo, o fato de apenas uma paciente que fez uso de tinidazol e dos microrganismos probióticos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 ter apresentado efeito

adverso (um episódio de dor de cabeça persistente, não necessariamente relacionado à utilização das BAL), é indicativo de boa tolerância à terapia prescrita, também relatada no trabalho de Anukam et al. (2006a).

As linhagens de microrganismos que têm como objetivo aplicação como probióticos devem ser identificadas com o uso de métodos moleculares de referência e receber uma designação clara e concisa, a fim de permitir a médicos e consumidores rastrear publicações associadas com uma determinada linhagem e verificar que a mesma apresenta, realmente, efeito(s) probiótico(s) (FAO/WHO, 2002; REID et al., 2003). Uma vez que o efeito de uma bactéria é específico para cada cepa, não podendo ser extrapolado para outras cepas da mesma espécie (GUARNER; MALAGELADA, 2003) e diversos estudos relatados anteriormente utilizaram linhagens de microrganismos que não receberam uma designação específica, é muito difícil estabelecer comparações criteriosas com dados da literatura.

No presente estudo, 25,0% e 21,9% das pacientes alocadas nos grupos probióticos e placebo, respectivamente, auto-relataram sofrerem de VB recorrente. Embora este não seja um método preciso para identificar pacientes com recorrência nesses casos, foi observada maior taxa de cura da infecção no grupo probiótico (75,0%), comparado ao grupo placebo (57,1%). Geralmente, pacientes com VB recorrente apresentam dificuldade de cura e requerem uso prolongado (10 a 14 dias) de medicamentos como metronidazol ou clindamicina (CDC, 2002). No presente estudo, a taxa de cura foi observada após um mês de tratamento, conforme recomendado por Larsson (1995) e não houve reavaliação após três meses do início da terapia, não sendo possível concluir a respeito da prevenção de recorrências.

Para entender o possível papel dos lactobacilos no tratamento de BV, Saunders et al. (2007) realizaram experimentos *in vitro*, através dos quais demonstraram que *L. crispatus* 33820, *L. iners AB-1*, *L. rhamnosus* GR-1 e especialmente *L. reuteri* RC-14 desestruturaram biofilmes formados por *G. vaginalis*. Este efeito não foi devido ao pH, que permaneceu entre 4,7 e 5,1 em todos os experimentos, nem ao H_2O_2 que é produzido em pequenas quantidades por estas linhagens (com exceção de *L. crispatus* 33820). Os autores

sugeriram que substâncias tensoativas produzidas por *L. reuteri* RC-14 (VELRAEDS et al., 1996), poderiam ter exercido um papel importante no efeito observado, enquanto que a produção de bacteriocinas e de moléculas sinalizadoras (REID, 2001; LAUGHTON et al., 2006) poderiam ter afetado a viabilidade do patógeno.

Os resultados deste estudo demonstraram que a utilização conjunta de dose única de tinidazol (2g) e de cápsulas administradas oralmente contendo os microrganismos probióticos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 aumentaram a taxa de cura de pacientes brasileiras diagnosticadas com VB. Esses achados indicam o potencial da combinação de medicamentos com culturas probióticas, a fim de melhorar o tratamento desta infecção, contribuindo para prolongar a vida útil de fármacos cuja eficácia pode ser comprometida devido à seleção de microrganismos resistentes. Além disso, a suplementação com probióticos pode reduzir o período de tratamento de pacientes que necessitem de terapia tradicional prolongada.

6.5 Pesquisa de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 em amostras vaginais

Ao final de 28 dias de tratamento, a determinação da presença de *L. rhamnosus* GR-1 e/ou *L. reuteri* RC-14 nas amostras vaginais obtidas das pacientes que utilizaram fluconazol e cápsulas do probiótico, revelou que 44,8% (13/29) delas exibiram amostras positivas para o(s) microrganismo(s). Paralelamente, *L. rhamnosus* GR-1 e/ou *L. reuteri* RC-14 foram detectados em amostras vaginais provenientes de 12,5% (4/32) das mulheres diagnosticadas com VB e tratadas com tinidazol e cápsulas do probiótico. Esses resultados demonstraram que esses microrganismos administrados oralmente podem chegar ao trato vaginal, provavelmente através do ânus e tecido perianal, da mesma maneira como fazem os patógenos, apesar da prática de hábitos de higiene (KRIEGER, 2002).

A capacidade de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 de colonizar a vagina parece envolver ácidos lipoteicóicos, proteínas de ligação, interações eletrostáticas e hidrofóbicas, camada protéica S e/ou receptores mais específicos (CHAN et al., 1985; REID et al., 1992; RAZ; STAMM, 1993; AVALL-JÄÄSKELAINE; PALVA, 2005). Esta habilidade é importante no sentido de contribuir para a formação de um biofilme microbiano no trato vaginal para a inibição da adesão e multiplicação de microrganismos patogênicos e depleção de nutrientes disponíveis (REID; BURTON, 2002).

Reid et al. (2001a) conduziram um trabalho no qual foi administrada suspensão para uso oral contendo os microrganismos probióticos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 (duas vezes ao dia, durante um período de 14 dias) a um grupo de dez pacientes saudáveis (assintomáticas) que apresentavam uma história recente de infecção urogenital. Aqueles autores observaram que as BAL probióticas foram detectadas em amostras vaginais analisadas uma semana após o início da terapia e persistiram por até 12 semanas em algumas pacientes.

No presente estudo foi utilizado um conjunto de iniciadores para detecção de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 que não permitiram diferenciá-los. Contudo, alguns estudos têm demonstrado que essas linhagens diferem entre si quanto à capacidade de colonizar o trato vaginal de pacientes. Cadieux et al. (2002) avaliaram um grupo de 15

mulheres saudáveis que receberam cápsulas de gelatina para inserção vaginal com *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 liofilizados e observaram que *L. rhamnosus* GR-1 foi mais prevalente nas amostras clínicas do que *L. reuteri* RC-14, conforme resultados de análise por RAPD de colônias sugestivas do microrganismo obtidas em meio de cultura com agentes seletivos.

No trabalho de Burton, Cadieux e Reid (2003), dez mulheres saudáveis utilizaram cápsulas para inserção vaginal diária durante três dias, contendo *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14. Através da utilização da técnica de RAPD, os autores observaram que *L. rhamnosus* GR-1 foi recuperado a partir de amostras vaginais colhidas sete, 14 e 21 dias após o início da terapia em 80,0%, 60,0% e 20,0% das mulheres participantes (respectivamente). Por sua vez, *L. reuteri* RC-14 foi detectado em apenas 40,0% e 20,0% das amostras obtidas nos tempos sete e 14 dias, não tendo sido detectado no tempo de 21 dias.

A observação de que cada microrganismo coloniza particularmente bem ou não uma determinada paciente, enfatiza a importância da combinação de mais de um microrganismo em preparações probióticas, para obtenção de propriedades antimicrobianas complementares (REID et al., 2001a).

6.6 Avaliação do efeito *in vitro* de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 na modulação de infecção vaginal por *C. albicans*

As células epiteliais vaginais desempenham um papel central na mediação da resposta imune frente a microrganismos patogênicos, incluindo a apresentação de antígenos, atividade antimicrobiana e produção de citocinas (HEDGES et al., 1994; HEDGES; AGACE; SVANBORG, 1995; WIRA; ROSSOLI, 1995; WEINBERG; KRISANAPRAKORNKIT; DALE, 1998; BAROUSSE et al., 2005).

De acordo com este estudo, as células VK2/E6E7 secretaram constitutivamente seis citocinas: IL-6, IL-8, IL-1α, IP-10, RANTES e VEGF. Em outros estudos também foi avaliada esta mesma linhagem celular e foi observado que houve secreção espontânea de IL-8 (FICHOROVA; ANDERSON, 1999; STEELE; FIDEL, 2002) e IL-6 (STEELE; FIDEL, 2002), além de M-CSF (fator estimulante de colônia de macrófago) (FICHOROVA; ANDERSON, 1999) e IL-1α, IL-10 e IL-12 (STEELE; FIDEL, 2002).

Na figura 36 é possível observar que TNF-α foi capaz de aumentar a produção de IL-8 e IP-10 (T=6h e T=12h), IL-6 (T=6h) e RANTES (T=12h). Não houve aumento da produção de IL1-α na presença de TNF-α (T=6h e T=12h) e o mesmo foi observado para VEGF, uma citocina conhecida por regular a angiogênese, aumentar a permeabilidade microvascular e recrutar monócitos e macrófagos (BREEN, 2007). Esses dados estão de acordo com um estudo sobre células VK2/E6E7 estimuladas com TNF-α publicado por Steele e Fidel (2002), no qual foi observado um aumento na produção de IL-6. Esta citocina (IL-6) apresenta função quimiotática, importante no recrutamento de células inflamatórias e é capaz de modular a função de diversos tipos celulares (BASU et al., 2008). Steele e Fidel (2002) observaram também uma maior produção de IL-1α, mas os intervalos de tempo avaliados foram distintos daqueles estudados aqui. Fichorova e Anderson (1999) estimularam células VK2/E6E7 com 0,1 µg/mL de TNF-α e também verificaram aumentos variáveis nas produções de IL-6, IL-8, e RANTES, que é um potente fator de quimioatração para monócitos e células T (CARUSO, 1964).

Neste estudo foi demonstrado que *C. albicans* estimulou a produção de citocinas pró-inflamatórias IL-8 e IL-1α pelas células VK2/E6E7 (Figura 36). Tal achado apóia dados prévios que demonstraram que citocinas da família IL-1 tem um papel fundamental na resposta imune frente à infecção provocada pela levedura (KULLBERG; VAN'T WOUT; VAN FURTH, 1990; STEELE; FIDEL, 2002). Embora Steele e Fidel (2002) tenham utilizado o mesmo modelo *in vitro* de CV e demonstrado uma elevação na produção de IL-1α secretada pelas células VK2/E6E7 infectadas com *C. albicans*, os intervalos de tempo analisados por aqueles autores foram diferentes (24h e 96h) comparados aos do presente estudo (6h e 12h). Steele e Fidel (2002) verificaram pequena produção ou ausência de secreção de IL-8 pelas células VK2/E6E7 infectadas com *Candida*, enquanto que no presente estudo foi observado aumento da produção de IL-8 na presença da levedura no intervalo de tempo correspondente a T=12h (Figura 36).

A citocina IL-8 é considerada importante no recrutamento de neutrófilos para áreas de inflamação e/ou infecção *in vivo* (DJEU et al., 1990; BAGGIOLINI; CLARK-LEWIS, 1992; ROEBUCK, 1999; SCHALLER; MAILHAMMAR; KORTINIG, 2002) e sua mensuração é útil como marcador biológico de respostas antimicrobianas em mucosas, incluindo o trato genital feminino (SPEAR et al., 2008).

No presente estudo, SLC de *L. reuteri* RC-14 combinado com SLC de *L. rhamnosus* GR-1 causaram aumento da produção de ambos IL-8 e IP-10 por células VK2/E6E7 infectadas com *C. albicans* (Figura 37). Os efeitos observados podem estar relacionados a algum tipo de composto solúvel ativamente produzido pelas linhagens de lactobacilos, sendo que os mecanismos exatos permanecem sem elucidação. Além disso, células ou SLC de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 (sozinhos ou combinados) foram capazes de elevar a produção de IL-8 quando adicionados a preparações contendo apenas células VK2/E6E7. Por outro lado, apenas *L. reuteri* RC-14 estimulou a produção de IP-10 (Figura 39). IP-10 é uma citocina com propriedade quimiotática frente a linfócitos Th1 e células *natural killer* (NK) e é provável que desempenhe um papel importante na defesa do hospedeiro contra infecção causada por

Candida (SHIRAKI et al., 2008).

Os microrganismos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 suspendidos em leite desnatado e administrados por via oral a um grupo de cinco mulheres (duas vezes ao dia, durante 14 dias), não induziram resposta imune ou inflamatória sistêmica, avaliada pela determinação de níveis séricos de IL-2, IL-4, IL-6, IFN-γ, IgA, IgG e IgM (GARDINER et al., 2002a).

Neste trabalho, em cultura de células de VK2/E6E7, *L. reuteri* RC-14 (sozinho) e em combinação com *L. rhamnosus* GR-1 foram capazes de inibir a multiplicação de *C. albicans* no tempo T=24h (Figura 40), sugerindo que a presença da levedura era necessária para ativar (ou aumentar) a produção de compostos anti-*Candida* pelas linhagens de lactobacilos, uma vez que esse efeito não foi observado nos poços nos quais foram adicionados SLC de *L. reuteri* RC-14 e *L. rhamnosus* GR-1 (sozinhos ou combinados) (Figura 40).

Owen e Clenney (2004) demonstraram a atividade de *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 na inibição da multiplicação de *C. albicans* pelo método de sobrecamada em ágar. Além disso, Köhler e Reid (2005) relataram que *L. rhamnosus* GR-1 foi capaz de inibir a formação de biofilme por *C. albicans* devido à regulação de genes envolvidos na filamentação, um fator de virulência importante para a levedura (KÖHLER; REID, 2005).

Outras linhagens de lactobacilos, incluindo *Lactobacillus rhamnosus* L60 (PASCUAL et al., 2008) e *Lactobacillus jensenii* (5L08) (KAEWSRICHAN; PEEYANANJARASSRI; KONGPRASERTKIT, 2006), também foram selecionadas como microrganismos com potencial probiótico para serem utilizados no trato urogenital, devido à capacidade de auto-agregação, aderência a células epiteliais vaginais e co-agregação com *C. albicans*, além de inibirem a multiplicação de leveduras através da produção de H_2O_2 e compostos do tipo bacteriocina.

No presente estudo com as linhagens probióticas, *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 em um modelo *in vitro* para infecção vaginal por *C. albicans*, dentre as seis citocinas

testadas (IL-6, IL-8, IL-1α, IP-10, RANTES e VEGF), a produção de IL-8 e/ou IP-10 foi aumentada pelo SLC de ambos os microrganismos. *In vivo*, este efeito poderia contribuir para que células do sistema imune fossem atraídas para o local da infecção auxiliando na resolução da mesma, embora não seja possível afirmar exatamente quais os mecanismos envolvidos nos efeitos clínicos observados em nosso estudo.

7. CONCLUSÕES

• Foi encontrado pequeno número de espécies de *Lactobacillus* predominantes na microbiota vaginal das pacientes saudáveis (*L. crispatus* e *L. iners*), semelhantes àquelas previamente determinadas para mulheres com dieta e localização geográfica notadamente distintas.

• A composição da microbiota vaginal de lactobacilos das pacientes saudáveis e diagnosticadas com CVV apresentou similaridades, enquanto que no grupo de pacientes com VB foi determinado um perfil distinto de colonização.

• Quando os resultados obtidos com a técnica de PCR-ARDRA e PCR-DGGE foram comparados entre si, foi observado que ambas apresentaram limitações, evidenciando a importância do emprego de diferentes metodologias para avaliação adequada das espécies de lactobacilos da microbiota vaginal.

• A presença de lactobacilos produtores de H_2O_2, isoladamente, não implicou proteção contra CVV, enquanto que a ausência desses microrganismos pode ser um fator contribuinte para VB.

• Foi observada maior prevalência de isolados leveduriformes identificados como *C.* não-*albicans* no grupo de pacientes saudáveis (47,6%), em comparação àquela determinada no grupo de pacientes com CVV (10,8%).

• *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 utilizados por via oral foram capazes de colonizar a microbiota vaginal de pacientes diagnosticadas com CVV e VB.

• A utilização de dose única de fluconazol (150mg) e suplementação diária com cápsulas para ingestão oral contendo os microrganismos probióticos *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 no tratamento de pacientes com CVV, resultou em taxa de cura mais elevada (89,7%) para a infecção, determinada ao final de quatro semanas de tratamento, em comparação àquela verificada no grupo de mulheres que receberam fluconazol (150mg) e cápsulas de placebo (65,4%).

• O emprego de dose única de tinidazol (2g) e suplementação diária com cápsulas para ingestão oral contendo *L. rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 no tratamento de pacientes com VB, resultou em taxa de cura mais elevada (87,5%) para a infecção, determinada ao final de quatro semanas de tratamento, em comparação àquela observada no grupo de mulheres que receberam tinidazol (2g) e cápsulas de placebo (50,0%).

• No modelo *in vitro* de infecção vaginal por *C. albicans*, foi verificada inibição da população da levedura pela cultura de *L. rhamnosus* RC-14 (isoladamente) e na presença *L. reuteri* RC-14. Além disso, SLC desses microrganismos aumentaram a secreção de IL-8 e/ou IP-10 pelas células VK2/E6E7. Também foi observada a produção de grandes quantidades de IL-1α e quantidades menores de IL-8 pelas células VK2/E6E7 frente à *C. albicans*, indicando a importância das células epiteliais vaginais e de lactobacilos na mediação da resposta imune frente à levedura.

• O potencial clínico da utilização de microrganismos probióticos co-administrados com medicamentos antimicrobianos tradicionais, demonstrado neste estudo, pode trazer benefícios reais no tratamento de infecções vaginais, embora mais estudos sejam necessários para esclarecer os exatos mecanismos envolvidos.

8. REFERÊNCIAS*

* As referências foram apresentadas segundo as normas adotadas pelo Departamento Técnico do Sistema Integrado de Bibliotecas (DT/SIBI) atendendo à solicitação das Bibliotecas da Universidade de São Paulo.

ABU-ELTEEN, K. H.; ABDUL MALEK, A. M.; ABDUL WAHID, N. A. Prevalence and susceptibility of vaginal yeast isolates in Jordan. **Mycoses**, v. 40, p. 179-185, 1997.

ADAMS, M. R.; MARTEAU, P. On the safety of lactic acid bacteria from food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 27, p. 263-264, 1995.

ALLSWORTH, J. E.; PEIPERT, J. F. Prevalence of bacterial vaginosis: 2001-2004 National Health and Nutrition Examination Survey Data. **Obstetrics and Gynecology**, v. 109, p. 114-120, 2007.

AL-MUSHRIF, S.; JONES, B. M. A study on the prevalence of hydrogen peroxide generating lactobacilli in bacterial vaginosis: the determination of H_2O_2 concentrations generated, *in vitro*, by isolated strains and the levels found in vaginal secretions of women with and without infection. **Obstetrics and Gynecology**, v. 18, p. 63-67, 1998.

AMITAL, H.; GILBURD, B.; SHOENFELD, Y. Intelligent nutrition: health-promoting mechanisms of probiotics. **Israel Medical Association Journal**, v. 5, p. 812-813, 2003. [Resumo].

AMSEL, R.; TOTTEN, P. A.; SPIEGEL, C. A.; CHEN, K. C.; ESCHENBACH, D.; HOLMES, K. K. Nonspecific vaginits. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations. **American Journal of Medicine**, v. 74, p. 14-22, 1983.

ANDREU, A.; STAPLETON, A. E. ; FENNELL, C. L.; HILLIER, S. L.; STAMM, W. E. Hemagglutination, adherence and surface properties of vaginal *Lactobacillus* species. **Journal of Infectious Diseases**, v. 171, p. 1237-1243, 1995.

ANTONIO, M. A.; HAWES, S. E.; HILLIER, S. L. The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women colonized by these species. **Journal of Infectious Diseases**, v. 180, p. 1950-1956, 1999.

ANTONIO, M. A.; RABE, L. K.; HILLIER, S. L. Colonization of the rectum by *Lactobacillus* species and decreased risk of bacterial vaginosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 192, p. 394-398, 2005.

ANUKAM, K.; OSAZUWA, E.; AHONKHAI, I.; NGWU, M.; OSEMENE, G.; BRUCE, A. W.; REID, G. Augmentation of antimicrobial metronidazole therapy of bacterial vaginosis with oral probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14: randomized, double-blind, placebo controlled trial. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1450-1454, 2006. (a)

ANUKAM, K. C.; OSAZUWA, E. O.; AHONKHAI, I.; REID, G. *Lactobacillus* vaginal microbiota of women attending a reproductive health care service in Benin city, Nigeria. **Sexually Transmitted Diseases**, 33, p. 59-62, 2006. (c)

ANUKAM, K. C.; OSAZUWA, E.; OSEMENE, G. I.; EHIGIAGBE, F.; BRUCE, A. W.; REID, G. Clinical study comparing probiotic *Lactobacillus* GR-1 and RC-14 with metronidazole vaginal gel to treat symptomatic bacterial vaginosis. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 2772-2776, 2006. (b)

AROUTCHEVA, A.; GARITI, D.; SIMON, M.; SHOTT, S.; FARO, J.; SIMOES, J. A.; GURGUIS, A.; FARO, S. Defense factors of vaginal lactobacilli. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 185, p. 375-379, 2001.

AVALL-JÄÄSKELAINEN, S.; PALVA, A. *Lactobacillus* surface layers and their applications. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 511-529, 2005.

AVONTS, D.; SERCU, M.; HEYERICK, P.; VANDERMEEREN, I.; MATHEUS A.; PILOT, P. Incidence of uncomplicated genital infections in women using oral contraception or an intrauterine device: a prospective study. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 17, p. 23-29, 1999.

BAGGIOLINI, M.; CLARK-LEWIS, I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. **FEBS Letters**, v. 307, p. 97-101, 1992.

BAGNOLI, V. R. An overview of the clinical experience with secnidazole in bacterial vaginosis and trichomoniasis. **Drug Investigation**, v. 8, p. 53-60, 1994.

BALMER, S. E.; WHARTON, B. A. Diet and faecal flora in the newborn: breast milk and infant formula. **Archives of Disease in Childhood**, v. 64, 1672-1677, 1989.

BALOTESCU, M. C.; PETRACHE, L. M. Adherence of lactobacilli to intestinal mucosa and their antagonistic activity against pathogens. **Romanian Biotechnology Letters**, v. 9, p. 1737-1750, 2004. [Resumo].

BARCHESI, F.; HOLLIS, R. J.; DEL POETA, M.; MC GOUGH, D. A.; SCALISE, G.; RINALDI, M. G.; PFALLER, M. A. Transmission of fluconazole-resistant *Candida albicans* between patients with AIDS and oropharyngeal candidiasis documented by pulsed-field electrophoresis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 21, p. 561-564, 1995.

BAROUSSE, M. M.; ESPINOSA, T.; DUNLAP, K.; FIDEL, P. L. JR. Vaginal epithelial cell anti-*Candida albicans* activity is associated with protection against symptomatic vaginal candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 7765-7767, 2005.

BAROUSSE, M. M.; VAN DER POL, B. J.; FORTENBERRY, D.; ORR, D.; FIDEL P. L. JR. Vaginal yeast colonization, prevalence of vaginitis, and associated local immunity in adolescents. **Sexually Transmitted Infections**, v. 80, p. 48-53, 2004.

BARRONS, R.; TASSONE, D. Use of *Lactobacillus* probiotics for bacterial genitourinary infections in women: a review. **Clinical Therapeutics**, v. 30, p. 453-468, 2008.

BARTIE, K. L.; WILLIAMS, D. W.; WILSON, M. J.; POTTS, A. J.; LEWIS, M. A. PCR fingerprinting of *Candida albicans* associated with chronic hyperplasic candidosis and oral conditions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 4066-4075, 2001.

BARTLETT, J. G.; POLK, B. F. Bacterial vaginal flora of the vagina: quantitative study. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 6, p. 67-72, 1984.

BASU, S.; QUILICI, C.; ZHANG, H. H.; GRAIL, D.; DUNN, A. R. Mice lacking both G-CSF and IL-6 are more susceptible to *Candida albicans* infection: critical role of neutrophils in defense against *Candida albicans*. **Growth Factors**, v. 26, p. 23-34, 2008.

BAUTERS, T. G. M.; DHONT, M. A.; TEMMERMAN, M. I.; NELIS, H. J. Prevalence of vulvovaginal candidiasis and susceptibility to fluconazole in women. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 187, p. 569-574, 2002.

BEIGI, R. H.; MEYN, L. A.; MOORE, D. M.; KROHN, M. A.; HILLIER, S. L. Vaginal yeast colonization in nonpregnant women: a longitudinal study. **Obstetrics and Gynecology**, v. 104, p. 926-930, 2004.

BENGMARK, S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. **Gut**, v. 42, p. 2-7, 1998.

BERTHIER, F. On the screening of the hydrogen peroxide-generating lactic acid bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 16, p. 150-153, 1993.

BESSELINK, M. G.; VAN SANTVOORT, H. C.; BUSKENS, E.; BOERMEESTER, M. A.; VAN GOOR, H.; TIMMERMAN, H. M.; NIEUWENHUIJS, V. B.; BOLLEN, T. L.; VAN RAMSHORST, B; WITTEMAN, B. J.; ROSMAN, C.; PLOEG, R. J.; BRINK, M. A.; SCHAAPHERDER, A. F.; DEJONG, C. H.; WAHAB, P. J.; VAN LAARHOVEN, C. J.; VAN DER HARST, E.; VAN EIJCK, C. H.; CUESTA, M. A.; AKKERMANS, L. M.; GOOSZEN, H. G.; DUTCH ACUTE PANCREATITIS STUDY GROUP. Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. **Lancet**, v. 371, p. 651-659, 2008.

BLACK, C. A. ; EYERS, F. M.; RUSSELL, A.; DUNKLEY, M. L.; CLANCY, R. L.; BEAGLEY, K. W. Accute neutropenia decreases inflammation associated with murine vaginal candidiasis but has no effect on the course of infection. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 1273-1275, 1998.

BLASCHKE-HELLMESSEN, R. Vertical transmission of *Candida* and its consequences. **Mycoses**, v. 41, p. 31-36, 1998.

BOHBOT, J. M. Acquisitions récentes sur la physiopathologie des candidosis vulvovaginales. **Gynécologie Obstétrique**, p. 25-28, 1996.

BORIS, S.; BARBÉS, C. Role played by *Lactobacillus* in controlling the population of vaginal pathogens. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 543-546, 2000.

BORIS, S.; SUÁREZ, J. E.; VÁSQUEZ, F.; BARBÉS, C. Adherence of human lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. **Infection and Immunity**, v. 66, p. 1985-1989, 1998.

BOSKEY, E. R. Alternative therapies for bacterial vaginosis: a literature review and acceptability survey. **Alternative Therapies in Health and Medicine**, v. 11, p. 38-43, 2005.

BOSKEY, E. R.; CONE, R. A.; WHALEY, K. J.; MOENCH, T. R. Origins of vaginal acidity: high D/L lactate radio is consistent with bacteria being the primary source. **Human Reproduction**, v. 16, 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 colonization. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 5170-5175, 1999.

BOYD, M. A.; ANTONIO, M. A. D.; HILLIER, S. L. Comparison of API 50 CH strips to whole-chromosomal DNA probes for identification of *Lactobacillus* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5309-5311, 2005.

BOYLE, R. J.; ROBINS-BROWNE, R. M.; TANG, M. L. Probiotic use in clinical practice: What are the risks? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p. 1256-1264, 2006.

BOZIARIS, I. S.; ADAMS, M. R. Effect of chelators and nisin produced *in situ* on inhibition and inactivation of gram negatives. **International Journal of Food Microbiology**, v. 53, p. 105-113, 1999.

BRADSHAW, C. S.; MORTON, A. N.; HOCKING, J.; GARLAND, S. M.; MORRIS, M. B.; MOSS, L. M.; HORVATH, L. B.; KUZEVSKA, I.; FAIRLEY, C. K. High recurrence rates of bacterial vaginosis over the course of 12 months after oral metronidazole therapy and factors associated with recurrence. **Journal of Infectious Diseases**, v. 193, p. 1478-1486, 2006.

BREEN, E. C. VEGF in biological control. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 102, p. 1358-1367, 2007.

BRUCE, A. W.; REID, G. Intravaginal instillation of lactobacilli for prevention of recurrent urinary tract infections. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 339-343, 1988.

BRUCE, A. W.; REID, G.; MCGROARTY, J. A.; TAYLOR, M.; PRESTON, C. Preliminary study on the prevention of recurrent urinary tract infections in ten adult women using intravaginal lactobacilli. **International Urogynecology Journal**, v. 3, p. 22-25, 1992.

BUMP, R. C.; BUESCHING, W. J. 3rd. Bacterial vaginosis in virginal and sexually active adolescent females: evidence against exclusive sexual transmission. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 158, p. 935-939, 1988.

BURTON, J. P.; CADIEUX, P.; REID, G. Improved understanding of the bacterial vaginal microflora of women before and after probiotic instillation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 97-101, 2003.

BURTON, J. P.; DEVILLARD, E.; CADIEUX, P. A.; HAMMOND, J. A.; REID, G. Detection of *Atopobium vaginae* in postmenopausal women by cultivation-independent methods warrants further investigation. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 1829-1831, 2004.

BURTON, J. P.; REID, G. Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, p. 1770-1780, 2002.

BUSCEMI, L.; ARECHAVALA, A.; NEGRONI, R. Estúdio de las vulvovaginitis agudas en pacientes adultas, sexualmente activas, con especial referencia a la candidiasis, en pacientes del hospital de infecciosas Francisco J. Muñiz. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 21, p. 177-181, 2004.

CADIEUX, P.; BURTON, J.; GARDINER, G.; BRAUNSTEIN, I.; BRUCE, A. W.; KANG, C. Y.; REID, G. *Lactobacillus* strains and vaginal ecology. **Journal of American Medical Association,** v. 287, p. 1940-1941, 2002.

CADIEUX, P.; WIND, A.; SOMMER, P.; SCHAEFER, L.; CROWLEY, K.; BRITTON, R. A.; REID, G. Evaluation of reuterin production in urogenital probiotic *Lactobacillus reuteri* RC-14. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 4645-4649, 2008.

CALZOLARI, E.; MASCIANGELO, R.; MILITE, V.; VERTERAMO, R. Bacterial vaginosis and contraceptive methods. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 70, p. 341-346, 2000.

CAMARGO, R. P.; SIMÕES, J. A.; CECATTI, J. G.; ALVES, V. M.; FARO, S. Impact of treatment for bacterial vaginosis on prematurity among Brazilian pregnant women: a retrospective cohort study. **São Paulo Medical Journal**, v. 123, p. 108-112, 2005.

CAROLISSEN-MACKAY, V.; ARENDSE, G.; HASTINGS, J. W. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 34, p. 1-16, 1997.

CARO-PARTÓN, T.; CARVAJAL, A.; MARTIN DE DIEGO, I.; MARTIN-ARIAS, L. H.; ALVAREZ REQUEJO, A.; RODRÍGUEZ PINILLA, E. Is metronidazole teratogenic? A meta-analysis. **British Journal of Clinical Pharmacology.**, v. 44, p. 179-182, 1997.

CARUSO, L. J. Vaginal moniliasis after tetracycline therapy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 90, p. 374-380, 1964.

CAUCI, S.; DRIUSSI, S.; MONTE, R.; LANZAFAME, P.; PITZUS, E.; QUADRIFOGLIO, F. Immonoglobulin A response against *Gardnerella vaginalis* hemolysin and sialidase activity in bacterial vaginosis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 178, p. 511-515, 1998.

CAUCI, S.; THORSEN, P.; SCHENDEL, D. E.; BREMMELGAARD, A.; QUADRIFOGLIO, F.; GUASCHINO, S. Determination of immunoglobulin A against *Gardnerella vaginalis* hemolysin, sialidase, and prolidase activities in vaginal fluid: implications for adverse pregnancy outcomes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 435-438, 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Sexually Transmitted Diseases treatment. Guidelines. **MMWR Recommendations and Reports**, v. 51, p. 1-80, 2002. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5106a1.htm>. Acesso em: 19 dez. 2005.

CETIN, M.; OCAK, S.; GUNGOREN, A.; KAKVERDI, A. U. Distribution of *Candida* species in women with vulvovaginal symptoms and their association with different ages and contraceptive methods. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 39, p. 584-588, 2007.

CHAN, R. C.; REID, G.; IRVIN, R. T.; BRUCE, A. W.; COSTERTON, J. W. Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragments. **Infection and Immunity**, v. 47, p. 84-89, 1985.

CHANDRA, R. K. Prospective studies of the effect of breast feeding on the incidence of infection and allergy. **Acta Pediatrica**, v. 68, p. 691-694, 1979.

CHANG, Y. C.; HUANG, F. M.; YANG, S. F.; LUI, C. M.; LAI, C. C.; CHAN, Y.; HSIEH, Y. S. Induction of cyclooxygenase–2 mRNA and protein expressions in human pulp cells stimulated with black-pigmented bacteroides. **Journal of Endodontics**, v. 29, p. 240-243, 2003.

CHAPPLE, A.; HASSEL, K.; NICOLSON, M.; CANTRILL, J. "You don't really feel you can function normally": women's perceptions and personal management of vaginal thrush. **Journal of Reproductive and Infant Psychology**, v. 18, p. 309-319, 2000.

CHATWANI, A. J.; MEHTA, R.; HASSAN, S.; RAHIMI, S.; JERONIS, S.; DANDOLU, V. Rapid testing for vaginal yeast detection: a prospective study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 196, p. 309.e1-309.e4, 2007.

CHEN, K. C.; FORSYTH, P. S.; BUCHANAM, T. M.; HOLMES, K. K. Amine content of vaginal fluid from untreated and treatment patients with nonspecific vaginitis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 63, p. 828-835, 1979.

CHERPES, T. L.; MEYN, L. A.; KROHN, M. A.; LURIE, J. G.; HILLIER, S. L. Association between acquisition of herpes simplex virus type 2 in women and bacterial vaginosis. **Clinical of Infectious Diseases**, v. 37, p. 319-325, 2003.

CHUNG, E. K.; MILLIER, R. L.; WILSON, M. T.; MCGEADY, S. J.; CULHANE, J. F. Antenatal risk factors, cytokines and the development of atopic disease in early childhood. **Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition**, v. 92, p. 68-73, 2007.

CIZMAN, M. The use and resistance to antibiotics in the community. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 21, p. 297-307, 2003.

CLAY, J. C. The odour of non-specific vaginitis: a review. **European Journal of Clinical Microbiology**, v. 1, p. 317-319, 1982.

CLEVELAND, J.; MONTVILLE, T. J.; NES, I. F.; CHIKINDAS, M. L. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, p. 1-20, 2001.

COLLINS, J. K.; THORNTON, G.; SULLIVAN, G. O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 487-490, 1998.

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, p. 870-878, 1992.

COSTA, M.; FERNANDES, O. F. L.; SILVA, M. R. R. Candidíase vulvovaginal: aspectos clínicos, tratamento oral e susceptibilidade *in vitro*. **Revista de Patologia Tropical**, v. 32, p. 145-162, 2003.

COTTER, P. D.; HILL, C.; ROSS, R. P. Bacteriocins: developing innate immunity for food. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 777-788, 2005.

CZEIZEL, A. E.; ROCKENBAUER, M. A population case-control teratologic study of oral metronidazole treatment during pregnancy. **British Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 105, p. 322-327, 1998.

DAUM, G.; LEES, N. D.; BARD, M.; DICKSON, R. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 14, p. 1471-1510, 1998.

DE VRIES, M. C.; SIEZEN, R. J. ; WIJMAR, J. G.; ZHAO, Y. ; KLEEREBEZEM, M. ; DE VOS, W. M.; VAUGHAN, E. E. Comparative and functional analysis of the rRNA-operons and their t-RNA gene complement in different lactic acid bacteria. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 29, p. 358-367, 2006.

DELIA, A.; MORGANTE, G.; RAGO, G.; MUSACCHIO, M. C.; PETRAGLIA, F.; DE LEO, V. Effectiveness of oral administration of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19 in association with vaginal suppositories of *Lactobacillus acidofilus* in the treatment of vaginosis and in the prevention of recurrent vaginitis. **Minerva Ginecologica**, v. 58, p. 227-231, 2006. [Resumo].

DELLAGLIO, F.; FELIS, G. E. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria. In: TANNOCK, G. W. **Probiotics and Prebiotics:** scientific aspects. Dunedin: Caister Academic Press, 2005. p. 25-50.

DEMIREZEN, S. The lactobacilli-*Candida* relationship in cervico-vaginal smears. **Central European Journal of Public Health**, v. 10, p. 97-99, 2002.

DEVILLARD, E.; BURTON, J. P.; HAMMOND, J. A.; LAM, D.; REID, G. Novel insight into the vaginal microflora in postmenopausal women under hormone replacement therapy as analysed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. **European Journal of Obstetrics and Reproductive Biology**, v. 117, p. 76-81, 2004.

DJEU J. Y.; MATSUSHIMA, K.; OPPENHEIM, J. J.; SHIOTSUKI, K.; BLANCHARD, D. K. Functional activation of human neutrophils by recombinant monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/IL-8. **Journal of Immunology**, v. 144, p. 2205-2010, 1990.

DONDERS, G. G. G.; BOSMANS, E.; DEKEERSMAECKER, A.; VEREECKEN, A.; VAN BULCK, B.; SPITZ, B. Pathogenesis of abnormal vaginal flora. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 182, p. 872-878, 2000.

DUNNE, C.; MURPHY, L.; FLYNN, S.; O'MAHONY, L.; O'HALLORAN, S.; FEENEY, M.; MORRISSEY, D.; THORTON, G.; FITZGERALD, G.; DALY, C.; KIELY, B.; QUIGLEY, E. M. M.; O'SULLIVAN, G. C.; SHANAHAN, F.; COLLINS, J. K. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 76, p. 279-292, 1999.

ECKERT, L. O.; HAWES, S. E.; STEVENS, C. E.; KOUTSKY, L. A.; ESCHENBACH, D. A.; HOLMES, K. K. Vulvovaginal candidiasis: clinical manifestations, risk factors, management algorithm. **Obstetrics and Gynecology**, v. 92, p. 757-765, 1998.

EGAN, L. A.; GUTIÉRREZ, A. K.; CUEVAS, M. P.; LUCIO, J. R. Perfil epidemiológico del parto prematuro. **Ginecología y Obstetricia de México**, v. 76, p. 542-548, 2008.

ELMER, G.; SURAWICZ, C.; MCFARLAND, L. Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. **Journal of American Medical Association**, v. 275, p. 870-876, 1996.

ENNAHAR, S.; CAI, Y.; FUJITA, Y. Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 444-451, 2003.

ERIKSSON, K.; CARLSSON, B.; FORSUM, U.; LARRSON, P. G. A double-blind treatment study of bacterial vaginosis with normal vaginal lactobacilli after an open treatment with vaginal clindamycin ovules. **Acta Dermato-Venereologica,** v. 85, p. 42-46, 2005.

ESCHENBACH, D. A.; DAVICK, P. R.; WILLIAMS, B. L.; KLEBANOFF, S. J.; YOUNG-SMITH, K.; CRITCHLOW, C. M.; HOLMES, K. K. Prevalence of hydrogen peroxide-producing *Lactobacillus* species in normal women and women with bacterial vaginosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 251-256, 1989.

FALAGAS, M. E.; BETSI, G. I.; ATHANASIOU, S. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, p. 266-272, 2006.

FALSEN, E; PAUSCAUL, C.; SJÖDÉN, B.; OHLÉN, 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, p. 217-221, 1999.

FAMULARO, G.; PERLUIGI, M.; COCCIA, R.; MASTROIACOVO, P.; DE SIMONE, C. Microecology, bacterial vaginosis and probiotics: perspectives for bacteriotherapy. **Medical Hypotheses**, v. 56, p. 421-430, 2001.

FAN, S. R., LIU, X. P., LI, J. W. Clinical characteristics of vulvovaginal candidiasis and antifungal susceptibilities of *Candida* species isolates among patients in southern China from 2003 to 2006. **Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 34, p. 561-566, 2008.

FAVIER, C. F.; VAUGHAN, E. E.; DE VOS, W. M.; AKKERMANS, A. D. Molecular monoclony of succession of bacterial communities in human neonates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 219-226, 2002.

FENN, J. P.; SEGAL, H.; BARLAND, B.; DENTON, D.; WHISENANT, J.; CHUN, H.; CHRISTOFFERSON, K.; HAMILTON, L.; CARROLL, K. Comparison of updated Vitek Yeast Biochemical Bard and API 20C yeast identification systems. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 1184-1187, 1994.

FERRER, J. Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 71, p. 21-27, 2000.

FERRIS, D.; LITAKER, M. S.; WOODWARD, L.; MATHIS, D.; HENDRICH, J. Treatment of bacterial vaginosis: a comparison of oral metronidazole, metronidazole vaginal gel, and clindamycin vaginal cream. **Journal of Family Practice**, v. 41, p. 443-449, 1995.

FICHOROVA, R. N.; ANDERSON, D. J. Differential expression of immunobiological mediators by immortalized human cervical and vaginal epithelial cells. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 508-514, 1999.

FICHOROVA, R. N.; RHEINWALD, J. G.; ANDERSON, D. J. Generation of papillomavirus-immortalized cell lines from normal human ectocervical, endocervical and vaginal epithelium that maintain expression of tissue-specific differentiation proteins. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 847-855, 1997.

FIDEL, P. L. JR. History and update on host defense against vaginal candidiasis. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 57, p. 2-12, 2007.

FIDEL, P. L. JR., BAROUSSE, M.; ESPINOSA, T.; FICARRA, M.; STURTEVANT, J.; MARTIN, D. H.; QUAYLE, A. J.; DUNLAP, K. An intravaginal live *Candida* challenge in humans leads to new hypothesis for the immunopathogenesis of vulvovaginal candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 2939-2946, 2004.

FIDEL, P. L. JR.; GINSBURG, K. A.; CUTRIGHT, J. L.; WOLF, N. A.; LEAMAN, D.; DUNLAP, K.; SOBEL, J. D. Vaginal-associated immunity in women with recurrent vulvovaginal candidiasis: evidence for vaginal Th1-type responses following intravaginal challenge with *Candida* antigen. **Journal of Infectious Diseases**, v. 176, p. 728-739, 1997.

FIDEL, P. L. JR.; LUO, W.; STEELE, C.; CHABAIN, J.; BAKER, M.; WORMLEY, F. L. Analysis of vaginal cell populations during experimental vaginal candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 3135-3140, 1999.

FIDEL, P. L. JR.; SOBEL, J. D. Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. **Clinical and Microbiology Reviews**, v. 9, p. 335-348, 1996.

FISCHBACH, F.; PETERSEN, E. E.; WEISSENBACHER, E. R.; MARTIUS, J.; HOSMANN, J.; MAYER, H. Efficacy of clindamycin vaginal cream versus oral metronidazole in the treatment of bacterial vaginosis. **Obstetrics and Gynecology**, v. 82, p. 405-410, 1993.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS / WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). **Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria**. Geneva: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report, 2001. Disponível em: http://www.fao.org.es/ESN/Probio/probio.htm. Acesso em: 11 maio 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS / WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Geneva: Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report, 2002. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf. Acesso em: 10 out. 2005.

FONTAINE, E. A.; CLAYDON, E.; TAYLOR-ROBINSON, D. Lactobacilli from women with or without bacterial vaginosis and observations on the significance of hydrogen peroxide. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 9, p. 135-141, 1996.

FONTAINE, E. A.; TAYLOR-ROBINSON, D. Comparison of quantitative and qualitative methods of detecting hydrogen peroxide produced by human vaginal strains of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, p. 326-331, 1990.

FOXMAN, B.; BARLOW, R.; D'ARCY, H.; GILLESPIE, B.; SOBEL, J. D. *Candida* vaginitis: self-reported incidence and associated costs. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 27, p. 230-235, 2000.

FREDRICKS, D. N.; FIEDLER, T. L., MARRAZZO, J. M. Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis. **New England Journal of Medicine**, v. 353, p. 1899-1911, 2005.

FREDRICSSON, B.; ENGLUND, K.; WEINTRAUB, L.; OLUND, A.; NORD, C. E. Bacterial vaginosis is not a simple ecological disorder. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 28, p. 156-160, 1989.

FREYDIÈRE, A. M.; BUCHAILLE, L; GILLE, Y. Comparison of three commercial media for direct identification and discrimination of *Candida* species in clinical specimens. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 16, p. 464-467, 1997.

FRIEDRICH, E. A. J. The vagina: an ecological challenge. **Arizona Medical**, v. 36, p. 443-445, 1979.

FUNG, H. B.; DOAN, T. L. Tinidazole: a nitroimidazole antiprotozoal agent. **Clinical Therapeutics**, v. 27, p. 1859-1884, 2005.

GALASK, R. P. Vaginal colonization by bacteria and yeast. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 158, p. 993-995, 1988.

GARDINER, G. E.; HEINEMANN, C.; BAROJA, M. L.; BRUCE, A. W.; BEUERMAN, D.; MADRENAS, J.; REID, G. Oral administration of the probiotic combination *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 for human intestinal applications. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 191-196, 2002. (a)

GARDINER, G. E.; HEINEMANN, C.; BRUCE, A. W.; BEUERMAN, D.; REID, G. Persistence of *Lactobacillus fermentum* RC-14 and *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 but not *L. rhamnosus* GG in the human vagina as demonstrated by Randomly Amplified Polymorphic DNA. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, p. 92-96, 2002. (b)

GARDNER, H. L.; DUKES, C. D. *Haemophilus vaginalis* vaginitis. A newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 69, p. 962-976, 1955.

GILL, H.; PRASAD, J. Probiotics, immunomodulation, and health benefits. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 606, p. 423-454, 2008.

GIRALDO, P.; VON NOWASKONSKI, A.; GOMES, F. A.; LINHARES, I.; NEVES, N. A.; WITKIN, S. S. Vaginal colonization by *Candida* in asymptomatic women with and without a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. **Obstetrics and Gynecology**, v. 95, p. 413-416, 2000.

GOLDENBERG, R. L.; KLEBANOFF, M. A.; NUGENT, R.; KHRON, M. A.; HILLIER, S.; ANDREWS, W. W. Bacterial colonization of the vagina during pregnancy in four ethnic groups. Vaginal infections and prematurity study group. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 174, p. 1618-1621, 1996.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v. 360, p. 512-518, 2003.

HAEFNER, H. K. Current evaluation and management of vulvovaginitis. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 42, p. 184-195, 1999.

HALLÉN, A.; JARSTRAND, C.; PÅHLSON, C. Treatment of bacterial vaginosis with lactobacilli. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 19, p. 146-148, 1992.

HALPERN, G. M.; VRUWINK, K. G.; VAN DE WATER, J.; KEEN, C. L.; GERSHWIN, M. E. Influence of long-term yogurt consumption in young adults. **International Journal of Immunotherapy**, v. 7, p. 205-210, 1991.

HAMMES, W. P.; VOGEL, R. F. The genus *Lactobacillus*. In: WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The genera of lactic acid bacteria**. London: Blackie Academic & Professional, 1995. p. 19-54.

HAWES, S. E.; HILLIER, S. L.; BENEDETTI, J.; STEVENS, C. E.; KOUTSKY, L. A.; WOLNER-HANSSEN, P.; HOLMES, K. K. Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and acquisition of vaginal infections**. Journal of Infectious Diseases**, v. 174, p. 1058-1063, 1996.

HEDGES, S. R.; AGACE, W. W.; SVANBORG, C. Epithelial cytokine responses and mucosal cytokine networks. **Trends in Microbiology**, v. 3, p. 266-270, 1995.

HEDGES, S.; AGACE, W.; SVENSSON, M.; SJÖGREN, A.; CESKA, M.; SVANBORG, C. Uroepithelial cells are part of a mucosal cytokine network. **Infection and Immunity**, v. 62, p. 2315-2321, 1994.

HILLIER, S. L.; KROHN, M. A.; RABE, L. K.; KLEBANOFF, S. J.; ESCHENBACH, D. A. The normal vaginal flora, H_2O_2-producing lactobacilli, and bacterial vaginosis in pregnant women. **Clinical Infectious Diseases**, v. 16, p. 273-281, 1993.

HILLIER, S. L.; MARTIUS, J.; KROHN, M.; KIVIAT, N.; HOLMES, K. K.; ESCHENBACH, D. A. A case-control study of chorioamnionic infection and histologic chorioamniotitis in prematurity. **New England Journal of Medicine**, v. 319, p. 972-978, 1988.

HILTON, E.; RINDOS, P.; ISENBERG, H. D. *Lactobacillus* GG vaginal suppositories and vaginitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1433, 1995.

HOGAN, V. K. ; CULHANE, J. F.; HITTI, J.; RAUH, V. A.; MCCOLLUM, K. F.; AGNEW, K. J. Relative performance of three methods for diagnosing bacterial vaginosis during pregnancy. **Maternal and Child Health Journal**, v. 11, p. 532-539, 2007.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 365-373, 2001.

HOOTON, T. M.; FIHN, S. D.; JOHNSON, C.; ROBERTS, P. L.; STAMM, W. E. Association between bacterial vaginosis and acute cystitis in women using diaphragms. **Archives of Internal Medicine**, v. 149, p. 1932-1936, 1989.

HOSPENTHAL, D. R.; BECKIUS, M. L.; FLOYD, K. L.; HORVATH, L. L.; MURRAY, C. K. Presumptive identification of *Candida* species other than *C. albicans*, *C. krusei*, and *C. tropicalis*, with the chromogenic medium CHROMagar Candida. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 5, n. 1, 2006. (doi: 10.1186/1476-0711-5-1).

HOWARD, J. C.; HEINEMANN, C.; THATCHER, B. J.; MARTIN, B.; GAN, B. S.; REID, G. Identification of collagen-binding proteins in *Lactobacillus* spp. with surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight ProteinChip technology. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4396-4400, 2000.

HUDSON, M. M.; TIDY, J. A.; MCCULLOCH, T. A.; ROGSTAD, K. E. When is bacterial vaginosis not bacterial vaginosis? – A case of cervical carcinoma presenting as recurrent vaginal anaerobic infection. **Genitourinary Medicine**, v. 73, p. 306-307, 1997.

ISOLAURI, E.; MAJAMAA, H.; ARVOLA, T.; RANTALA, I.; VIRTANEN, E.; ARVILOMMI, H. *Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. **Gastroenterology**, v. 105, p. 1643-1650, 1993.

ISOLAURI, E.; SÜTAS, Y.; KANKAANPÄÄ, P.; ARVILOMMI, H.; SALMINEN, S. Probiotics: effects on immunity. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 444-450, 2001.

JEAVONS, H. S. Prevention and treatment of vulvovaginal candidiasis using exogenous *Lactobacillus*. **Journal of Obstetrics, Gynecology and Neonatal Nursing**, v. 32, p. 287-296, 2003.

JIN, L.; TAO, L. I.; PAVLOVA, S. I.; SO, J. S.; KIWANUKA, N.; NAMUKWAYA, Z.; SABERBEIN, B. A.; WAWER, M.. Species diversity and relative abundance of vaginal lactic acid bacteria from women in Uganda and Korea. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, p. 1107-1115, 2007.

JOKIPII, A. M.; MYLLYLÄ, V. V.; HOKKANEN, E.; JOKIPII, L. Penetration of the blood brain barrier by metronidazole and tinidazole. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 3, p. 239-245, 1977.

JUDLIN, P. Mycoplasmes génitaux. **Gynécologie, Obstetrique et Fertilité**, v. 31, p. 954-959, 2003.

JUVEN, B. J.; PIERSON, M. D. Antibacterial effects of hydrogen peroxide and methods for its detection and quantification. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 1233-1241, 1996.

KAEWSRICHAN, J.; PEEYANANJARASSRI, K.; KONGPRASERTKIT, J. Selection and identification of anaerobic lactobacilli producing inhibitory compounds against vaginal pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 48, p. 75-83, 2006.

KAHLMETER, G. An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: The ECO-SENS project. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 69-76, 2003.

KAILA, M.; ISOLAURI, E.; SOPPI, E.; VIRTANEN, E.; LAINE, S.; ARVILOMMI., H. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. **Pediatric Research**, v. 32, p. 141-144, 1992.

KARASZ, A.; ANDERSON, M. The vaginits monologues: women's experiences of vaginal complaints in a primary care setting. **Social Science and Medicine**, v. 56, p. 1013-1021, 2003.

KARLOWSKY, J. A.; KELLY, L. J.; THORNSBERRY, C.; JONES, M. E.; SAHM, D. F. Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of *E. coli* from female outpatients in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, p. 2540-2545, 2002.

KEKKI, M.; KURKI, T.; PELKONEN, J.; KURKINEN-RATY, M.; CACCIATORE, B.; PAAVONEN, J. Vaginal clindamycin in preventing preterm birth and peripartal infections in asymptomatic women with bacterial vaginosis: a randomized, controlled trial. **Obstetrics and Gynecology**, v. 97, p. 643-648, 2001.

KELLY, S. L.; LAMB, D. C.; BALDWIN, B. C.; CORRAN, A. J.; KELLY, D. E. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* CYP61, sterol delta22-desaturase, and inhibition by azole antifungal agents. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p. 9986-9988, 1997.

KENT, H. L. Epidemiology of vaginitis. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 165, p. 1168-1176, 1991.

KING, R. D.; LEE, J. C.; MORRIS, A. L. Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 27, p. 667-674, 1980.

KLAENHAMMER, T. R. Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Biochimie**, v. 70, p. 337-349, 1988.

KLAENHAMMER, T. R. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 12, p. 39-85, 1993.

KLEBANOFF, M. A.; SCHWEBKE, J. R.; ZHANG, J.; NANSEL, T. R.; YU, K. F.; ANDREWS, W. W. Vulvovaginal symptoms in women with bacterial vaginosis. **Obstetrics and Gynecology**, v. 104, p. 267-272, 2004.

KLEBANOFF, S. J. Iodination of bacteria: a bactericidal mechanism. **Journal of Experimental Medicine**, v. 126, p. 1063-1078, 1967.

KÖHLER, G.; REID G. Profiling the transcriptional response of *Candida albicans* to probiotic lactobacilli. In: ASM CONFERENCE ON BENEFICIAL MICROBES, Lake Tahoe. **Abstract**, n. 46A, p. 46, 2005.

KRIEGER, J. N. Urinary tract infections: what's new? **Journal of Urology**, v. 168, p. 2351-2358, 2002.

KRUCZAK-FILIPOV, P.; SHIVELY, R. G. Gram stain procedures. In: ISENBERG, H. D. **Clinical microbiological procedures handbook**. Washington: American Society for Microbiology, 1992. p. 1.5.1-1.5.18.

KULLBERG, B. J.; VAN'T WOUT, J. W.; VAN FURTH, R. Role of granulocytes in enhanced host resistance to *Candida albicans* induced by recombinant interleukin-1. **Infection and Immunity**, v. 58, p. 3319-3324, 1990.

KULLISAAR, T.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M.; VIHALEMM, T.; ANNUK, H.; KAIRANE, C.; KILK, A. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 72, p. 215-224, 2002.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W. Classification of yeasts. In: _____. **The yeasts**. **A taxonomic study**. 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 1998. p. 891-947.

LAMONT, R. F.; MORGAN, D. J.; WILDEN, S. D.; TAYLOR-ROBINSON, D. Prevalence of bacterial vaginosis in women attending one of three general practices for routine cervical cytology. **International Journal of STD AIDS**, v. 11, p. 495-498, 2000.

LARSEN, B. Vaginal flora in health and disease. **Clinical and Obstetrics Gynecology**, v. 36, p. 107-121, 1993.

LARSEN, B.; GALASK, R. P. Vaginal microflora: practical and theoretical relevance. **Obstetrics and Gynecology**, v. 55, p. 100-113, 1980.

LARSEN, B.; MONIF, G. R. Understanding the bacterial flora of the female genital tract. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 69-77, 2001.

LARSSON, P. G. Bacterial vaginosis treatment evaluation before one month is not accurate. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 172, p. 1638-1639, 1955.

LARSSON, P. G.; BERGMAN, B.; FORSUM, U.; PAHLSON, C. Treatment of bacterial vaginosis in women with vaginal bleeding complications or discharge and harboring *Mobilluncus*. **Gynecology and Obstetric Investigation**, v. 29, p. 296-300, 1990.

LARSSON, P. G.; FORSUM, U. Bacterial vaginosis – a disturbed bacterial flora and treatment enigma. **Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica**, v. 113, p. 305-316, 2005.

LARSSON, P. G.; STRAY-PEDERSEN, B.; RYTTIG, K. R.; LARSEN, S. Human lactobacilli as supplementation of clindamycin to patients with bacterial vaginosis reduce the recurrence rate; a 6-month, double-blind, randomized, placebo-controlled study. **BMC Women´s Health**, v. 8, n. 3, 2008. (doi: 10.1186/1472-6874-8-3).

LAUGHTON, J.; DEVILLARD, E.; HEINRICHS, D. E.; REID, G.; MCCORMICK, J. Inhibition of expression of a staphylococcal superantigen-like protein by a soluble factor from *Lactobacillus reuteri*. **Microbiology**, v. 152, p. 1155-1167, 2006.

LEON, E. M.; JACOBER, S. J.; SOBEL, J. D.; FOXMAN, B. Prevalence and risk factors for vaginal *Candida* colonization in women with type 1 and type 2 diabetes. **BMC Infectious Diseases**, v. 2, n. 1, 2002. (doi: 10.1186/1471-2334-2-1).

LEPARGNEUR, J. P.; ROUSSEAU, V. Protective role of the Doderleïn flora. Journal **Gynécologie, Obstétrique et Biologie de la Reproduction**, v. 31, p. 485-494, 2002.

LEROY, F.; DE VUYST, L D. Sakacins. In: NAIDU, A. S. **Natural food antimicrobial systems**. 7th ed. London: CRC Press, 2000. p. 589-610.

LIBBY, E. K.; PASCAL, K. E.; MORDECHAI, E.; ADELSON, M. E.; TRAMA, J. P. *Atopobium vaginae* triggers an innate immune response in an *in vitro* model of bacterial vaginosis. **Microbes and Infection**, v. 10, p. 439-446, 2008.

LINDNER, G. E. M.; PLANTEMA, F. H. F.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J. A. Quantitative studies of the vaginal flora of health women and of obstetrics and gynecological women. **Journal of Medical Microbiology**, v. 11, p. 233-241, 1978.

LINO, T.; UCHIMURA, T.; KOMAGATA, K. Characterization of *Lactobacillus sakei* by the stereoisomers of lactic acid produced. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 48, p. 111-121, 2003.

LIVENGOOD, C. H. 3rd; FERRIS, D. G.; WIESENFELD, H. C.; HILLIER, S. L.; SOPER, D. E.; NYIRJESY, P.; MARRAZZO, J.; CHATWANI, A.; FINE, P.; SOBEL, J.; TAYLOR, S. N.; WOOD, L.; KANALAS, J. J. Effectiveness of two tinidazole regimens in treatment of bacterial vaginosis: a randomized controlled trial. **Obstetrics and Gynecology**, v. 110, p. 302-309, 2007.

LÓPEZ, C.; GIRO, L.; RAMOS, L.; RAMADÁN, S.; BULACIO, L. Comparación de diferentes métodos para la identificación de especies del género *Candida*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 37, p. 16-21, 2005.

LOREA BAROJA, M.; KIRJAVAINEN, P. V.; KEKMAT, S.; REID, G. Anti-inflammatory effects of probiotic yogurt in inflammatory bowel disease patients. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 149, p. 470-479, 2007.

LOUWAGIE, B.; SURMONT, I.; VERHAEGEN, J.; ODDS, F. Differential and enrichment media for selective culture and recognition of yeasts species from clinical material. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 14, p. 406-411, 1995.

MACFADDIN, J. F. **Biochemical tests for the identification of medical bacteria**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000.

MADSEN, K. Probiotics in critically ill patients. **Lancet**, v. 42, p. 116-118, 2008.

MARRAZO, J. M. ; COOK, R. L. ; WIESENFELD, H. C. ; MURRAY, P. J.; BUSSE, B.; KROHN, M.; HILLIER, S. L. Women's satisfaction with an intravaginal *Lactobacillus* capsules for the treatment of bacterial vaginosis. **Journal of Women's Health**, v. 15, p. 1053-1060, 2000.

MARTEAU, P. R. Probiotics in clinical conditions. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 22, p. 255-273, 2002.

MARTIN, H. L. B.; RICHARDSON, B. A.; NYANGE, P. M.; LAVREYS, L.; HILLIER, S. L.; CHOHAN, B.; MANDALIYA, K.; NDINYA-ACHOLA, J. O.; BWAYO, J.; KREISS, J. Vaginal lactobacilli, microbial flora, and risk of human immunodeficiency virus type 1 and sexually transmitted disease acquisition. **Journal of Infectious Diseases**, v. 180, p. 1863-1868, 1999.

MARTÍN, R.; SOBERÓN, N.; VÁSQUEZ, F.; SUÁREZ, J. E. Vaginal microbiota: composition, protective role, associated pathologies, and therapeutic perspectives. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 26, p. 160-167, 2008.

MASTROMARINO, P.; BRIGIDI, P.; MACCHIA, S.; MAGGI, L.; PIROVANO, F.; TRINCHIERI, V.; CONTE, U.; MATTEUZZI, D. Characterization and selection of vaginal *Lactobacillus* strains for the preparation of vaginal tablets. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 884-893, 2002.

MATHEMA, B.; CROSS, E.; DUN, E.; PARK, S.; BEDELL, J.; SLADE, B.; WILLIANS, M.; RILEY, L.; CHATURVEDI, V.; PERLIN, D. S. Prevalence of vaginal colonization by drug-resistant *Candida* species in college-age women with previous exposure to over-the-counter azole antifungals. **Clinical of Infectious Diseases**, v. 33, p. 23-27, 2001.

MATHUR, S.; KOISTINEN, G. V.; HORGER, E. O. 3rd; MAHVI, T. A.; FUDENBERG, H. H. Humoral immunity in vaginal candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 15, p. 287-294, 1977.

MATSUMIYA, Y.; KATO, N.; WATANABE, K.; KATO, H. Molecular epidemiological study of the vertical transmission of vaginal *Lactobacillus* species from mothers to newborn infants in Japanese, by arbitrarily primed polymerase chain reaction. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 8, p. 43-49, 2002.

MCLEAN, N. W.; MCGROARTY, J.A. Growth inhibition of metronidazole-susceptible and metronidazole-resistant strains of *Gardnerella vaginalis* by lactobacilli *in vitro*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1089–1092, 1996.

MIJAC, V. D.; DUKIĆ, S. V.; OPAVSKI, N. Z.; DUKIĆ, M. L.; RANIN, L. T. Hydrogen peroxide producing lactobacilli in women with vaginal infections. **European Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 129, p. 69-76, 2006.

MIKAMO, H.; KAWAZOE, K.; IZUMI, K.; WATANABE, K.; UENO, K.; TAMAYA, T. Comparative study on vaginal or oral treatment of bacterial vaginosis. **Chemotherapy**, v. 43, p. 60-68, 1997.

MIKAMO, H.; KAWAZOE, K.; SATO, Y.; HAYASAKI, Y.; TAMAYA, T. Comparative study on the effectiveness of antifungal agents in different regimens against vaginal candidiasis. **Chemotherapy**, v. 44, p. 364-368, 1998.

MILANI, M.; BARCELLONA, E.; AGNELLO, A. Efficacy of combination of 2g oral tinidazole and acid buffering vaginal gel in comparison with vaginal clindamycin alone in bacterial vaginosis: a randomized, investigator-blinded, controlled trial. **European Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 109, p. 67-71, 2003.

MOHANTY, K. C.; DEIGHTON, R. Comparison of 2g single dose of metronidazole, nimorazole and tinidazole in the treatment of vaginitis associated with *Gardnerella vaginalis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 19, p. 393-399, 1987.

MOHANTY, S.; XESS, I.; HASAN, F.; KAPIL, A.; MITTAL, S.; TOLOSA, J. E. Prevalence and susceptibility to fluconazole of *Candida* species causing vulvovaginitis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 126, p. 216-219, 2007. [Resumo].

MONTVILLE, T. J.; KAISER, A. Antimicrobial proteins: classification, nomenclature, diversity and relationship to bacteriocins. In: HOOVER, D. G.; STEENSON, L. R. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. New York: Academic Press, 1993. p. 1-22.

MOREIRA, J. L.; MOTA, R. M.; HORTA, M. F.; TEIXEIRA, S. M. R.; NEUMANN, E.; NICOLI, J. R.; NUNES, A. C. Identification to the species level of *Lactobacillus* isolated in probiotic prospecting studies of human, animal or food origin by 16S-23S rRNA restriction profiling. **BMC Microbiology**, v. 5, n. 15, 2005. (doi: 10.1186/1471-2180-5-15).

MORELLI, L..; ZONENENSCHAIN, D.; DEL PIANO, M.; COGNEIN, P. Utilization of the intestinal tract as a delivery system for urogenital probiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 38, p. 107-110, 2004.

MORRIS, M.; NICOLL, A.; SIMMS, I.; WILSON, J.; CATCHPOLE, M. Bacterial vaginosis: a public health review. **British Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 108, p. 439-450, 2001.

MOTA, A.; PRIETO, E.; CARNALL, V.; EXPOSTO, F. Evaluation of microscopy methods for diagnosis of bacterial vaginosis. **Acta Médica Portuguesa**, v. 13, p. 77-80, 2000.

MOUDGAL, V. V.; SOBEL, J. D. Antifungal drugs in pregnancy: a review. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 2, p. 475-483, 2003.

MYER, L.; KUHN, L.; DENNY, L.; WRIGHT, T. C. JR. Recurrence of symptomatic bacterial vaginosis in women over the course of a 12-month period after oral metronidazole therapy in HIV-positive and –negative women. **Journal of Infectious Diseases**, v. 194, p. 1797-1799, 2006.

NAGY, E.; FROMAN, G.; MARDTH, P. A. Fibronectin binding of *Lactobacillus* species isolated from women with and without bacterial vaginosis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 37, p. 38-42, 1992.

NAGY, E.; PETTERSON, M.; MARDTH, P. A. Antibiosis between bacteria isolated from the vagina of women with and without signs of bacterial vaginosis. **Acta Pathologica, Microbiologica. & Immunologica Scandinavica**, v. 99, p. 739-744, 1991. [Resumo].

NAIDU, A. S.; BIDLACK, W. R.; CLEMENS, R. A. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 39, p. 13-126, 1999.

NAILOR, M. D.; SOBEL, J. D. Tinidazole for bacterial vaginosis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 5, p. 343-348, 2007.

NAVARATNA M.; SAHL H. G.; TAGG J. R. Two-component anti-*Staphylococcus aureus* lantibiotic activity produced by *Staphylococcus aureus* C55. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4803-4808, 1998.

NERI, A.; RABINERSON, D.; KAPLAN, B. Bacterial vaginosis: drugs versus alternative methods. **Obstetrical and Gynecology Survey**, v. 49, p. 809-813, 1994.

NIKOLAITCHOUK, N.; WACHER, C.; FALSEN, E.; ANDERSCH, B.; COLLINS, M. D.; LAWSON, P. A. *Lactobacillus coleohominis* sp. nov., isolated from human sources. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2081-2085, 2001.

NORD, C. E.; KAGER, L. Tinidazole: microbiology, pharmacology and efficacy in anaerobic infections. **Infection**, v. 11, p. 54-60, 1983.

NORGAARD, M.; PEDERSEN, L.; GISLUM, M.; ERICHSEN, R.; SOGAARD, K. K.; SCHONHEYDER, H. C.; SORENSEN, H. T. Maternal use of fluconazole and risk of congenital malformations: a Danish population-based cohort study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 172-176, 2008.

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, p. 297-301, 1991.

O'BRIEN, J.; CRITTENDEN, R.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. Safety evaluation of probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 418-424, 1999.

O'BRIEN, G.; SERWINT, J. R. Bacterial vaginosis. **Pediatrics in Review**, v. 29, p. 209-211, 2008.

OCAÑA, V. S.; NADER-MACÍAS, M. E. Vaginal lactobacilli: self-and co-aggregating ability. **British Journal of Biomedical Science**, v. 59, p. 183-190, 2002.

OCAÑA, V. S.; PESCE DE RUIZ HOLGADO, A. A.; NADER-MACÍAS, M. E. Selection of vaginal H_2O_2-generating *Lactobacillus* for probiotic use. **Current Microbiology**, v. 38, p. 279-284, 1999.

ODDS, F. C.; BERNAERTS, R. CHROMagar Candida, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p. 1923-1929, 1994.

O-PRASERTSAWAT, P.; BOULERT, A. Comparative study of fluconazole and clotrimazole for the treatment of vulvovaginal candidiasis. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 22, p. 228-230, 1995.

ORLA-JENSEN, S. **The lactic acid bacteria**. Copenhagen: Andr. Fred. Host and Son, 1919.

OWEN, M. K.; CLENNEY, T. L. Management of vaginitis. **American Family Physician**, v. 70, p. 2125-2132, 2004.

PAAVONEN, J. Physiology and ecology of the vagina. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases Supplement**, v. 40, p. 31-35, 1983.

PASCUAL, L. M.; DANIELE, M. B.; PÁJARO, C.; BARBERIS, L. *Lactobacillus* species isolated from the vagina: identification, hydrogen peroxide production and nonoxynol-9 resistance. **Contraception**, v. 73, p. 78-81, 2006.

PASCUAL, L. M.; DANIELE, M. B.; RUIZ, F.; GIORDANO, W.; PÁJARO, C.; BARBERIS, L. *Lactobacillus rhamnosus* L60, a potential probiotic isolated from the human vagina. **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 54, p. 141-148, 2008.

PATEL, D. A.; GILLESPIE, B.; SOBEL, J. D.; LEAMAN, D.; NYIRJESY, P.; WEITZ, M. V.; FOXMAN, B. Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis in women receiving maintenance antifungal therapy: results of a prospective cohort study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 190, p. 644-653, 2004.

PATEL, Y.; GOPALAN, S.; BAGGA, R.; SHARMA, M.; CHOPRA, S.; SETHI, S. A randomized trial comparing a polyherbal pessary (a complementary and alternative medicine) with Ginlac-V pessary (containing clotrimazole, tinidazole and lactobacilli) for the treatment of women with symptomatic vaginal discharge. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 278, p. 341-347, 2008.

PAULITSCH, A.; WEGER, W.; GINTER-HANSELMAYER, G.; MARTH, E.; BUZINA, W. A-5-year (2000-2004) epidemiological survey of *Candida* and non-*Candida* yeast species causing vulvovaginal candidiasis in Graz, Austria. **Mycoses**, v. 49, p. 471-475, 2006.

PERDIGÓN, G.; DE MACIAS, M. E.; ALVAREZ, S.; OLIVER, G.; DE RUIZ HOLGADO, A. A. Effect of perorally administered lactobacilli on macrophage activation in mice. **Infection and Immunity**, v. 53, p. 404-410, 1986.

PERDIGÓN, G.; DE MACIAS, M. E.; ALVAREZ, S.; OLIVER, G.; DE RUIZ HOLGADO, A. P. Systemic augmentation of the immune response in mice by feeding fermented milks with *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*. **Immunology**, v. 63, p. 17-23, 1988.

PEUHKURI, K.; LÄHTEENMÄKI, T.; SIEVI, E.; SAXELIN, M.; VAPAATALO, H.; KORPELA, R. Antioxidative properties of *Lactobacillus* GG measured as prostacyclin and nitric oxide production in endothelial cell culture. **Nutrition Today**, v. 31, 53-54, 1996.

PFALLER, M. A.; HOUSTON, A.; COFFMANN, S. Application of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida* (*Torulopsis*) *glabrata*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 58-61, 1996.

PHEIFER, T. A.; FORSYTH, P. S.; DURFEE, M. A.; POLLOCK, H. M.; HOLMES, K. K. Nonspecific vaginits: role of *Haemophilus vaginalis* and treatment with metronidazole. **New England Journal of Medicine**, v. 298, p. 1429-1434, 1978.

PIARD, J. C.; DESMAZEAUD, M. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1: Oxygen metabolites and catabolism end products. **Le Lait**, v. 71, p. 525-541, 1991.

PIROTTA, M. V.; GARLAND, S. M. Genital *Candida* species detected in samples from women in Melbourne, Australia, before and after treatment with antibiotics. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 3213-3217, 2006.

PIROTTA, M.; GUNN, J.; CHONDROS, P.; GROVER, S.; O'MALLEY, P.; HURLEY, S.; GARLAND, S. Effect of *Lactobacillus* in preventing post-antibiotic vulvovaginal candidiasis: a randomized controlled trial. **British Medical Journal**, v. 329, n. 7465, 2004. (doi: 10.1136/bmj.38210.494.977.DE)

POWELL, B. L.; DRUTZ, D. I. Estrogen receptor in *Candida albicans*. A possible explanation for hormonal influences in vaginal candidiasis. In: 23rd INTERSCIENCE CONFERENCE ON ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Las Vegas. **Abstract**, n. 751, p. 222, 1983.

PRIESTLY, C. F. J.; KINGHORN, G. R. Bacterial vaginosis. **British Journal of Clinical Practice**, v. 50, p. 331-334, 1996.

RAETHER, W.; HÄNEL, H. Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. **Parasitology Research**, v. 90, p. 19-39, 2003.

RALPH, S. G.; RUTHERFORD, A. J.; WILSON, J. D. Influence of bacterial vaginosis on conception and miscarriage in the first trimester: a cohort study. **British Medical Journal**, v. 319, p. 220-223, 1999.

RAUH, V. A.; CULHANE, J. F.; HOGAN, V. K. Bacterial vaginosis, a public health problem for women. **Journal of the American Medical Women's Association**, v. 55, p. 220-224, 2000.

RAZ, R.; STAMM, W. E. A controlled trial of intravaginal estriol in postmenopausal women with recurrent urinary tract infections. **New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 753-756, 1993.

REDONDO-LOPEZ, V.; COOK, R. L.; SOBEL, J. D. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 12, p. 856-872, 1990.

REES, P. H.; MCGLASHAN, H. E.; MWEGA, V. Single-dose treatment of vaginal trichomoniasis with tinidazole. **East African Medicine**, v. 51, p. 782-785, 1974.

REESE, J.; PARIA, B. C.; BROWN, N.; ZHAO, X.; MORROW, J. D.; DEY, S. K. Coordinated regulation of fetal and maternal prostaglandins directs successful birth and postnatal adaptation in the mouse. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 97, p. 9759-9764, 2000.

REID, G. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 437-443, 2001.

REID, G. Probiotics in the treatment of diarrheal diseases. **Current Infectious Diseases Reports**, v. 2, p. 78-83, 2000.

REID, G. Probiotic lactobacilli for urogenital health in women. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 42, p. 234-236, 2008.

REID, G. Safe and efficacious probiotics: what are they? **Trends in Microbiology**, v. 14, p. 348-352, 2006.

REID, G. Safety of *Lactobacillus* strains as probiotic agents. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p. 349-350, 2002.

REID, G. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 3763-3766, 1999.

REID, G.; BEUERMAN, D.; HEINEMANN, C.; BRUCE, A. W. Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 32, p. 37-41, 2001. (b)

REID, G.; BOCKING, A. The potential for probiotics to prevent bacterial vaginosis and preterm labor. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 189, p. 1202-1208, 2003.

REID, G.; BRUCE, A. W. Probiotics to prevent urinary tract infections: the rationale and evidence. **World Journal of Urology**, v. 24, p. 28-32, 2006.

REID, G.; BRUCE, A. W. Urogenital infections in women: can probiotics help? **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 79, p. 428-432, 2003.

REID, G.; BRUCE, A. W.; FRASER, N.; HEINEMANN, C.; OWEN, J.; HENNING, B. Oral probiotics can resolve urogenital infections. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 30, p. 49-52, 2001. (a)

REID, G.; BRUCE, A. W.; TAYLOR, M. Instillation of *Lactobacillus* and stimulation of the indigenous organisms to prevent recurrence of urinary tract infections. **Microecology and Therapy**, v. 23, p. 32-45, 1995.

REID, G.; BURTON, J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 319-324, 2002.

REID, G.; CHARBONNEAU, D.; ERB, J.; KOCHANOWSKI, B.; BEUERMAN, D.; POEHNER, R.; BRUCE, A. W. Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 35, p. 131-134, 2003.

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, p. 330-335, 1987.

REID, G.; CUPERUS, P. L.; BRUCE, A. W.; VAN DER MEI, H. C.; TOMECZEK, L.; KHOURY, A. H.; BUSSCHER, H. J. Comparison of contact angles and adhesion to hexadecane of urogenital, dairy, and poultry lactobacilli: effect of serial culture passages. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 1549-1553, 1992.

REID, G.; DEVILLARD, E. Probiotics for mother and child. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 38, p. 94-101, 2004.

REID, G.; HAMMOND, J.-A.; BRUCE, A. W. Effect of lactobacilli oral supplement on the vaginal microflora of antibiotic treated patients: randomized, placebo-controlled study. **Nutraceuticals and Food**, v. 8, p. 145-148, 2003.

REID, G.; KIM, S. O.; KÖHLER, G. A. Selecting, testing and understanding probiotic microorganisms. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 46, p. 149-157, 2006.

REID, G.; TIESZER, C.; LAM, D. Influence of lactobacilli on the adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* to fibers and epithelial cells. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 15, p. 248-253, 1995.

RIVERA-SÁNCHEZ, R.; FLORES-PAZ, R.; ARRIAGA-ALBA, M. Identificación de especies de *Candida* causantes de vaginitis en la población mexicana. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 24, p. 634-636, 2006.

ROBERTS, J. A.; KRUGER, P.; PATERSON, D. L.; LIPMAN, J. Antibiotic resistance – what's dosing got to do with it? **Critical Care Medicine**, v. 36, p. 2433-2440, 2008.

RODIER, M. H.; EL MOUDNI, B.; KAUFFMANN-LACROIX, C.; DANIAULT, G.; JACQUEMIN, J. L. A *Candida albicans* mettalopeptidase degrades constitutive proteins of extracellular matrix. **FEMS Microbiology Letters**, v. 177, p. 205-210, 1999.

ROEBUCK, K. A. Oxidant stress regulation of IL-8 and ICAM-1 gene expression: differential activation and binding of the transcription factors AP-1 and NF-KappaB. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 4, p. 223-230, 1999.

ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. Species differentiation of human vaginal lactobacilli. **Journal of Genitourinary Microbiology**, v. 23, p. 197-201, 1960.

ROSS, R. A.; LEE, M. L. T.; ONDERDONK, A. B. Effect of *Candida albican*s infection and clotrimazole treatment on vaginal microflora *in vitro*. **Obstetrics and Gynecology**, v. 86, p. 925-930, 1995.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 1-16, 2006.

SALMINEN, S.; DEIGHTON, M. A.; BENNO, Y.; GORBACH, S. L. Lactic acid bacteria in health and disease. In: SALMINEN, S.; VON WRIGHT, A. **Lactic acid bacteria:** microbiology and functional aspects. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 211-253.

SANGRADOR, C. O.; BOUZA, J. M. E.; MENDEZ, C. P.; GALIANA, L. I. Etiología de las infecciones del tracto urinario y sensibilidad de los uropatógenos a los antimicrobianos. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 18, p. 124-135, 2005.

SAUNDERS, S.; BOCKING, A.; CHALLIS, J.; REID, G. Effect of *Lactobacillus* on *Gardnerella vaginalis* biofilms. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 55, p. 138-142, 2007.

SCHALLER, M.; MAILHAMMAR, R.; KORTING, H. C. Cytokine expression induced by *Candida albicans* in a model of cutaneous candidosis based on reconstituted human epidermis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 51, p. 672-676, 2002.

SCHWEBKE, J. R. Asymptomatic bacterial vaginosis: response to therapy. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 183, p. 1434-1439, 2000.

SHEARY, B.; DAYAN, L. Recurrent vulvovaginal candidiasis. **Australian Family Physician**, v. 34, p. 147-150, 2005.

SHIRAKI, Y.; ISHIBASHI, Y.; HIRUMA, M.; NISHIKAWA, A.; IKEDA, S. *Candida albicans* abrogates the expression of interferon-gamma-inducible protein-10 in human keratinocytes. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 54, p. 122-128, 2008.

SHOUBNIKOVA, M.; HELLBERG, D.; NILSSON, S.; MÄRDTH, P. A. Contraceptive use in women with bacterial vaginosis. **Contraception**, v. 55, p. 355-358, 1997.

SHREINER, A.; HUFFNAGLE, G. B..; NOVERR, M. C. The “microflora” hypothesis of allergic diseases. **Advances in Experimental Medical Biology**, v. 635, p. 113-134, 2008.

SHROFF, K. E.; MESLIN, K.; CEBRA, J. J. Commensal enteric bacteria engender a self limiting humoral mucosal intestine response while permanently colonizing the gut. **Infection and Immunity**, v. 63, p. 3904-3913, 1995.

SLATKO, B. E.; ALBRIGHT, L. M.; TABOR, S.; JU, J. DNA sequencing by the dideoxy method. **Current Protocols in Molecular Biology**, capítulo 7: unidade 7.4A, 2001.

SOBEL, J. D. Bacterial vaginosis. **Annual Review of Medicine**, v. 51, p. 349-356, 2000.

SOBEL, J. D. Candidal vulvovaginitis. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 36, p. 153-165, 1993.

SOBEL, J. D. Vaginitis. **New England Journal of Medicine**, v. 337, p. 1896-1903, 1997.

SOBEL, J. D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**, v. 369, p. 1961-1971, 2007.

SOBEL, J. D. Vulvovaginitis due to *Candida glabrata*. An emerging problem. **Mycoses**, v. 41, p. 18-22, 1998.

SOBEL, J. D.; BROOKER, D.; STEIN, G. E.; THOMASON, J. L.; WERMEILING, D. P.; BRADLEY, B; WEINSTEIN, L. Single oral dose fluconazole compared with conventional clotrimazole topical therapy of *Candida* vaginitis. Fluconazole vaginitis study group. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 172, p. 1263-1268, 1995.

SOBEL, J.; CHAIM, W. Vaginal microbiology of women with acute recurrent vulvovaginal candidiasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2497-2499, 1996.

SOBEL, J. D.; FARO, S.; FORCE, R. W.; FOXMAN, B.; LEDGER, W. J.; NYIRJESY, P. R.; REED, B. D; SUMMERS, P. R. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 178, p. 203-211, 1998.

SOBEL, J. D.; KAPERNICK, P. S.; ZERVOS, M.; REED, B. D.; HOOTON, T.; SOPER, D.; NYIRJESY, P.; HEINE, M. W.; WILLIEMS, J.; PANZER, H.; WITTES, H. Treatment of complicated *Candida* vaginitis: comparison of single and sequential doses of fluconazole. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 185, p. 363-369, 2001.

SONG, Y. L.; KATO, N.; MATSUMIYA, Y.; LIU, C. X.; KATO, H.; WATANABE, K. Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from Japanese women and newborn infants. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 3062-3064, 1999. (a)

SONG, Y.; KATO, N.; MATSUMIYA, Y.; LIU, C. X.; KATO, H.; WATANABE, K. Identification of *Lactobacillus* species of human origin by a commercial kit, API50CHL. **Rinsho Biseibutshu Jinsoku Shindan Kenkyukai Shi**, v. 10, p. 77-82, 1999. (b) [Resumo].

SPEAR, G. T.; ZARIFFARD, M. R.; COHEN, M. H.; SHA, B. E. Vaginal IL-8 levels are positively associated with *Candida albicans* and inversely with lactobacilli in HIV-infected women. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 78, p. 76-79, 2008.

STANEK, R.; GAIN, R. E.; GLOVER, D. D.; LARSEN, B. High performance ion exclusion chromatographic characterization of the vaginal organic acids in women with bacterial vaginosis. **Biomedical Chromatography**, v. 6, p. 231-235, 1992.

STEELE, C.; FIDEL, P. L. JR. Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans*. **Infection and Immunity**, v. 70, p. 577-583, 2002.

STOYANCHEVA, G. D.; DANOVA, S. T.; BOUDAKOV, I. Y. Molecular identification of vaginal lactobacilli isolated from Bulgarian women. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 90, p. 201-210, 2006.

STRÖM, K.; SJÖGREN J.; BROBERG A.; SCHNÜRER, J. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo (L-Phe-L-Pro) and cyclo (L-Phe-*trans*-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4322-4327, 2002.

STRUS, M.; BRZYCHCZY-WŁOCH M.; GOSIEWSKI T.; KOCHAN P.; HECZKO P. B. The *in vitro* effect of hydrogen peroxide on vaginal microbial communities. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 48, p. 56-63, 2006.

SÜTAS, Y.; HURME, M.; ISOLAURE, E. Down-regulation of anti-CD3 antibody-induced IL-4 production by bovine caseins hydrolyzed with *Lactobacillus casei* GG-derived enzymes. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 43, p. 687-689, 1996.

SÜTAS, Y.; SOPPI, E.; KORHONEN, H.; SYVÄOJA, E. L.; SAXELIN, M.; ROKKA, T.; ISOLAURI, E. Suppression of lymphocyte proliferation *in vitro* by bovine caseins hydrolyzed with *Lactobacillus casei* GG-derived enzymes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 98, p. 216-224, 1996.

TAGG, J. R.; DAJANI, A. S.; WANNAMAKER, L. W. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 40, p. 722-756, 1976.

TANNOCK, G. W. The bowel microflora: an important source of urinary tract pathogens. **World Journal of Urology**, v. 17, p. 339-344, 1999.

TARRY, W.; FISHER, M.; SHEN, S.; MAWHINNEY, M. *Candida albicans*: the estrogen target for vaginal colonization. **Journal of Surgical Research**, v. 129, p. 278-282, 2005.

TILSALA-TIMISJÄRVI, A.; ALATOSSAVA, T. Development of oligonucleotide primers from 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, p. 49-56, 1997.

TINTELNOT, K.; HAASE, G.; SEIBOLD, M.; BERGMANN, F.; STAEMMLER, M.; FRANZ, T.; NAUMANN, D. Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. **Journal of Clinical and Microbiology**, v. 38, p. 1599-1608, 2000.

TOLNAI, S. A method for viable cell count. **Methods in Cell Science**, v. 1, p. 37-38, 1975.

TOMÁS, M. S.; 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, p. 35-44, 2003.

TOMÁS, M. S. J.; OTERO, C. M.; OCAÑA, V.; ELENA NADER-MACIAS, M. Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria determination of hydrogen peroxide. **Methods in Molecular Biology**, v. 268, p. 337-346, 2004.

TRIFONOVA, R. T.; BAJPAI, M.; PASICZNYK, J. M.; CHANDRA, N.; DONCEL, G. F.; FICHOROVA, R. N. Biomarkers of leukocyte traffic and activation in the vaginal mucosa. **Biomarkers**, v. 12, p. 608-622, 2007.

VACHEVA-DOBREVSKI, R.; KOVACHEV, S.; NACHEVA, A.; STOEV, S.; VASILEV, N. Comparative study of itraconazole and fluconazole therapy in vaginal candidosis. **Akusherstvo i Ginekologiia**, v. 43, p. 20-23, 2004. [Resumo].

VALLOR, A. C.; ANTONIO, M. A.; HAWES, S. E.; HILLIER, S. L. Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: role of hydrogen peroxide production. **Journal of Infectious Diseases**, v. 184, p. 1431-1436, 2001.

VALORE, E. V.; PARK, C. H.; IGRETI, S. L.; GANZ, T. Antimicrobial components of vaginal fluid. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 187, p. 561-568, 2002.

VANDEN-BOSSCHE, H.; ENGELEN, M.; ROCHETTE, F. Antifungal agents of use in animal health – chemical, biochemical and pharmacological aspects. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, p. 5-29, 2003.

VÁSQUEZ, A.; JAKOBSSON, T.; AHRNÉ, S.; FORSUM, U.; MOLIN, G. Vaginal *Lactobacillus* flora of healthy Swedish women. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 2746-2749, 2002.

VELRAEDS, M. M.; VAN DE BELT-GRITTER, B.; VAN DER MEI, H. C.; REID, G.; BUSSCHER, H. Interference in initial adhesion of uropathogenic bacteria and yeast to silicone rubber by a *Lactobacillus acidophilus* biosurfactant. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, p. 1081-1085, 1998.

VELRAEDS, M. M.; VAN DER MEI, H. C.; REID, G.; BUSSCHER, H. J. Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biossurfactants from *Lactobacillus* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 1958-1963, 1996.

VENTURA, M.; CASAS, I. A.; MORELLI, L.; CALLEGARI, M. L. Rapid amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) identification of *Lactobacillus* spp. isolated from fecal and vaginal samples. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 23, p. 504-509, 2000.

VITALI, B.; PUGLIESE C.; BIAGI E.; CANDELA M.; TURRONI S.; BELLEN G.; DONDERS, G. G.; BRIGIDI, P. Dynamics of vaginal bacterial communities in women developing bacterial vaginosis, candidiasis, or no infection, analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 5731-5741, 2007.

WAGENLEHNER, F. M. E.; NABER, K. G. New drugs for Gram-positive uropathogens. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, p. 39-43, 2004.

WALTER, J.; TANNOCK, G. W.; TILSALA-TIMISJÄRVI, A.; RODTONG, S.; LOACH, D. M.; MUNRO, K.; ALATOSSAVA, T. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 297-303, 2000.

WEINBERG, A.; KRISANAPRAKORNKIT, S.; DALE, B. A. Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 9, p. 399-414, 1998.

WHITTENBURY, R. Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. **Journal of Genitourinary Microbiology**, v. 35, p. 13-26, 1964.

WILKS, M.; WIGGINS, R.; WHILEY, A.; HENNESSY, E.; WARWICK, S.; PORTER, H.; CORFIELD, A.; MILLAR, M. Identification and H_2O_2 production of vaginal lactobacilli from pregnant women at high risk of preterm birth and relation with outcome. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 713-717, 2004.

WILLIAMS, A. B.; YU, C.; TASHIMA, K.; BURGESS, J.; DANVERS, K. Evaluation of two self-care treatments for prevention of vaginal candidiasis in women with HIV. **Journal of General Microbiology**, v. 12, p. 51-57, 2001.

WILLINGER, B.; MANAFI, M. Evaluation of CHROMagar Candida for rapid screening of clinical specimens for *Candida* species. **Mycoses**, v. 42, p. 61-65, 1999.

WIRA, C. R.; ROSSOLI, R. M. Antigen-presenting cells in the female reproductive tract: influence of the estrous cycle on antigen presentation by uterine epithelial and stromal cells. **Endocrinology**, v. 136, p. 4526-4534, 1995.

ZDOLSEK, B., HELLBERG D.; FRÖMAN G.; NILSSON, S.; MÄRDH, P. A. Vaginal microbiological flora and sexually transmitted diseases in women with recurrent or current vulvovaginal candidiasis. **Infection**, v. 23, p. 81-84, 1995.

ZHONG, W.; MILLSAP, K.; BIALKOWSKA-HOBRZANSKA, H.; REID, G. Differentiation of *Lactobacillus* species by molecular typing. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2418-2423, 1998.

ZHOU, X.; BENT, S. J.; SCHNEIDER, M. G.; DAVIS, C. C.; ISLAM, M. R.; FORNEY, L. J. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. **Microbiology**, v. 150, p. 2565-2573, 2004.

ZOZAYA-HINCHILIFFE, M.; MARTIN, D. H.; FERRIS, M. J. Prevalence and abundance of uncultivated *Megasphaera*-like-bacteria in the human vaginal environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 1656-1659, 2008.

APÊNDICES

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP/SP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos – Resolução nº 196 de 10/10/96 – CNS)

I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

NOME DA PACIENTE .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº .....
DATA DE NASCIMENTO .....
ENDEREÇO .....
Nº ..... COMPLEMENTO ..... CEP.....
CIDADE ..... ESTADO ..... TELEFONE .....

II. DADOS SOBRE O ESTUDO

TÍTULO: "Efeito da utilização de culturas láticas probióticas na microbiota vaginal de pacientes acometidas por infecções bacterianas e fúngicas"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL PRINCIPAL: Rafael Chacon Ruiz Martinez
RESPONSÁVEL CLÍNICO: Dr. Sílvio Antônio Franceschini

COORDENADOR DO PROJETO: Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis
Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP
INÍCIO DO ESTUDO: Maio/2005
DURAÇÃO: 2 anos

III. EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

PACIENTES SAUDÁVEIS

1. Esclarecimentos à paciente: A vagina é constituída por microrganismos conhecidos como lactobacilos, que funcionam como uma barreira natural contra agentes causadores de infecções vaginais (vaginose bacteriana e candidíase vulvovaginal). Estas doenças atingem milhões de pessoas no mundo e causam grande desconforto nas pacientes, tais como: corrimento, coceira, mau odor e sensação de queimação. Além disso, também é sabido que mulheres com vaginose bacteriana têm maior probabilidade de apresentar infecções pélvicas, infertilidade e de contrair doenças sexualmente transmissíveis. No caso de mulheres com candidíase vulvovaginal, acredita-se que a infecção seja perigosa em pacientes no último trimestre de gravidez. Estas doenças são normalmente tratadas com medicamentos (antibióticos e antifúngicos) que, apesar de efetivos, podem apresentar efeitos negativos como a destruição dos microrganismos de defesa da vagina, a seleção de microrganismos resistentes aos medicamentos utilizados e efeitos colaterais de intensidade variada (enjôo, náusea, vômito, etc.). Para contornar esses problemas, a empresa Christian Hansen (Dinamarca) e a Urex Biotech. Inc. (Canadá) desenvolveram, em conjunto, um produto chamado Urex-Cap-5® que é composto por duas espécies de lactobacilos e que, através de diversos estudos com pacientes, mostraram-se seguros e eficazes na prevenção e tratamento dessas doenças, sem apresentar os efeitos negativos geralmente observados com o uso dos medicamentos tradicionais. Assim, no presente trabalho, serão avaliados três grupos de pacientes divididos da seguinte forma: 60 pacientes saudáveis (ausência de infecção vaginal), 60 pacientes com vaginose bacteriana e 60 pacientes com candidíase vulvovaginal. Este documento está sendo dirigido às pacientes saudáveis, que, caso estejam aptas, poderão fornecer amostras vaginais coletadas durante uma única consulta com o ginecologista. Este material será utilizado nos exames de rotina e fornecerão dados importantes para compreensão do papel de lactobacilos na microbiota vaginal.

2. Justificativa e objetivo da pesquisa: O objetivo deste projeto é entender um pouco mais sobre o papel das espécies de lactobacilos presentes na vagina de mulheres saudáveis e com infecções vaginais, bem como avaliar o efeito do uso de culturas láticas probióticas na prevenção/tratamento destas infecções vaginais.

3. Procedimentos que serão utilizados e propósitos: As pacientes saudáveis (ausência de infecção vaginal), caso queiram, realizarão uma única consulta com o médico ginecologista, na qual serão coletadas três amostras da parede lateral vaginal. Este material será utilizado no exame de rotina da paciente e será de extrema importância para entendermos um pouco mais sobre o papel protetor dos lactobacilos presentes na microbiota vaginal destas pacientes. As amostras doadas não causarão quaisquer danos à saúde das pacientes e serão extremamente úteis no diagnóstico da paciente.

4. Complicações e riscos esperados: A coleta do material vaginal não trará qualquer problema à saúde da paciente e será de suma importância em seu diagnóstico, uma vez que este material será utilizado como parte dos exames de rotina durante a consulta com o médico ginecologista. Além disso, haverá uma equipe médica responsável que fornecerá a assistência necessária sempre que solicitada.

Todas as informações que a paciente desejar saber serão fornecidas. Se a paciente resolver desistir de participar como voluntária deste trabalho, poderá fazê-lo a qualquer momento, sem constrangimento ou punição, ou deixar de ter a assistência médica que a mesma tem direito. Nós pesquisadores estamos nos comprometendo a manter o sigilo profissional dos resultados obtidos nesta pesquisa, mesmo quando da publicação dos resultados, se positivos ou negativos, e que a identidade da paciente nunca será divulgada. As informações obtidas serão estritamente confidenciais.

5. Benefícios obtidos: A participação de pacientes saudáveis (ausência de infecção vaginal) neste estudo trará como benefícios acompanhamento médico ginecológico e realização de exames que irão colaborar no diagnóstico final da paciente. Não haverá necessidade de repasse de despesas com transporte e alimentação, visto que, a paciente, voluntária, estará sendo selecionada no momento de sua consulta médica ao ginecologista.

IV. QUESTIONÁRIO. RESPONDA POR FAVOR:

a) Fui esclarecida sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento do paciente?

SIM NÃO

b) Fui esclarecida sobre a liberdade de retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo quanto à continuidade do meu tratamento ou qualquer outro atendimento médico neste serviço?

SIM NÃO

c) Fui esclarecida de que não haverá remuneração financeira para a minha inclusão no estudo?

SIM NÃO

d) Fui esclarecida de que não haverá indenização além das previstas pela lei, em reparação a dano imediato aos envolvidos no estudo?

SIM NÃO

e) Fui esclarecida sobre a segurança de que minha identidade será preservada, mantendo-se todas as informações em caráter confidencial?

SIM NÃO

f) Estou ciente de que os resultados desta pesquisa sejam eles favoráveis ou não, serão tornados públicos, sujeitos a publicações científicas?

SIM NÃO

g) Fui esclarecida quanto aos benefícios e riscos deste tratamento e neste momento estou dando meu consentimento para participar dele como voluntária?

SIM NÃO

V. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Declaro que, após ter sido devidamente esclarecida sobre o projeto de pesquisa acima e informada sobre os riscos e benefícios deste estudo, consinto em participar, na qualidade de paciente, deste Projeto de Pesquisa.

Ribeirão Preto, ... de ..... de .....

_____	_____
Assinatura do paciente ou Responsável Legal	Assinatura do médico que obteve o consentimento (carimbo ou nome legível com CRM) Telefone de contato: 3633-2331, ramal 227

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP/SP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos – Resolução nº 196 de 10/10/96 – CNS)

I. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

NOME DA PACIENTE .....
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº .....
DATA DE NASCIMENTO .....
ENDEREÇO .....
Nº ..... COMPLEMENTO ..... CEP.....
CIDADE ..... ESTADO ..... TELEFONE .....

II. DADOS SOBRE O ESTUDO

TÍTULO: "Efeito da utilização de culturas láticas probióticas na microbiota vaginal de pacientes acometidas por infecções bacterianas e fúngicas"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL PRINCIPAL: Rafael Chacon Ruiz Martinez
RESPONSÁVEL CLÍNICO: Dr. Sílvio Antônio Franceschini

COORDENADOR DO PROJETO: Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis
Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP-USP
INÍCIO DO ESTUDO: Maio/2005
DURAÇÃO: 2 anos

III. EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

PACIENTES DIAGNOSTICADAS COM INFECÇÕES VAGINAIS

1. Esclarecimentos à paciente: A vagina é constituída por microrganismos conhecidos como lactobacilos, que funcionam como uma barreira natural contra agentes causadores de infecções vaginais (vaginose bacteriana e candidíase vulvovaginal). Estas doenças atingem milhões de pessoas no mundo e causam grande desconforto nas pacientes, tais como: corrimento, coceira, mau odor e sensação de queimação. Além disso, também é sabido que mulheres com vaginose bacteriana têm maior probabilidade de apresentar infecções pélvicas, infertilidade e de contrair doenças sexualmente transmissíveis. No caso de mulheres com candidíase vulvovaginal, a infecção é particularmente perigosa em pacientes no último trimestre de gravidez. Estas doenças são normalmente tratadas com medicamentos (antibióticos e antifúngicos) que, apesar de efetivos, podem apresentar efeitos negativos como a destruição dos microrganismos de defesa da vagina, a seleção de microrganismos resistentes aos medicamentos utilizados e efeitos colaterais de intensidade variada (enjôo, náusea, vômito, etc.). Para contornar esses problemas, a empresa Christian Hansen (Dinamarca) e a Urex Biotech. Inc. (Canadá) desenvolveram, em conjunto, um produto chamado de Urex-Cap-5® que é composto por duas espécies de lactobacilos e que, através de diversos estudos com pacientes, mostraram-se seguros e eficazes na prevenção e tratamento dessas doenças, sem apresentar os efeitos negativos geralmente observados com o uso dos medicamentos tradicionais. Assim, no presente trabalho, serão avaliados três grupos de pacientes divididos da seguinte forma: 60 pacientes saudáveis (ausência de infecção vaginal), 60 pacientes com vaginose bacteriana e 60 pacientes com candidíase vulvovaginal. Este documento está sendo dirigido às pacientes diagnosticadas com vaginose bacteriana ou candidíase vulvovaginal, que, durante a primeira consulta com o médico ginecologista, poderão, caso optem, doar amostras vaginais que serão empregadas nos exames de rotina e poderão nos ajudar na melhora dos

tratamentos para estas doenças. Às mulheres com vaginose bacteriana ou candidíase vulvovaginal será indicada a melhor opção possível de remédio (antibiótico ou antifúngico) e caso desejem, também receberão um produto (probiótico) para auxiliar no tratamento destas infecções (Urex-Cap-5®) para ser utilizado todos os dias, por via oral (boca), na forma de duas cápsulas por dia (ambas ingeridas no período da manhã), durante 28 (vinte e oito) dias. Após este período, a paciente deverá (caso queira) retornar ao consultório do ginecologista, para ser consultada novamente, onde serão coletadas novas amostras vaginais. Para o controle deste estudo, metade das pacientes diagnosticadas com vaginose bacteriana ou candidíase vulvovaginal que receberão o antibiótico ou antifúngico, irão utilizar o placebo. Tanto as mulheres acometidas por estas infecções, quanto o clínico responsável, não saberão se estarão ingerindo o probiótico ou placebo, e, estes serão distribuídos gratuitamente pelo médico e deverão ser tomados preferencialmente no mesmo horário do dia. Desta maneira, as pacientes que estarão ingerindo o antibiótico ou o antifúngico estarão sendo tratadas adequadamente e o probiótico funcionará como um mecanismo adicional na cura e prevenção contra novas re-infecções vaginais.

2. Justificativa e objetivo da pesquisa: O objetivo deste projeto é entender um pouco mais sobre o papel das espécies de lactobacilos presentes na vagina de mulheres saudáveis e com infecções vaginais, bem como avaliar o efeito do uso de culturas láticas probióticas na prevenção/tratamento destas infecções vaginais.

3. Procedimentos que serão utilizados e propósitos: As pacientes acometidas por infecções vaginais (vaginose bacteriana e candidíase vulvovaginal), serão selecionadas e caso estejam aptas a participar do estudo, fornecerão três amostras da parede vaginal durante a primeira consulta com o médico ginecologista, as quais serão empregadas no exame de rotina da paciente. As amostras doadas não causarão quaisquer danos à saúde das pacientes. Será oferecida a melhor opção possível de remédio (antibiótico ou antifúngico) e caso desejem, também receberão um produto (probiótico) para auxiliar no tratamento destas infecções (Urex-Cap-5®) para ser utilizado todos os dias, por via oral (boca), na forma de duas cápsulas por dia (ambas ingeridas no período da manhã), durante 28 (vinte e oito) dias. Após este período, a paciente deverá (caso queira) retornar ao consultório do ginecologista, para ser consultada novamente, onde serão coletadas outras três amostras vaginais, que também serão utilizadas no diagnóstico da paciente e, mais uma vez, atentamos ao fato de que não causarão quaisquer danos à saúde das pacientes. Para o controle deste estudo, metade das pacientes diagnosticadas com vaginose bacteriana ou candidíase vulvovaginal que receberão o antibiótico ou antifúngico, irão utilizar o placebo. As mulheres acometidas por estas infecções não saberão se estarão ingerindo o probiótico ou placebo, pois estes serão distribuídos aleatoriamente e de forma gratuita pelo clínico responsável e deverão ser tomados preferencialmente no mesmo horário do dia.

4. Complicações e riscos esperados: O produto Urex-Cap-5® é bastante seguro para uso e até hoje só foram descritos raros casos de pacientes que utilizaram o produto e apresentaram dores de cabeça, facilmente tratadas, e outros que apresentaram aumento de apetite; porém, não podemos descartar a possibilidade de uma reação própria de cada paciente, até então, não descrita na clínica. De qualquer maneira, a paciente será alertada que toda reação indesejável e desconfortável deverá ser imediatamente notificada à equipe médica responsável pela pesquisa, que lhe dará toda a assistência necessária, incluindo a mudança de tratamento se for necessário.

Todas as informações que a paciente desejar saber serão fornecidas. Se a paciente resolver desistir de participar como voluntária deste trabalho, poderá fazê-lo a qualquer momento, sem constrangimento ou punição, ou deixar de ter a assistência médica que a mesma tem direito. Nós pesquisadores estamos nos comprometendo a manter o sigilo profissional dos resultados obtidos

nesta pesquisa, mesmo quando da publicação dos resultados, se positivos ou negativos, e que a identidade da paciente nunca será divulgada. As informações obtidas serão estritamente confidenciais.

5. Benefícios obtidos: A participação neste estudo trará como benefícios acompanhamento médico ginecológico, realizações de exames que irão colaborar no diagnóstico final da paciente e monitoramento durante todo o estudo. Não haverá necessidade de repasse de despesas com transporte e alimentação, visto que, a paciente, voluntária, estará sendo selecionada no momento de sua consulta médica ao ginecologista. Quanto aos medicamentos, estes serão fornecidos gratuitamente. As pacientes do grupo placebo ou probiótico serão essenciais para averiguar o papel protetor de culturas láticas probióticas (Urex-Cap-5®) na prevenção/tratamento de infecções vaginais.

IV. QUESTIONÁRIO. RESPONDA POR FAVOR:

a) Fui esclarecida sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento do paciente?

SIM NÃO

b) Fui esclarecida sobre a liberdade de retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo quanto à continuidade do meu tratamento ou qualquer outro atendimento médico neste serviço?

SIM NÃO

c) Fui esclarecida de que não haverá remuneração financeira para a minha inclusão no estudo?

SIM NÃO

d) Fui esclarecida de que não haverá indenização além das previstas pela lei, em reparação a dano imediato aos envolvidos no estudo?

SIM NÃO

e) Fui esclarecida sobre a segurança de que minha identidade será preservada, mantendo-se todas as informações em caráter confidencial?

SIM NÃO

f) Estou ciente de que os resultados desta pesquisa sejam eles favoráveis ou não, serão tornados públicos, sujeitos a publicações científicas?

SIM NÃO

g) Fui esclarecida quanto aos benefícios e riscos deste tratamento e neste momento estou dando meu consentimento para participar dele como voluntária?

SIM NÃO

V. CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Declaro que, após ter sido devidamente esclarecida sobre o projeto de pesquisa acima e informada sobre os riscos e benefícios deste estudo, consinto em participar, na qualidade de paciente, deste Projeto de Pesquisa.

Ribeirão Preto, ... de ..... de .....

_____	_____
Assinatura do paciente	Assinatura do médico
ou Responsável Legal	que obteve o consentimento
	(carimbo ou nome legível com CRM)
	Telefone de contato: 3633-2331, ramal 227

NOME COMPLETO DA PACIENTE: .....

DATA DA CONSULTA: ..... / ..... / ..... – CONSULTA Nº ( ) 1 OU ( ) 2

DIA DO CICLO MENSTRUAL: .....

MENSTRUAÇÃO REGULAR: ( ) SIM ( ) NÃO

INFECÇÃO RECORRENTE (4 OU MAIS CASOS/ANO): ( ) SIM ( ) NÃO

QUEIMAÇÃO: ( ) SIM ( ) NÃO

COCEIRA: ( ) SIM ( ) NÃO

DOR AO URINAR: ( ) SIM ( ) NÃO

DOR DURANTE ATO SEXUAL: ( ) ( ) NÃO

MAU ODOR: ( ) ( ) NÃO

USO DE MÉTODO ANTICONCEPCIONAL: ( ) SIM ..... ( ) NÃO

DIABETES MELLITUS: ( ) SIM ( ) NÃO

BANHO DE ASSENTO COM SECATIVO: ( ) SIM ( ) NÃO

BANHO DE ASSENTO COM VINAGRE: ( ) SIM NÃO ( )

USO DE ANTIBIÓTICO OU ANTIFÚNGICO NOS ÚLTIMOS 15 DIAS: ( ) SIM ( ) NÃO

PERÍODO EM QUE UTILIZOU *APENAS* O PROBIÓTICO:

( ) ALÍVIO DOS SINTOMAS; ( ) ENJÔO; ( ) VÔMITO; ( ) DOR DE CABEÇA; ( )

OUTROS: .....

DETERMINAÇÕES A SEREM REALIZADAS PELO CLÍNICO RESPONSÁVEL:

TESTE DE “WHIFF”: ( ) POSITIVO ( ) NEGATIVO

PH VAGINAL: ( ) INFERIOR OU IGUAL A 4,5 ( ) SUPERIOR A 4,5

CONTEÚDO VAGINAL:

COLORAÇÃO: ..... ( ) HOMOGÊNEO ( ) HETEROGÊNEO ( )

“BOLHAS” ( ) AUSENTE

SINAIS DE COLPITE (VAGINITE): ( ) SIM ( ) NÃO

OUTROS: .....

DETERMINAÇÕES LABORATORIAIS:

COLORAÇÃO DE GRAM:

( ) NORMAL ( ) INTERMEDIÁRIO ( ) VAGINOSE BACTERIANA ( ) LEVEDURAS

PRESENÇA DE LEVEDURAS EM PREPARAÇÃO DE KOH A 10%: ( ) SIM ( ) NÃO

“CLUE CELLS” EM PREPARAÇÃO SALINA: ( ) SIM ( ) NÃO

DIAGNÓSTICO:

AMSEL: ( ) POSITIVO ( ) NEGATIVO

NUGENT: ( ) POSITIVO ( ) NEGATIVO

INFECÇÃO FÚNGICA: ( ) SIM ( ) NÃO

ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ACORDO DE TRANSFERÊNCIA DE MATERIAL

Efetivado em 7 de Abril de 2005 (o "Dia Efetivo"), Dr. Gregor Reid em conjunto com UREX BIOTECH INC. (UREX) e Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis, Professora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, localizada à Avenida do Café, s/n – 14040-903 – Monte Alegre – Ribeirão Preto – SP – Brasil (Receptor), aqui representada por sua Reitora, Profa. Dra. Suely Vilela e por seu Diretor, Prof. Dr. Augusto César Cropanese Spadaro, concordaram mutuamente com as seguintes cláusulas e condições:

Uma vez que UREX possui e controla a propriedade intelectual e outros direitos (*Invenção*) em relação a *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 e *L. reuteri* RC-14 (*Material*); e

Uma vez que o *Material* tenha sido utilizado de maneira segura por mulheres e parece conferir alguns efeitos benéficos à saúde, como descrito em diversos trabalhos científicos publicados; e

Uma vez que o *Receptor* tenha requerido acesso a este Material com finalidade de uso em pesquisa experimental;

Os seguintes termos e condições devem ser aplicados:

1. UREX deve fornecer ao *Receptor* amostras do *Material*. UREX concorda com a utilização deste material pelo *Receptor*, exclusivamente com o propósito de pesquisa: um estudo clínico para determinar o efeito destas duas linhagens fornecidas por Chr Hansen A/S, Dinamarca, na forma de cápsulas, contra vaginose bacteriana e candidíase, e estudos *in vitro* para examinar os mecanismos de ação, de acordo com UREX e *Receptor* (*Uso Permitido)*. O Appêndice 1 fornecido pela professora Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis, refere-se ao projeto final aprovado pelo Comitê de Ética local e o número de cápsulas contendo lactobacilos e placebo necessários para a realização do estudo.

   Em relação ao recebimento do material pelo *Receptor*, este deve:

   (a) Utilizar o *Material* exclusivamente para o *Uso Permitido* e de maneira alguma para uso comercial ou outros estudos em humanos, a menos que o protocolo tenha sido aprovado pela UREX;

   (b) Limitar o acesso do *Material* exclusivamente para aqueles que o requerem para o *Uso Permitido*, e, para aqueles que estão cientes de, ou ligados a este Acordo;

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

(c) Durante a vigência do Termo de Acordo, manter o Dr. Reid informado de achados, incluindo qualquer problema com os microrganismos, inclusive contaminação;

(d) O *Receptor* representa, garante e concorda que não deve, sem o consentimento prévio escrito do Dr. Reid, transferir o uso do *Material* ou qualquer material biológico ligado ou relacionado com o *Material*, para qualquer outro local ou que seja controlado por outras pessoas. É permitido ao *Receptor* publicar os dados dos resultados provenientes do *Uso Permitido* do *Material*, embora deva fornecer a UREX, com trinta dias de antecedência, para revisá-los e oferecer revisões para a publicação, e, caso o Dr. Reid seja indicado como co-autor, poderá retirar seu nome da publicação. A última versão do manuscrito deverá estar de acordo com ambas as partes. Se houver alguma publicação em português, o *Receptor* deverá fornecê-la ao Dr. Reid, traduzindo-a para o inglês.

(e) *Receptor* terá total responsabilidade no manuseio do *Material* e por qualquer cobertura associada com seu uso em humanos.

(f) A propriedade industrial sobre o *Material* pertence à UREX BIOTECH INC. e não é permitido ao *Receptor* qualquer desenvolvimento tecnológico sobre o mesmo.

(g) UREX BIOTECH INC. terá todo direito, título e interesse sobre toda e qualquer invenção feita exclusivamente por seus funcionários ou designados da UREX BIOTECH INC.

(h) A USP terá todo direito, título e interesse sobre toda e qualquer invenção feita pelos funcionários da USP, exceto caso a invenção utilize o *Material* e o *Uso Permitido*.

(i) UREX BIOTECH INC terá direito, título e interesse sobre invenções criadas em conjunto pelos funcionários de UREX BIOTECH INC. e USP utilizando o *Material*. UREX BIOTECH INC. e USP concordam em cooperar e determinar o melhor procedimento de acão para proteger qualquer invenção que surja do *Uso Permitido*, e UREX BIOTECH INC concorda em dividir com a USP qualquer renda gerada de tal invenção.

(j) Este Acordo não deve, por implicação ou de outra maneira, ser construído como uma concessão de licença ou qualquer outro direito além daqueles expressamente colocados aqui. UREX BIOTECH INC. e USP tomarão a liderança em assegurar proteção das patentes. As "Invenções em Conjunto" deverão ser definidas através de contrato específico para esta finalidade, de acordo com regras nacionais e internacionais.

2. Após o término do período do Uso Permitido, que não deve exceder dois anos, a partir da data de assinatura, o Receptor destruirá o material remanescente, a menos que um termo de extensão seja realizado de acordo com a UREX, de forma escrita.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

3. Este Acordo não deve ser realizado para garantir ao Receptor qualquer opção expressa ou implícita, licença ou outros direitos, título ou interesse sobre a *Invenção*. Nada contido neste Acordo deve ser construído pra obrigar a UREX a fornecer o *Material* ou realizar um acordo similar com terceiros.

4. Este Acordo deve ser construído e realizado de acordo com as leis da United Nations Commission on International Trade Law (UNCITRAL). Se qualquer item deste acordo for considerado inválido, ilegal, inaplicável, então, a validade, legalidade e aplicabilidade dos itens remanescentes não devem, de forma alguma, serem prejudicados.

5. Este Acordo deve ser válido para o abaixo-assinado, seus sucessores e não deve ser assinado por qualquer uma das partes, a não ser em sua totalidade e somente com o comprometimento total de ambas as partes.

6. UREX, abaixo-assinado, e Inventor(es) podem ser irreparavelmente prejudicados caso o Material seja transferido para terceiros. Da mesma forma, UREX, pode utilizar medidas equivalentes, incluindo injunção e medidas específicas.

7. UREX não é responsável pela condição do Material no momento da recepção pelo Receptor ou viabilidade dos microrganismos. Embora será certificado pela Christian Hansen com boas condições de manufatura (validade, pureza) do Material, antes que seja entregue ao Receptor.

Em testemunho do presente, as partes concordam plenamente em assinar este Acordo, na(s) data(s) indicada(s) abaixo, para efetivar o Dia Efetivo.

São Paulo, 28 JUN 2006

Profa. Dra. Suely Vilela
Reitora da Universidade de São Paulo

Por Delegação da M. Reitora
Art. 42 do Estatuto da USP
FRANCO MARIA LAJOLO
Vice-Reitor

Prof. Dr. Augusto César Cropanese Spadaro
Diretor da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto

London, ON, Canada, 16/07/2006

Dr. Gregor Reid
UREX BIOTECH INC.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

3. Este Acordo não deve ser realizado para garantir ao Receptor qualquer opção expressa ou implícita, licença ou outros direitos, título ou interesse sobre a *Invenção*. Nada contido neste Acordo deve ser construído pra obrigar a UREX a fornecer o *Material* ou realizar um acordo similar com terceiros.

4. Este Acordo deve ser construído e realizado de acordo com as leis da United Nations Commission on International Trade Law (UNCITRAL). Se qualquer item deste acordo for considerado inválido, ilegal, inaplicável, então, a validade, legalidade e aplicabilidade dos itens remanescentes não devem, de forma alguma, serem prejudicados.

5. Este Acordo deve ser válido para o abaixo-assinado, seus sucessores e não deve ser assinado por qualquer uma das partes, a não ser em sua totalidade e somente com o comprometimento total de ambas as partes.

6. UREX, abaixo-assinado, e Inventor(es) podem ser irreparavelmente prejudicados caso o Material seja transferido para terceiros. Da mesma forma, UREX, pode utilizar medidas equivalentes, incluindo injunção e medidas específicas.

7. UREX não é responsável pela condição do Material no momento da recepção pelo Receptor ou viabilidade dos microrganismos. Embora será certificado pela Christian Hansen com boas condições de manufatura (validade, pureza) do Material, antes que seja entregue ao Receptor.

Em testemunho do presente, as partes concordam plenamente em assinar este Acordo, na(s) data(s) indicada(s) abaixo, para efetivar o Dia Efetivo.

São Paulo, 28 JUN 2006

Profa. Dra. Suely Vilela
Reitora da Universidade de São Paulo

Por Delegação da M. Reitora
Art. 42 do Estatuto da USP
FRANCO MARIA LAJOLO
Vice-Reitor

Prof. Dr. Augusto César Cropanese Spadaro
Diretor da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto

London, ON, Canada, 16/07/2006

Dr. Gregor Reid
UREX BIOTECH INC.

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CENTRO DE SAÚDE ESCOLA

Rua Terezina, 690 – CEP: 14055-380
Ribeirão Preto – SP

Telefone PABX (0**16) 633-2331/4480
FAX (0**16) 6332331

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Saúde Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

OF. N º. 224/05/COORD.CEP/CSE-FMRP-USP. 20/4/2005.

Senhora Professora,

Vimos na presente oportunidade comunicar que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Saúde Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em sua 38ª reunião ordinária, realizada em 19 de abril de 2005, analisou e apreciou o parecer do Senhor Relator, referente ao Projeto de Pesquisa: **"Efeito da utilização de culturas láticas probióticas na microbiota vaginal de pacientes acometidas por infecções bacterianas e fúngicas"**, protocolo:0146/CEP/CSE-FMRP-USP, que será conduzido por V.Sª e pelo orientando Rafael Chacon Ruiz Martinez, foi **aprovado.** Porém, solicitamos que as alterações, referentes às solicitações feitas; sejam incorporadas a uma nova versão e encaminhada a este CEP.

Lembramos que em atendimento à Resolução 196/96, deverá ser encaminhado a este CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seus resultados.

Sendo o que tínhamos para o momento, despedimo-nos.

Atenciosamente,

Profº.Dr. Laércio Joel Franco
Coordenador do CEP/CSE-FMRP-USP

Ilma. Sra.
Profª. Dra. Elaine Cristina Pereira de Martinis
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.