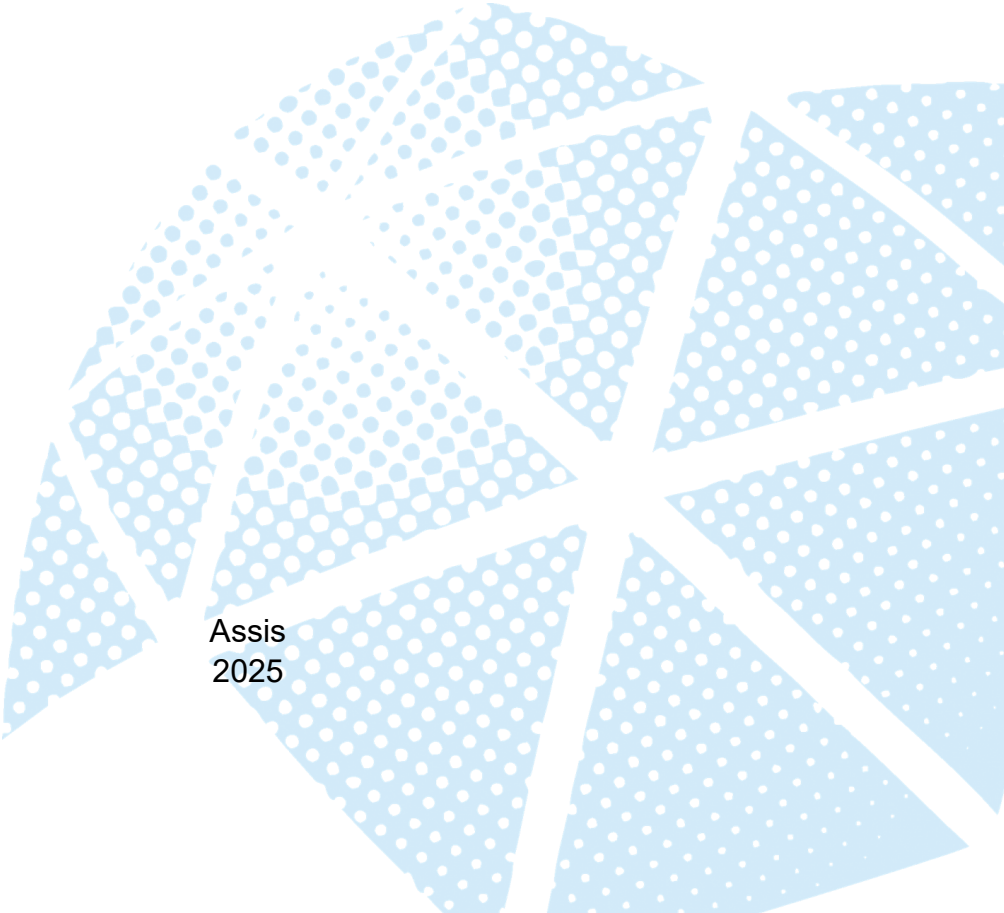


UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Câmpus de São José do Rio
Preto - Unesp - Campus de São José do Rio Preto

Jean Alves Pereira

**INFLUÊNCIA DA AERAÇÃO NO CRESCIMENTO E PARÂMETROS DE CULTIVO
DE DIFERENTES CEPAS DE *LACTOBACILLUS* EM FLUIDO VAGINAL SIMU-
LADO VISANDO POTENCIAL PROBIÓTICO VAGINAL**

Assis
2025



Jean Alves Pereira

**INFLUÊNCIA DA AERAÇÃO NO CRESCIMENTO E PARÂMETROS DE CULTIVO
DE DIFERENTES CEPAS DE *LACTOBACILLUS* EM FLUIDO VAGINAL SIMU-
LADO VISANDO POTENCIAL PROBIÓTICO VAGINAL**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Câmpus de São José do Rio Preto - Unesp, São José do rio preto, para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador(a): Prof. Dr. Prof^a. Dr^a. Valéria
Marta Gomes do Nascimento

Assis
2025

P436i

Pereira, Jean. Influência da aeração no crescimento e parâmetros de cultivo de diferentes cepas de lactobacillus em fluido vaginal simulado visando potencial probiótico vaginal / Jean Pereira. -- São José do Rio Preto, 2025 74 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientadora: Valéria Marta Gomes do Nascimento

1. eubiose. 2. disbiose. 3. probiótico. 4. Lactobacillus. I.

Título. Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

O presente trabalho possui um impacto social significativo, especialmente na promoção da saúde feminina. Ao investigar o comportamento de diferentes cepas de *Lactobacillus* em meio semelhante ao ambiente vaginal, a pesquisa oferece subsídios relevantes para o desenvolvimento de probióticos vaginais capazes de prevenir a disbiose, condição associada a infecções, vaginoses bacterianas e ao aumento do risco de infecção pelo vírus HPV — principal agente etiológico do câncer cervical. Nesse sentido, o estudo contribui diretamente para estratégias de prevenção do câncer do colo do útero, ao propor formas de manter uma microbiota vaginal saudável, que atue como barreira protetora contra patógenos e possíveis alterações celulares de caráter pré-cancerígeno.

Além disso, o trabalho abre perspectivas para o desenvolvimento de terapias complementares ou alternativas ao uso de antibióticos, especialmente em casos de infecções vaginais recorrentes, possibilitando a formulação de produtos probióticos personalizados, mais eficazes e com menor risco de efeitos colaterais. Essa abordagem também representa um avanço para a saúde pública, já que o câncer cervical ainda figura entre as principais causas de morte entre mulheres no Brasil. A adoção de probióticos como medida preventiva pode reduzir significativamente os custos com tratamentos oncológicos e melhorar a qualidade de vida de populações vulneráveis, principalmente daquelas com acesso limitado aos serviços de triagem e tratamento precoce.

Adicionalmente, o uso de fluido vaginal simulado como meio de cultivo representa uma inovação metodológica importante, contribuindo para a microbiologia aplicada à ginecologia e fortalecendo a ponte entre a pesquisa acadêmica e sua aplicação prática. Dessa forma, este estudo se insere no campo da ciência translacional, promovendo o desenvolvimento de soluções terapêuticas com potencial direto de aplicação no Sistema Único de Saúde (SUS), fortalecendo as políticas públicas de saúde voltadas à prevenção de doenças ginecológicas e ao cuidado integral da mulher.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The present study has significant social impact, especially in promoting women's health. By investigating the behavior of different *Lactobacillus* strains in a medium that simulates the vaginal environment, the research provides important insights for the development of vaginal probiotics capable of preventing dysbiosis—a condition associated with infections, bacterial vaginosis, and an increased risk of HPV infection, the main etiological agent of cervical cancer. In this context, the study directly contributes to cancer prevention strategies by proposing ways to maintain a healthy vaginal microbiota that acts as a protective barrier against pathogens and potential precancerous cellular changes.

Furthermore, the work opens perspectives for the development of complementary or alternative therapies to the use of antibiotics, especially in cases of recurrent vaginal infections, allowing the formulation of personalized probiotic products that are more effective and have fewer side effects. This approach also represents a step forward for public health, considering that cervical cancer remains one of the leading causes of death among women in Brazil. The use of probiotics as a preventive measure could significantly reduce oncology treatment costs and improve the quality of life for vulnerable populations, particularly those with limited access to screening and early treatment services.

Additionally, the use of simulated vaginal fluid as a culture medium represents an important methodological innovation, contributing to applied microbiology in gynecology and strengthening the link between academic research and practical application. Thus, this study falls within the field of translational science, promoting the development of therapeutic solutions with direct potential for application within Brazil's Unified Health System (SUS), and strengthening public health policies aimed at preventing gynecological diseases and ensuring comprehensive women's health care.

Jean Alves Pereira

**INFLUÊNCIA DA AERAÇÃO NO CRESCIMENTO E PARÂMETROS DE CULTIVO
DE DIFERENTES CEPAS DE *LACTOBACILLUS* EM FLUIDO VAGINAL SIMU-
LADO VISANDO POTENCIAL PROBIÓTICO VAGINAL**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - Câmpus de São José do Rio Preto - Unesp, São José do rio preto, para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Data da defesa: 28/02/2025

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Valéria Marta Gomes do Nascimento
UNESP – Assis
Orientador

Prof^a. Dr^a. Alessandra Machado Baron
Universidade UTFPR - multicampi Londrina e Apucarana

Prof. Dr. Bruna Escaramboni
UNESP – Assis

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

RESUMO

O câncer cervical é o tipo mais frequente de câncer ginecológico e envolve a divisão celular descontrolada e invasiva na cérvix do útero. Mais de 99% dos tumores de colo de útero apresentam sequências de DNA viral, e por isso, a infecção por vírus do papiloma humano (HPV) é considerada o principal agente etiológico dessa neoplasia. A microbiota vaginal saudável tem sido associada à predominância de diferentes espécies de *Lactobacillus*, sendo considerada uma situação de eubiose. A disbiose é a alteração da comunidade microbiana, com redução de *Lactobacillus* e aumento de outras espécies de bactérias anaeróbicas, condição associada muitas vezes a doenças ginecológicas, incluindo vaginoses, a infecção por HPV e, conseqüentemente, câncer cervical. A microbiota bacteriana é responsável pela síntese de ácido láctico e produção de H_2O_2 , que juntos atuam como antissépticos, criando uma barreira contra agentes patogênicos. Ainda assim, existem muitos fatores a serem elucidados tanto em relação ao efeito protetor desses microrganismos, a sua ação em lesões pré-cancerígenas e cancerígenas, e seus fatores fisiológicos e de cultivo. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da aeração no crescimento de 5 espécies de *Lactobacillus* com potencial probiótico vaginal (*L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. acidophilus* e *L. rhamnosus*), em fluido vaginal simulado (FVS). As cepas foram cultivadas em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de meio MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) ou FVS, estático ou agitados (180 rpm) por até 72 h. A influência de diferentes carboidratos no meio de cultivo foi realizada pela adição de amido, glicose, galactose, frutose e lactose, a 5 g/L. Os resultados indicaram que as espécies de *Lactobacillus* apresentaram diferenças significativas em crescimento e metabolismo, influenciadas pelo meio de cultura e pelas condições de cultivo. O consumo de glicose foi intenso nas primeiras 24 horas, sendo maior no meio MRS. *L. rhamnosus* destacou-se pelo maior crescimento e eficiência na utilização de açúcares, especialmente em cultivos estáticos. *L. crispatus* gerou maior acidez, enquanto *L. johnsonii* cresceu melhor com frutose sob agitação. Todas as cepas consumiram mais de 90% dos monossacarídeos testados, mas não metabolizaram amido. O efeito da agitação variou conforme a cepa, mas, na maioria dos casos, não influenciou significativamente o consumo de açúcar e o pH final.

Palavras-chave: eubiose, disbiose, HPV, câncer cervical, *Lactobacillus*, probiótico

ABSTRACT

Cervical cancer is the most common type of gynecological cancer and involves uncontrolled and invasive cell division in the cervix of the uterus. More than 99% of cervical tumors contain viral DNA sequences, making human papillomavirus (HPV) infection the primary etiological agent of this neoplasm. A healthy vaginal microbiota is associated with the predominance of different *Lactobacillus* species, a condition known as eubiosis. Dysbiosis refers to an alteration in the microbial community, characterized by a reduction in *Lactobacillus* populations and an increase in other anaerobic bacteria, a condition often linked to gynecological diseases, including vaginosis, HPV infection, and, consequently, cervical cancer. Bacterial microbiota plays a crucial role in synthesizing lactic acid and producing H₂O₂, which act as antiseptics, creating a barrier against pathogenic agents. However, many aspects remain to be elucidated regarding the protective effects of these microorganisms, their role in pre-cancerous and cancerous lesions, and their physiological and cultivation factors.

This study aims to evaluate the influence of aeration on the growth of five *Lactobacillus* species with potential vaginal probiotic properties (*L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. acidophilus*, and *L. rhamnosus*) in simulated vaginal fluid (SVF). The microorganisms were obtained from BS Pharma Farmácia de Manipulação (Farmácia BS LTDA | CNPJ: 38.510.020/0001-85). The strains were cultured in 125 mL Erlenmeyer flasks containing 25 mL of De Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) medium or SVF, under static or agitated conditions (180 rpm) for up to 72 hours. The influence of different carbohydrates in the culture medium was assessed by adding starch, glucose, galactose, lactose and fructose at 5 g/L.

The results indicated significant differences in growth and metabolism among *Lactobacillus* species, influenced by the culture medium and cultivation conditions. Glucose consumption was intense during the first 24 hours, being higher in MRS medium. *L. rhamnosus* exhibited the highest growth and sugar utilization efficiency, particularly under static conditions. *L. crispatus* generated the highest acidity, while *L. johnsonii* grew better with fructose under agitation. All strains consumed more than 90% of the tested monosaccharides but did not metabolize starch. The effect of agitation varied depending on the strain, but in most cases, it did not significantly influence sugar consumption or final pH.

Keywords: Eubiosis, dysbiosis, HPV, cervical cancer, *Lactobacillus*, probiotic

Lista de figuras

Figura 1: Ilustração representando os tipos celulares encontrados no colo uterino e as respectivas topografias. Fonte: Atlas de citopatologia ginecológica, Ministério da Saúde, 2012.	15
Figura 2: Representação esquemática demonstrando as relações entre disbiose cervicovaginal e desregulação imunológica relacionada à coinfeção por HPV/C.trachomatis, levando à neoplasia cervical. Fonte: Kumari & Bhor (2021).	20
Figura 3: Composição dos compostos identificados nos meios FVS, destacando as alterações na fonte de carbono e a produção de ácido láctico ao longo do cultivo.	34
Figura 4: Morfologia celular das cepas de Lactobacillus utilizadas no presente estudo. A) L. crispatus; B) L. acidophilus, C) L. johnsonii, D) L. rhamnosus E) L. gasseri. Condições de análise: Coloração de gram, microscópio ótico Olympus CX21, aumento de 1000 v.	39
Figura 5: Análise individual das cepas em meio Fluido Vaginal Simulado (FVS) (A) L. acidophilus, (B) L. rhamnosus, (C) L. crispatus, (D) L. gasseri, (E) L. johnsonii. Cultivos em meio FVS, estáticos (●) ou agitados (■), a 30°C, com contagem em câmara de Neubauer a cada 24 horas. Cultivos controle realizados em meio MRS. As barras de erro representam o desvio padrão e cada ponto corresponde à média de 3 réplicas.	42
Figura 6: Análise comparativa entre as cepas em meio Fluido Vaginal Simulado (FVS), em cultivos estáticos ou agitados (180 rpm), 30 °C, análises a cada 24 h, contagem de células na câmara de Neubauer. Cultivos controle realizados com meio MRS. Figuras A e B: Cultivos em Fluido Vaginal Simulado (FVS) com agitação (A) e estático (B); Figuras C e D: cultivos controle com meio MRS com agitação (C) e estático (D). Microrganismos: L. acidophilus (■); L. gasseri (●); L. rhamnosus (▲); L. johnsonii (▼); L. crispatus (◆).	43
Figura 7: Determinação de glicose nos sobrenadantes de cultivos de Lactobacillus em meio Fluido Vaginal Simulado (FVS) e controle (MRS). Cultivos em FVS com agitação (▼) e estático (▲). Cultivos controle com meio MRS com agitação (●) e estático (■). Condições de cultivo: agitação de 180 rpm, 30° C.	46
Figura 8: Determinação de pH nos sobrenadantes de cultivos de Lactobacillus em meio Fluido Vaginal Simulado (FVS) e controle (MRS). Cultivos em FVS com agitação (●) e estático (■). Cultivos controle com meio MRS com agitação (▼) e estático (▲). Condições de cultivo: agitação de 180 rpm, 30°C.	49
Figura 9: Determinação de crescimento na presença de diversas fontes de carbono em cultivos de Lactobacillus em meio Fluido Vaginal Simulado (FVS). Cultivos em estático (■) e com agitação (■). Condições de cultivo: agitação de 180 rpm, 30°C, 48 h. Microrganismos: L. crispatus ; L. johnsonii ; L. gasseri ; L. rhamnosus ; L. acidophil	53
Figura 10: Determinação de crescimento na presença de dicarrídeos como fonte de carbono em cultivos de Lactobacillus em meio Fluido Vaginal Simulado (FVS) e o Meio controle (MRS). Cultivos em FVS e MRS estático (■) ou com agitação (■). Condições de cultivo: agitação de 180 rpm, 30°C, 48 h. Microrganismos: L. crispatus ; L. johnsonii ; L. gasseri ; L. rhamnosus ; L. acidophilus.	56
Figura 11: Parâmetros de cultivo na presença de amido como fonte de carbono em cultivos de Lactobacillus em meio FVS ou meio controle (MRS). Cultivos estático (■) e agitado (■).	

Condições de cultivo: agitação de 180 rpm, 30°C, 48 h. Microrganismos: L.crispatus ; L. johnsonii ; L. gasseri ; L. rhamnosus ; L. acidophilus.....	58
Figura 12: Determinação de crescimento celular e parâmetros de cultivo em meio FVS contendo glicose como fonte de carbono em cultivos de Lactobacillus crispatus . MRS (●) FVS(■). Condições de cultivo: agitação de 180 rpm, 30°C. Microrganismo: L.crispatus. ...	60
Figura 13: Mecanismo de respiração celular Fonte: http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/Biology/celres.html	64
Figura 14: Estrutura química das fontes de carbono simples (C ₆ H ₁₂ O ₆) (Nelson et al. 2019).	66
Figura 15: Estrutura química da Lactose (Nelson et al. 2019).....	66
Figura 16: Estrutura química do glicogênio (Nelson et al. 2019).....	68
Figura 17: Estrutura química da amilopectina (Nelson et al. 2019).	68

Lista de Tabelas

Tabela 1: Divisão de comunidades bacterianas na microbiota vaginal (Ravel et al., 2011).	21
Tabela 2: Velocidade de consumo de glicose (mg/mL/h) em 24 h por diferentes espécies de Lactobacillus em Fluido Vaginal Simulado (FVS).....	44
Tabela 3: Composição dos meios MRS e FVS utilizados para cultivo das cepas de Lactobacillus - fontes de carbono e nitrogênio	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de Variância

ASC – Célula Escamosa Atípica

ASC-H – Célula Escamosa Atípica – Alto Grau

ASC-US – Célula Escamosa Atípica – Significado Indeterminado

CO₂ – Dióxido de Carbono

SVF – Fluido Vaginal Simulado

D.O. – Densidade Óptica

FVS – Fluido Vaginal Simulado

g/L – gramas por litro

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

HCl – Ácido Clorídrico

HPV – Vírus do Papiloma Humano

HSIL – Lesão Intraepitelial Escamosa de Alto Grau

JEC – Junção Escamocolunar

LDH – Lactato Desidrogenase

LSIL – Lesão Intraepitelial Escamosa de Baixo Grau

MRS – Meio de Cultura De Man, Rogosa e Sharpe

NaCl – Cloreto de Sódio

NaOH – Hidróxido de Sódio

pH – Potencial Hidrogeniônico

rpm – Rotações por Minuto

SIL – Lesão Intraepitelial Escamosa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.2 A relação HPV e câncer cervical	18
1.3 Microbiota do aparelho reprodutor feminino: prevenção e tratamento do câncer cervical	20
1.4 As funções do ácido láctico	23
1.5 Nutrição dos <i>Lactobacillus</i> e o glicogênio	24
1.6 Relação entre disbiose, vaginoses e HPV	26
1.7 Possibilidade de utilização de probióticos para prevenção e tratamento do câncer de colo do útero	28
2. OBJETIVO.....	30
2.1 Objetivo específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Microrganismos	31
3.2 Manutenção das cepas	31
4. CULTIVO DE DIFERENTES LINHAGENS DE <i>LACTOBACILLUS</i>	32
4.1 Cultivo em Fluido Vaginal Simulado (FVS)	32
4.2 Cultivo em meio MRS	32
5. FATORES QUE INFLUENCIAM O CRESCIMENTO DE <i>LACTOBACILLUS</i> EM FLUIDO VAGINAL SIMULADO.....	33
5.1 Influência da aeração nos cultivos de cepas de <i>Lactobacillus</i>	33
5.2 Influência de diferentes carboidratos	33
6. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA OS ESTUDOS DE FERMENTAÇÃO.....	35
6.1 Determinação de pH	35
6.2 Determinação de acidez.....	35
6.3 Determinação de proteínas	35
6.5 Determinação de glicose	35
6.6 Determinação do crescimento celular.....	36
6.7 Morfologia bacteriana	37
6.8. Métodos estatísticos - Análise de Variância (ANOVA) no Software Origin.....	37
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
7.1 Morfologia celular	38
7.2 Influência da aeração na multiplicação celular de cepas de <i>Lactobacillus</i> cultivadas em Fluido Vaginal Simulado (FVS) e glicose.....	39
7.3 Determinação de glicose e proteínas no sobrenadante de cultivo	43
7.4 Determinação de pH e acidez	46
8. INFLUÊNCIA DAS DIFERENTES FONTES DE CARBONO NO CULTIVO DE <i>LACTOBACILLUS</i> EM FLUIDO VAGINAL SIMULADO.	50
8.1 Monossacarídeos (glicose, frutose e galactose).....	50

8.2 Lactose	54
8.3 Amido	57
8.4 Curva de crescimento de <i>Lactobacillus crispatus</i> em glicose	58
9. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	61
9.1 Influência da aeração no crescimento de <i>Lactobacillus</i> em meio FVS.....	62
9.2 Influência de diferentes açúcares no crescimento de <i>Lactobacillus</i> , em meio FVS, estático e agitado.	65
10. CONCLUSÕES	69

INTRODUÇÃO

1. Introdução ao câncer de colo uterino

O câncer cervical é o tipo mais frequente de câncer ginecológico e envolve a divisão celular descontrolada e invasiva na cérvix do útero. O câncer cervical tem uma prevalência alta e crescente no mundo. No Brasil, excluídos os tumores de pele não melanoma, o câncer do colo do útero é o terceiro tipo de câncer mais incidente entre as mulheres. Para o ano de 2023 foram estimados 17.010 casos novos, o que representa um risco considerado de 13,25 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2022).

O útero é um órgão do sistema reprodutor feminino, em formato de pera e que apresenta como principais partes: fundo, corpo do útero e colo uterino. O colo uterino é representado pela ectocérvice e a endocérvice, que são revestidas por epitélio escamoso estratificado não queratinizado e por epitélio colunar simples, respectivamente. A colheita das amostras citológicas no exame de prevenção do câncer de colo uterino (teste de Papanicolaou) é realizada na ectocérvice e endocérvice (Consolaro & Maria-Engler, 2012). O ponto de união entre esses dois epitélios é chamado junção escamocolunar (JEC) (Figura 1).

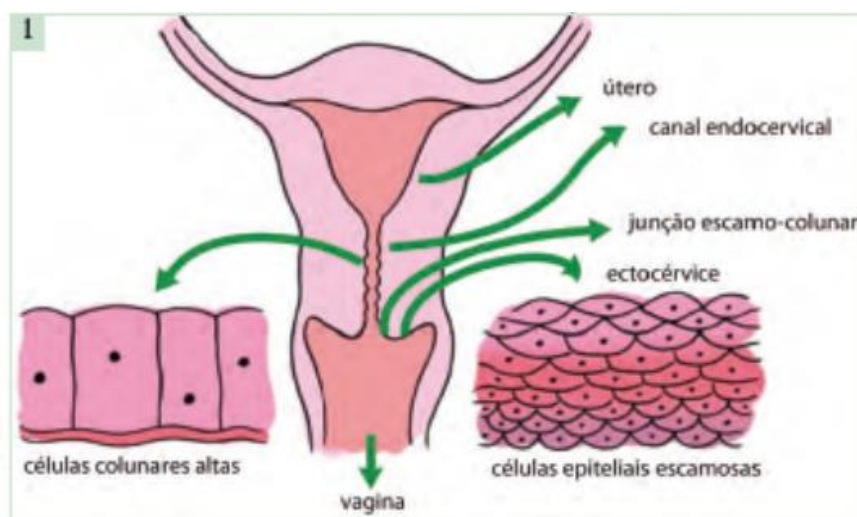


Figura 1: Ilustração representando os tipos celulares encontrados no colo uterino e as respectivas topografias. Fonte: Atlas de citopatologia ginecológica, Ministério da Saúde, 2012.

A maior parte das características morfológicas válidas para diagnóstico do câncer está presente no núcleo da célula (Consolaro & Maria-Engler, 2012). De acordo com a análise do padrão morfológico das células epiteliais, bem como de células não-epiteliais que podem estar presentes na amostra citológica, define-se um

resultado citopatológico através do qual são estabelecidas as condutas clínicas, incluindo a frequência de repetição do exame citopatológico, a realização de outros exames complementares (colposcopia e biópsia) e o tratamento, se for o caso.

O carcinoma de células escamosas é o subtipo histológico mais comum, representando aproximadamente 80% dos casos (Kumar et al., 2021). Até que o carcinoma se estabeleça, uma série de alterações citológicas acontecem e podem ser classificadas em diferentes estágios progressivos: inflamatório ou metaplásico, células escamosas atípicas e lesão intraepitelial. As células escamosas atípicas (ASC - *atypical squamous cell*) são classificadas em ASC-US (*undetermined significance*), de significado indeterminado e ASC-H (*high grade*), quando não se pode excluir lesão de alto grau. A lesão intraepitelial escamosa (SIL- *squamous intraepithelial lesion*) se divide em lesão intraepitelial de baixo grau ou displasia leve (LSIL – *low squamous intraepithelial lesion*) e lesão intraepitelial de alto grau, displasia moderada ou grave (HSIL – *high squamous intraepithelial lesion*).

No trabalho publicado por Dasari et al. (2015), os autores destacam que infelizmente a detecção de muitos tipos de câncer no nível microscópico é muitas vezes tarde demais para uma intervenção bem sucedida. Ao contrário de muitas infecções geniturinário, o câncer do colo do útero geralmente não está associado a sintomas como coceira, ardência ou corrimento vaginal. Está bem estabelecido que não existe um método único de rastreio que seja altamente sensível, altamente específico, acessível e prático. Apesar da enorme contribuição do teste Papanicolaou e da colposcopia como ferramentas de triagem, o campo de detecção tem sido atormentado por desafios como de excesso de diagnóstico, especificidade inadequada de marcadores (antígeno-125 do câncer, antígeno Carcino-embrionário), baixa conformidade (colposcopia) e falta de ferramentas analíticas para descobrir novos métodos de detecção. Portanto, há um enorme interesse na identificação e entendimento tanto de fatores de risco como de prevenção para o desenvolvimento de câncer cervical.

O muco é um gel complexo presente na superfície do epitélio secretor, funcionando como a primeira linha de defesa contra agentes nocivos do ambiente externo. No trato genital feminino, o muco desempenha funções biológicas importantes, como hidratar a mucosa, lubrificar o trato genital inferior durante a relação sexual e regular o movimento dos espermatozoides, dependendo da fase do ciclo menstrual (DONG et al., 2023).

O epitélio endocervical é a principal fonte de muco no trato genital feminino. Esse muco migra pelo canal cervical até a cavidade vaginal, onde se mistura com compostos do hospedeiro, detritos celulares e a microbiota vaginal, formando o muco cervicovaginal. Esse muco constitui um nicho ecológico que abriga a microbiota vaginal, essencial para a manutenção da barreira da mucosa vaginal (figura 2). A microbiota vaginal, dominada por *Lactobacilos*, pode ser prejudicada em casos de vaginose bacteriana, que aumenta a proliferação de patógenos oportunistas ou sexualmente transmissíveis, resultando em infecções vaginais. Esse problema é especialmente grave durante a gravidez, pois está associado ao risco de parto prematuro (LACROIX, GUILLAUME et al., 2020)

Na gravidez, forma-se um tampão de muco cervical no canal cervical, que isola o útero quase estéril da cavidade vaginal, protegendo o feto contra patógenos. As propriedades imunológicas e físicas desse tampão são cruciais para impedir a ascensão de bactérias ao útero (DONG et al., 2023).

De acordo com os estudos realizados por Lacroix, Guillaume et al. (2020) e Vagios, Stylianou et al. (2021), As variações na mucosa do trato genital feminino refletem mudanças significativas na sua anatomia e fisiologia ao longo da vida, especialmente durante a menstruação, gravidez, parto e menopausa. Esses processos são regulados por hormônios sexuais, que também influenciam a composição e as propriedades do muco genital. Modificações nos epitélios e no muco sustentam as diferentes funções biológicas dessas fases. Estudos de análise proteômica identificaram proteínas específicas no muco cervical em diferentes momentos do ciclo menstrual (pré-ovulatório, ovulatório e pós-ovulatório), evidenciando que a composição e a viscoelasticidade do muco mudam ao longo do ciclo. Essas alterações permitem identificar a janela fértil, pois, no período próximo à ovulação, o muco cervical torna-se mais aquoso e permeável aos espermatozoides, facilitando a fecundação. Tais mudanças estão relacionadas à variação na concentração de mucina e à glicosilação dos glicanos associados a ela. No meio do ciclo menstrual, a produção de muco aumenta e sua composição inclui mais oligossacarídeos neutros, o que pode ser relevante para a fertilidade.

A expressão das mucinas formadoras de gel foi analisada por meio de técnicas moleculares avançadas, abrangendo tanto o nível de RNA mensageiro quanto o de

proteínas. Dentre essas mucinas, MUC6 e MUC2 apresentam níveis baixos de expressão, com variações sutis ao longo do ciclo menstrual. Por outro lado, MUC5AC e MUC5B se destacam como as principais mucinas, sendo que MUC5B demonstra maior expressão e uma associação mais significativa com as alterações nas características do muco. Notavelmente, a produção de MUC5B atinge seu pico no meio do ciclo menstrual, momento que coincide com mudanças importantes na composição e nas propriedades viscoelásticas do muco cervical (Vagios, Stylianou et al. 2021) .

Apesar dessas descobertas, muitas análises foram realizadas em pequenas amostras ou estudos antigos, indicando a necessidade de investigações mais aprofundadas com tecnologias moleculares modernas. Além disso, as modificações das mucinas durante a gravidez permanecem inexploradas e constituem um tópico de pesquisa relevante.

1.2 A relação HPV e câncer cervical

Mais de 99% dos tumores de colo de útero apresentam sequências de DNA viral, e por isso, a infecção por vírus do papiloma humano (HPV) é considerada o principal agente etiológico dessa neoplasia. Os HPVs são vírus DNA e são categorizados em baixo e alto risco. Os HPVs de alto risco são de longe o fator mais importante no desenvolvimento do câncer de colo uterino. A infecção por HPV de alto risco oncogênico também está associada ao desenvolvimento de tumores no pênis, na vulva e no ânus, além de papilomas nas regiões orofaríngea e esofaríngea (Kumar et al., 2021)

Há 15 tipos de HPV de alto risco, mas o HPV-16 representa quase 60% dos casos e o HPV-18, outros 10%. Os HPVs infectam as células basais imaturas do epitélio escamoso em áreas de ruptura epitelial ou células escamosas metaplásicas imaturas presentes na junção escamocolumnar (JEC). A capacidade de o HPV agir como carcinógeno depende das proteínas virais E6 e E7, que interferem na atividade das proteínas supressoras de tumores, que regulam o crescimento e a sobrevivência das células (Kumar et al., 2021).

Kumari & Bohr (2021), em um trabalho de revisão, apresentam várias ações e mecanismos que permitem a infecção pelo HPV e o desenvolvimento de lesões que conduzem ao câncer cervical. A neoplasia cervical mediada pela infecção por HPV é um processo multifacetado que envolve divisão celular descontrolada, integração de

genes virais, alterações epigenéticas como metilação aberrante do DNA e modificação de histonas, expressão de RNA não codificante e fuga da vigilância imunológica. A superexpressão das proteínas E6/E7 do HPV causa desregulação do ciclo celular, inativando os genes supressores de tumor p53 e pRB, respectivamente.

Coquillard et al. (2011) quantificaram o RNAm das proteínas E6 e E7 em amostras de citologia cervical em base líquida. A conclusão do estudo é que a porcentagem de células superexpressando mRNA de E6 e E7 se correlacionam com a gravidade da lesão. À medida que as lesões progridem em gravidade, células que superexpressam mRNA E6/E7 tornam-se distribuídas por todo o epitélio e não na camada basal, como seria esperado em lesões de baixo grau (NIC 1).

Ainda como descrito por Kumari & Bohr (2022), a infecção persistente pelo HPV promove várias outras vias que levam à carcinogênese, regula negativamente a proteína apoptótica E2, o miRNA34a e o miRNA23b são regulados negativamente pelo HPV E6 devido à deleção dos genes p53.

A relação entre a persistência da infecção por HPV e, concomitantemente, por *Chlamydia trachomatis* também tem sido relacionada ao desenvolvimento de câncer cervical. Os artigos que deram suporte à revisão de Kumari e Bhor (2022) trazem alguns detalhes dessa relação. Possivelmente a infecção por *C. trachomatis* pode atuar como cofator para a persistência do HPV e o desenvolvimento de carcinoma cervical invasivo. Na infecção por clamídia, há altos níveis de reação inflamatória mediada por citocinas que podem estar ligadas à fisiopatologia da fibrose, à desregulação da reparação tecidual derivada da infecção, à deposição de proteínas da matriz extracelular (ECM), como colágenos I e III, fibronectina, elastina, fibrinas por miofibroblastos que podem levar à disfunção tecidual e causar transição epitelial-mesenquimal (EMT), culminando em progressão tumoral.

O trabalho de Kumari & Bhor (2022) apresenta uma representação das relações entre a infecção por HPV, *C. trachomatis*, microbiota e disbiose, reproduzida neste projeto na Figura 2.

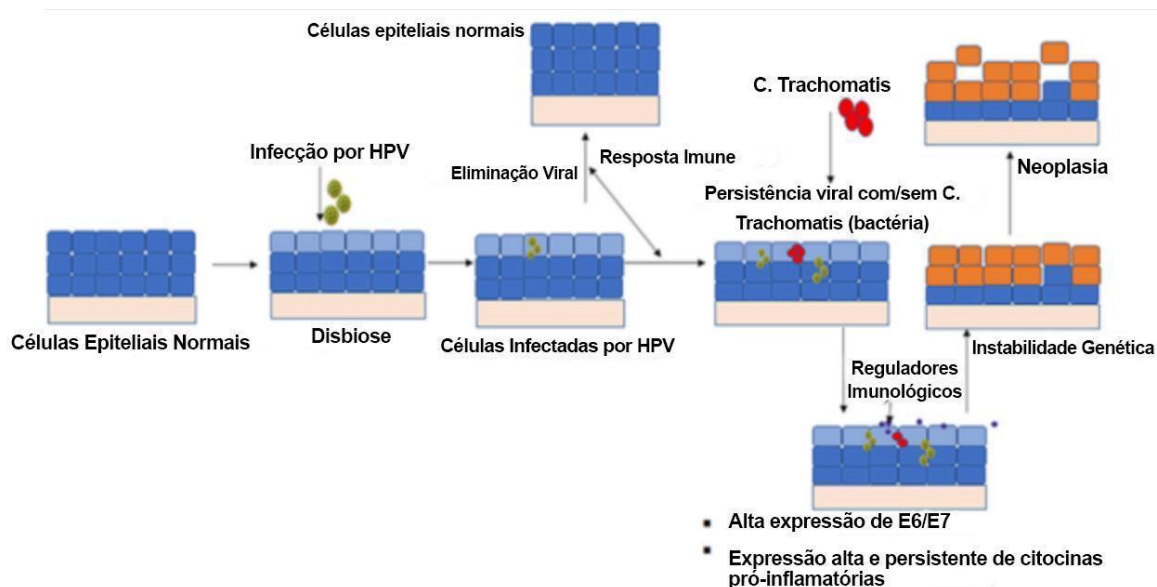


Figura 2: Representação esquemática demonstrando as relações entre disbiose cervicovaginal e desregulação imunológica relacionada à coinfeção por HPV/C.trachomatis, levando à neoplasia cervical
 Fonte: Kumari & Bhor (2021).

1.3 Microbiota do aparelho reprodutor feminino: prevenção e tratamento do câncer cervical

O conteúdo cérvico-vaginal normal é constituído de células epiteliais escamosas, células colunares endocervicais em pequeno número, células endometriais no período menstrual, detritos celulares, muco cervical, microbiota bacteriana variada, leucócitos em pequeno número, água e ácido láctico. Um grande número de microrganismos – a maioria espécies bacterianas – é conhecida por colonizar e formar comunidades complexas ou microbiota, em vários locais dentro do corpo e sobre ele. Evidências crescentes sugerem que a composição e a função da microbiota em diferentes *habitats* do corpo desempenham um papel vital no desenvolvimento, na fisiologia, na imunidade e na nutrição do ser humano (Nayar e Wilbur., 2018).

As microbiotas vaginal e cervical são diferentes, mas se superpõem no conteúdo vaginal. As glândulas de Bartholin e Skene, a cavidade uterina, as tubas uterinas, os ovários e as estruturas anexas são estéreis em condições normais. Os órgãos genitais externos apresentam microbiota da própria pele (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Corynebacterium* spp, entre outros), mais alguns componentes da microbiota intestinal (Nayar e Wilbur., 2018).

Ravel et al. (2011) estudaram a microbiota do canal e colo uterino de um grupo de 396 mulheres americanas, assintomáticas, subdivididas em grupos étnicos: brancas, negras, hispânicas e asiáticas. A composição microbiana do ambiente vaginal foi analisada por sequenciamento do gene RNAr 16S, e o resultado permitiu a classificação da microbiota em comunidades (CST), conforme Tabela 1. Em quatro classes de comunidades bacterianas ocorreu predominância de bactérias do gênero *Lactobacillus* (CST I, II, III e V) e em uma quinta CST (CST IV) houve prevalência majoritariamente de bactérias anaeróbicas obrigatórias. Destaca-se neste trabalho, o valor de pH que se mantém entre 4 e 5, em todas as classes de comunidades, indicando a produção de ácido láctico, mesmo quando não há predominância de *Lactobacillus*. Por fim, Ravel et al. (2010) sugeriram que um pH baixo e uma população dominada por *Lactobacillus* não são completamente indicativos de que uma mulher é “saúdável” e que o que é uma microbiota vaginal “normal” pode ser diferente dependendo da origem racial/étnica do indivíduo.

Tabela 1: Divisão de comunidades bacterianas na microbiota vaginal (Ravel et al., 2011).

CST	Espécie predominante	Proporção de mulheres pertencentes a cada CST**	pH
I	<i>Lactobacillus crispatus</i>	26%	4,0 $\pm$ 0,3
II	<i>Lactobacillus gasseri</i>	6,3%	5,0 $\pm$ 0,7
III	<i>Lactobacillus iners</i>	34,1%	4,4 $\pm$ 0,6
IV	<i>Anaerococcus</i> , <i>Peptoniphilus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Finegoldia</i> e <i>Streptococcus</i> , <i>Atopobium</i> , <i>Gardnerella</i> , <i>Sneathia</i> , <i>Mobiluncus</i> , <i>Megasphera</i> e <i>Clostridiales</i> - ausência de <i>Lactobacillus</i>		5,3 $\pm$ 0,6
V	<i>Lactobacillus jensenii</i>	5,1%	4,7 $\pm$ 0,4

** estudo de Ravel et al. (2011), população amostral de 396 mulheres.

A microbiota vaginal exerce um papel fundamental para defesa do canal vaginal, gerando uma defesa de dupla ação contra patógenos. A microbiota bacteriana é responsável pela síntese de ácido láctico e produção de H_2O_2 , que juntos atuam como antissépticos, criando uma barreira contra agentes patogênicos (Lewis et al., 2017). Além disso, alguns *Lactobacillus*, como *L. crispatus* e *L. gasseri*, controlam o crescimento excessivo e os processos infecciosos dos agentes patogênicos, além de modular a inflamação sistêmica, proliferação celular, e apoptose (Li et al., 2011; Lewis et al., 2017; Doorbar, 2006).

A revisão de Yang et al. (2018) descreve os principais fatores de proteção dos *Lactobacillus* no ambiente vaginal: 1) Proteção contra bactérias patogênicas devido a adesão dos *Lactobacillus* ao epitélio vaginal; 2) Produção de ácidos orgânicos a partir de glicogênio, o que inibe patógenos e aumenta a ação de bacteriocinas e do peróxido de hidrogênio; 3) Ativação do sistema imune tanto na resposta celular quanto humoral.

Além da ação preventiva de infecções, e mesmo que de forma indireta, do câncer de colo de útero, a presença *Lactobacillus* parece exercer ação direta sobre células cancerosas. Wang et al. (2018), cultivaram diferentes espécies de *Lactobacillus* e avaliaram os efeitos dos sobrenadantes de cultura sobre células tumorais Caski *in vitro*, em uma tentativa de identificar moléculas secretadas por esses microrganismos com potencial antitumoral. Os sobrenadantes de *L. crispatus*, *L. jensenii* e *L. gasseri* tiveram efeitos inibitórios sobre a viabilidade das células cancerosas do colo do útero através da regulação dos oncogenes do HPV e dos genes relacionados ao ciclo celular. Os autores concluíram que *Lactobacillus* presentes na microbiota vaginal são promissores para o tratamento do câncer de colo de útero.

Na revisão bibliográfica publicada por Yang et al. (2018) foram reunidos 29 artigos científicos relacionados a *Lactobacillus* e câncer cervical, publicados entre 1978 e 2017. Dentre os resultados relatados, destacam-se:

- Câncer cervical e lesões pré-cancerosas foram associadas a uma alta abundância relativa de *Lactobacillus iners* e *Lactobacillus* sp e baixa abundância relativa de *Lactobacillus jensenii* e *Lactobacillus crispatus*;
- Duas investigações revelaram menor abundância de *Lactobacillus* em mulheres com infecção por papilomavírus humano (HPV);

- Evidências de que moléculas secretadas por *Lactobacillus* exibiram atividades anti metastáticas e antiproliferativas em linhagens celulares de câncer cervical, regulando genes relacionados ao câncer e provocando uma resposta imunológica.

Dessa forma, embora se acumulem evidências sobre a influência positiva dos *Lactobacillus* na saúde do aparelho genital feminino, ainda existem questões a serem elucidadas tanto em relação a ação contra o HPV e vaginose bacterianas, quanto mecanismos moleculares de ativação do sistema imune e da ação antitumoral, além do entendimento sobre qual a ação específica de qual espécie de *Lactobacillus*.

1.4 As funções do ácido láctico

O ácido láctico proporciona uma acidificação vaginal, criando um ambiente antimicrobiano, que impede a colonização de patógenos. Esse processo forma um ciclo, já que o meio ácido beneficia a proliferação dos *Lactobacillus*, que são responsáveis por produzir ainda mais ácido láctico (Kalia et al., 2020).

A presença do ácido láctico, isoladamente, mostrou ser mais eficaz contra patógenos como vírus da imunodeficiência humana (HIV), *Neisseria gonorrhea*, *C. trachomatis*, *Escherichia coli*, vírus herpes simples tipo 2 (HSV-2), entre outros (Ravel et al., 2011). Segundo os estudos de Al Kassaa et al. (2014) a ação desse ácido está determinada pela capacidade de permeabilização e penetração da membrana plasmática de células bacterianas e sua aptidão de conseguir acidificar o citosol e interferir em seu processo metabólico.

O ácido láctico é uma molécula quiral com dois isômeros, o “D-ácido láctico” e o “L-ácido láctico”. (Witkin et al., 2013), na introdução de sua publicação, cita que células epiteliais vaginais produzem apenas o isômero do ácido L-lático, enquanto as bactérias lácticas produzem os isômeros do ácido D e L-lático. Além disso, os autores destacam que existem evidências de que o ácido L-lático, além do seu papel de acidificação vaginal, promove estimulação do sistema imune e inibição do crescimento bacteriano. Dentre as amostras vaginais de 46 mulheres, Witkin et al. (2013) verificaram que os níveis de ácido D-lático foram maiores nas amostras contendo *L. crispatus* do que naquelas com *L. iners* ou *Gardnerella*. Os dados sugeriram que a proporção relativa de isômeros de ácido L- e D-lático na vagina pode influenciar a extensão da produção de EMMPRIN (*Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer*) e subsequente

indução de MMP-8 (*Matrix Metalloproteinase 8*). A expressão dessas proteínas pode ajudar a determinar a capacidade das bactérias de atravessar o colo do útero e iniciar infecções do trato genital superior. Até o momento da preparação deste projeto, não foram encontrados outros artigos que dessem continuidade a esta descoberta.

1.5 Nutrição dos *Lactobacillus* e o glicogênio

O glicogênio é um polissacarídeo composto de unidades de glicose unidas por ligação $\alpha 1 \rightarrow 4$, e ramificações $\alpha 1 \rightarrow 6$. O glicogênio assemelha-se a amilopectina presente no amido, porém com maior número de ramificações. Trata-se de reserva energética, sendo degradado por reação de fosforólise e liberação de unidades de glicose. No corpo humano o glicogênio é armazenado especialmente no fígado e no tecido muscular esquelético (Nelson & Cox, 2019). Entretanto, a citologia cervical também tem descrito esse polissacarídeo nas células escamosas intermediárias. Citólise ou lise do citoplasma das células escamosas intermediárias, é o resultado da fermentação do glicogênio por lactobacilos. Uma vez que as células escamosas intermediárias são ricas em glicogênio citoplasmático, elas são o principal alvo dessas bactérias (Zhang et al., 2022).

A utilização de glicogênio como fonte primária de carbono para o crescimento e colonização da microbiota do canal vaginal é controversa. Existem relatos indicando que os *lactobacilos* utilizam os produtos hidrolisados do glicogênio gerados pelas α – amilase humana presente nos fluidos vaginais e não seriam capazes de secretar as próprias carboidrases. Entretanto, recentemente têm surgido estudos indicando o oposto (Zhang et al., 2022).

Os estudos sobre metabolismo de glicogênio têm sido realizados especialmente com *L. crispatus*. van der Veer et al. (2019) demonstraram que *L. crispatus* são capazes de crescer na presença de glicogênio. Os autores relataram que pululanase tipo I era responsável pela degradação do glicogênio por *L. crispatus*. Zhang et al. (2022) caracterizaram uma nova enzima isolada de *L. crispatus* envolvida no metabolismo de glicogênio, a pululanase tipo II.

Em estudo metaproteômico de lavagens vaginais de mulheres com um microbioma dominado por *L. crispatus* não foi detectada qualquer proteína amilopullulanase de *L. crispatus*, o que levantou questões sobre fatores genéticos ou relacionados ao hospedeiro que poderiam influenciar na sua síntese (Kenetta et al., 2020)

Hertzberger et al. (2022) demonstrou que a atividade de degradação de alfa-glucanas se dissipa quando o *L. crispatus* é cultivado em glicose, maltose e maltotriose, o que seria devido ,a repressão catabólica do gene *pulA* (gene da enzima amilopululanase). A análise do proteoma da camada S confirmou que a proteína amilopululanase é altamente abundante numa fração enriquecida com camada S, mas não numa estirpe com uma variante de amilopululanase defeituosa ou numa estirpe suficiente para amilopululanase cultivada em glicose. Além disso, os autores argumentam que mutantes de *L. crispatus pulA* são relevantes *in vivo*, pois são comumente observados em conjuntos de dados de metagenoma de comunidades microbianas vaginais humanas. A análise do maior conjunto de dados publicamente disponível de 1.507 metagenomas vaginais humanos indica que entre as 270 amostras que contêm um gene *L. crispatus pulA*, 62 amostras (23%) tinham uma variante defeituosa deste gene. Estes resultados demonstram que tanto fatores ambientais como genéticos explicam a variação das alfa-glucosidases de *L. crispatus* no ambiente vaginal.

Jenkins et al. (2023) caracterizaram bioquimicamente seis enzimas degradadoras de glicogênio (GDEs), todas elas pullanases (homólogos de *PulA*), de bactérias vaginais que suportam o crescimento, em glicogênio, de *L. crispatus* deficiente em amilase. Os resultados demonstraram variações na tolerância ao pH, preferências de substrato, produtos de degradação e suscetibilidade à inibição. A análise dos conjuntos de dados do microbioma vaginal mostra que estas enzimas são expressas em todos os tipos de estados comunitários e confirmam a presença e atividade de GDEs bacterianos e humanos no líquido cervicovaginal. Este trabalho indica que os GDEs bacterianos podem participar na degradação do glicogênio, fornecendo informações sobre o metabolismo que pode moldar a microbiota vaginal.

Navarro et al. (2023) verificou que variações no pH vaginal influenciam criticamente a colonização do trato vaginal por lactobacilos e *G. vaginalis* JCP8151A, afetando a sua capacidade de metabolizar o glicogênio. Além disso, os autores relatam que *L. jensenii* 62G é capaz de metabolismo de glicogênio em uma faixa mais ampla de pH (4,0-5,0), enquanto a utilização de glicogênio de *L. crispatus* JV-V01 é sensível ao pH (funcional apenas em pH 5,0). Os resultados mostraram que *G. vaginalis* JCP8151A pode colonizar o trato vaginal por um período prolongado, desde que o pH permaneça em 4,5 ou acima. Este trabalho se diferencia dos demais devido ao cultivo

das bactérias ter sido realizado em Fluido Vaginal Simulado contendo glicogênio, glicose e mucina, sendo a composição baseada no trabalho de Juárez & Nader-Macías (2007).

O entendimento do metabolismo do glicogênio é fundamental para esclarecer aspectos diversos da microbiota no canal vaginal, visto que é a fonte primária de energia para esses microrganismos e a origem da produção de ácido láctico, que afeta diretamente o pH local. Apesar dessa importância, ainda existem muitas lacunas a serem esclarecidas e percebe-se que apenas recentemente esse tema tem sido explorado de forma incisiva.

1.6 Relação entre disbiose, vaginoses e HPV

A microbiota vaginal saudável tem sido associada à predominância de diferentes espécies de *Lactobacillus*, sendo considerada uma situação de eubiose. A disbiose é a alteração da comunidade microbiana, com redução de *Lactobacillus* e aumento de outras espécies de bactérias anaeróbicas, condição associada muitas vezes a doenças ginecológicas.

Engberts et al. (2007) estudaram a possível relação entre a presença de *Candida* e disbiose com a susceptibilidade a lesões intraepiteliais (SIL) de baixo ou alto grau (LSIL e HSIL, respectivamente). O estudo foi retrospectivo, longitudinal e de coorte e incluiu 100.605 mulheres em um período de 12 anos. Os resultados indicaram que a presença de *C. vaginalis* não foi associada a aumento de risco de SIL. A disbiose, ao contrário, foi associada com aumento de risco de LSIL e HSIL.

Oh et al. (2015) estudaram a microbiota cervical de 70 mulheres coreanas com neoplasia cervical e 50 mulheres controle, pelo pirosequenciamento do gene RNAr 16S. Os resultados mostraram que a predominância de *Atopobium vaginae*, *G. vaginalis* e *L. iners*, com redução de *L. crispatus*, estava associada a aumento de risco para neoplasia cervical, sugerindo que a disbiose e a presença de HPV são fatores de risco de câncer cervical.

Brusselaers et al. (2019) avaliaram se a disbiose afeta a aquisição, persistência da infecção por HPV e consequente progressão para lesões malignas no colo uterino. O estudo foi realizado como revisão sistemática, incluindo 101.049 mulheres, em artigos publicados entre 2003 e 2017. Os resultados mostraram correlação entre disbiose e aumento do risco de infecção pelo HPV, incluindo os subtipos de alto risco,

aumento de persistência da infecção por HPV e relação com número aumentado de casos de HSIL.

Mitra et al. (2020) realizaram o sequenciamento de DNA de amostras vaginais de 87 mulheres com idade entre 16 e 26 anos, com diagnóstico de neoplasia cervical 2 (CIN 2) não tratadas, para avaliar a relação entre a microbiota vaginal e a regressão da lesão em 24 meses. Os resultados demonstraram que em mulheres com microbiota com predominância de *Lactobacillus* ocorreu maior taxa de regressão em 12 meses. Redução de *Lactobacillus* e aumento de bactérias anaeróbicas específicas: *Megasphaera*, *Prevotella timonensis* e *G. vaginalis* foi associado a persistência da lesão e lentidão na regressão. Os autores sugerem que o estudo da microbiota pode ser usado como biomarcador, possibilitando estratégias de prevenção e tratamento do câncer cervical.

Lebeau et al. (2022) propuseram uma perspectiva oposta a da maioria dos trabalhos sobre o assunto: a ação do próprio HPV alterando a capacidade de defesa do organismo, por impedir a presença do *Lactobacillus* no trato genital feminino. O estudo foi baseado em dados retrospectivos (n=6.085 mulheres) e também experimentos *in vivo* usando camundongos transgênicos K14HPV16. Os autores demonstraram que a oncoproteína E7 do HPV inibe a expressão de um peptídeo de defesa do hospedeiro. Fisiologicamente, esse peptídeo é secretado pelas células escamosas da mucosa, sendo utilizado por *Lactobacillus* como fonte de N, em uma relação simbiótica. A inibição da expressão desse peptídeo torna-se uma estratégia de invasão viral, visto que prejudica a permanência dos *Lactobacillus*, favorecendo a disbiose e reduzindo a defesa do organismo.

Santella et al. (2022) seguiram a mesma estratégia de Lebeau et al. (2022) e investigaram se a infecção por HPV pode afetar a microbiota na cervix uterina. Foram incluídas 31 mulheres neste estudo. A partir de coletas de swab foi extraído DNA para sequenciamento de genes de HPV e de bactérias da microbiota. Os resultados suportam a hipótese de que a infecção por HPV aumenta a diversidade da microbiota, conduzindo a uma composição diferente entre mulheres contaminadas com HPV e mulheres não contaminadas.

1.7 Possibilidade de utilização de probióticos para prevenção e tratamento do câncer de colo do útero

Probióticos são microrganismos vivos que podem ser administrados em quantidades benéficas. Para ser classificado como probiótico, o microrganismo deve ser capaz de colonizar o hospedeiro e ter uma relação simbiótica, com efeitos benéficos para saúde do hospedeiro (Faintuch, 2017).

A microbiota intestinal foi a primeira a ser avaliada a respeito da ação probiótica e tem sido intensivamente estudada (Mancabelli et al. 2021). Dentre os probióticos intestinais, destacam-se várias espécies de bactérias lácticas, incluindo o gênero *Lactobacillus*. São conhecidas e estudadas as seguintes espécies: *L. acidophilus*, *L. helveticus*, *L. casei* - *subsp. paracasei* e *subsp. tolerans*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *L. salivarius*. Dessa forma, o gênero *Lactobacillus* está presente nos dois ambientes - intestinal e genital feminino.

Kandati et al. (2022) publicaram uma extensa revisão sobre probióticos em geral e sua relação com câncer cervical. Os probióticos intestinais estão relacionados a exclusão de patógenos por competição no espaço de colonização sobre o epitélio intestinal, produção de substâncias antimicrobianas e competição por nutrientes, proteção da junção celular do epitélio, estímulo do sistema imunológico, degradação de carcinógenos e defesa contra danos ao DNA. Os autores discutem a estratégia de utilização de probióticos já conhecidos e utilizados para colonização intestinal, para atuação na prevenção e tratamento de câncer cervical, seguindo a expectativa de obter, no ambiente vaginal, os bons resultados observados no intestino. Especificamente sobre probióticos e câncer cervical, destacam-se abaixo algumas das evidências promissoras apresentadas no trabalho de Kandati et al. (2022):

- Em um grupo de 62 mulheres com HPV de alto risco, tratadas com *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 e *Lactobacillus reuteri* RC-14, e acompanhadas por 6 meses, verificou-se diferença significativa nos exames citológicos, com maior número de esfregaços normais nas mulheres tratadas em relação às não tratadas com *lactobacilos*.
- Bactérias lácticas podem ativar a via de sinalização da apoptose por via intrínseca ou extrínseca
- Em estudo com 54 mulheres que consumiram probióticos via oral diariamente, verificou-se uma redução no tempo de clearance de HPV.

- *Lactobacillus* isolados do ambiente vaginal foram capazes de inibir o crescimento de linhagens de células tumorais *in vitro* (culturas de células Caski e HeLa).

Os relatos da ação anti-tumoral de diferentes espécies de *Lactobacillus* têm se acumulado na literatura. Como exemplo, o trabalho de Nami et al. (2014), que trata de uma cepa de *L. acidophilus* 36YL isolada do ambiente vaginal. A bioatividade da secreção desta cepa foi avaliada por ensaio de citotoxicidade e apoptose em quatro linhagens celulares de câncer humano (AGS, HeLa, MCF-7 e HT-29) e uma linhagem celular normal (HUVEC). Descobriu-se que esta cepa recentemente isolada exibe propriedades probióticas notáveis, como admiráveis suscetibilidade a antibióticos, boa atividade antimicrobiana e resistência a ácidos e sais biliares. A cepa pode representar uma alternativa nutracêutica ou um medicamento tópico devido à ausência de citotoxicidade para células normais, mas toxicidade eficaz para linhas celulares de câncer.

2. OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da aeração no crescimento e parâmetros de cultivo de 5 espécies de *Lactobacillus* com potencial probiótico vaginal (*L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. acidophilus* e *L. rhamnosus*), em fluido vaginal simulado (FVS).

2.1 Objetivo específicos

Para alcançar o objetivo geral, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- 1) Avaliar aspectos morfológicos microscópicos das diferentes espécies, após crescimento estático e agitado, em meio FVS e meio controle (MRS).
- 2) Avaliar crescimento celular e parâmetros como consumo de nutrientes, pH e acidez após crescimento em meio FVS e controle (MRS), estático e agitado, utilizando glicose
- 3) Avaliar crescimento celular e parâmetros como consumo de nutrientes, pH e acidez após crescimento em meio FVS e controle (MRS), estático e agitado, utilizando diferentes carboidratos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A proposta do projeto se baseou no estudo fisiológico, bioquímico e morfológico *in vitro* de 5 espécies de *Lactobacillus*, comumente encontradas em ambiente vaginal. O diferencial inédito deste trabalho foi a realização do estudo em meio de fluido vaginal simulado.

3.1 Microrganismos

Neste trabalho foram utilizadas 5 cepas de *Lactobacillus*: *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. johnsoni*, *L. rhamnosus* e *L. acidophilus*. Os microrganismos foram adquiridos da empresa BS Pharma Farmácia de Manipulação (Farmácia BS LTDA | CNPJ: 38.510.020/0001-85).

3.2 Manutenção das cepas

As cepas foram cultivadas em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de meio MRS (De Man, Rugosa e Sharpe), por até 48h. O crescimento foi acompanhado em espectrofotômetro a 580 nm até D.O. de 0,8. Após o crescimento, cada cepa foi congelada a -22 °C em glicerol 10% (m/v), em frascos criogênicos de 1 mL.

4. CULTIVO DE DIFERENTES LINHAGENS DE *LACTOBACILLUS*

4.1 cultivo em fluido vaginal simulado (fvs)

Os microrganismos foram cultivados em meio de cultura de composição semelhante ao ambiente vaginal. Para isso, foi utilizado o fluido vaginal simulado proposto por Owen & Katz em 1999, não adicionado de ácido láctico. O fluido é composto de (g/L) NaCl 3,51; KOH 1,40; Ca(OH)₂ 0,222; Albumina bovina 0,018; ácido acético 1,00; glicerol 0,16; uréia 0,4 e glicose 5,0. O pH foi ajustado a pH de 4,2 usando HCl.

4.2 Cultivo em meio MRS

Os microrganismos também foram cultivados em meio MRS (De Man, Rogosa e Sharpe), como condição de controle. Adicionar o mrs

5. FATORES QUE INFLUENCIAM O CRESCIMENTO DE *LACTOBACILLUS* EM FLUIDO VAGINAL SIMULADO

Os cultivos foram iniciados pela preparação de inóculo em meio MRS com glicose de concentração 5 g/L. Foram usados erlenmeyers de 150 mL contendo 25 mL de meio. O crescimento foi iniciado pela adição de 1 mL da cultura congelada (-22°C) na ordem de 10^5 cel. A incubação foi realizada em agitação de 180 rpm, 30 °C, até DO de 0,8 a 580 nm. Foi utilizado 1 mL de suspensão celular para cada frasco da segunda fase, na qual a influência de diferentes fatores foram avaliados. Todos os ensaios foram acompanhados pelas determinações analíticas descritas no item 4.

5.1 Influência da aeração nos cultivos de cepas de *Lactobacillus*

Na segunda fase, os experimentos foram realizados em frascos erlenmeyers de 150 mL contendo 25 mL de meio FVS, conforme Owen e Katz (1999), contendo glicose concentração 5 g/L e sem adição de ácido láctico. O controle do experimento foi realizado pela inoculação em meio MRS, mantidas as mesmas condições. Metade dos Erlenmeyers foram mantidos em agitação a 180 rpm e metade estático. A incubação foi realizada a 30°C e as análises foram realizadas a cada 24 h por 72 h.

5.2 Influência de diferentes carboidratos

Os experimentos foram realizados em frascos erlenmeyers de 150 mL contendo 25 mL de meio FVS, conforme Owen e Katz (1999), sem adição de glicose. Os experimentos foram realizados adicionando como fonte de carbono: amido (polvilho doce, Yoki), glicose, galactose, frutose e lactose, sendo que todos eles contêm a mesma concentração de 5 g/L. O controle do experimento foi realizado pela inoculação em meio MRS, mantidas as mesmas condições. A incubação foi realizada a 30°C e as análises foram realizadas após 48 h.

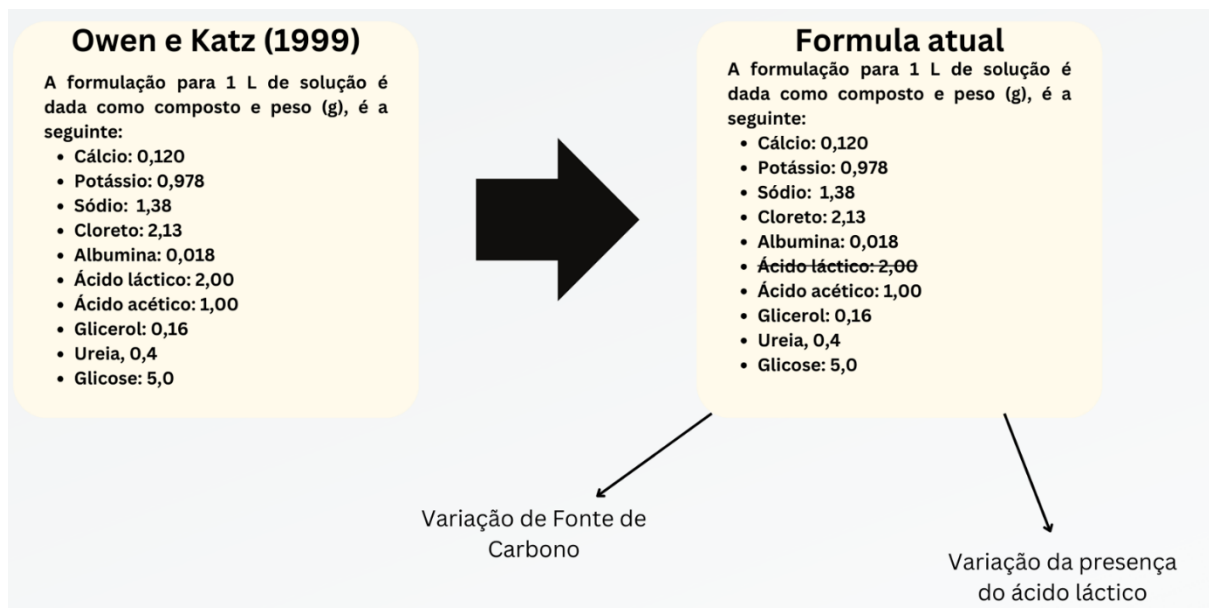


Figura 3: Composição dos compostos identificados nos meios FVS, destacando as alterações na fonte de carbono e a produção de ácido láctico ao longo do cultivo.

6. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA OS ESTUDOS DE FERMENTAÇÃO

Após a incubação pelo tempo necessário para cada experimento, as células foram separadas por centrifugação. Para isso, o conteúdo total do frasco Erlenmeyer foi centrifugado a 3500 rpm, por 15 min. O sobrenadante foi utilizado para as análises a seguir.

6.1 Determinação de pH

O pH foi determinado em pHmetro, calibrado a 25 °C, com tampões pH 4 e 7.

6.2 Determinação de acidez

Para determinação de acidez foram utilizados 10 mL de amostra, em Erlenmeyer de 125 mL. Foram adicionados 25 mL de solução éter-álcool (2:1) neutra e duas gotas do indicador fenolftaleína. A titulação foi realizada com solução de NaOH 0,1 mol/L ou 0,01 mol/L (conforme os resultados das amostras) até o aparecimento da coloração rósea. A acidez foi calculada pela relação molar entre o volume de base gasto na titulação e a acidez total da amostra. Equação da acidez

6.3 Determinação de proteínas

Para a determinação da concentração de proteínas nos sobrenadantes de cultura, foi utilizado o método de Bradford (1976), utilizando albumina bovina como padrão (100 ug/mL).

6.5 Determinação de glicose

A quantificação de glicose foi realizada pelo método da glicose oxidase utilizando kit comercial. Foi utilizado como padrão uma solução de glicose 1 mg/mL. A solução reagente foi composta de solução tampão fosfato pH 7 contendo 4-hidroxibenzoato. O teste foi realizado a 37 °C, 5 min, com leitura em espectrofotômetro a 505 nm.

A velocidade específica de consumo de glicose (mg/mL/h) (r_S) foi calculada linearizando a curva da concentração de glicose em função do tempo (Equação 1).

(Equação 1)

$$r_S = \frac{ds}{dt} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

S é o substrato glicose

rS é a velocidade de consumo da glicose

dS é a variação na concentração de glicose durante o período analisado em mg/mL

dt é a variação do tempo em horas

6.6 Determinação do crescimento celular

O crescimento celular foi determinado por contagem de células em câmara de Neubauer, utilizando microscópio óptico. O cálculo de células por mL foi realizado como descrito abaixo (Equação 2):

$$N^{\circ} \text{ de } \frac{\text{celulas}}{\text{mL}} = \frac{n^{\circ} \text{ total de celulas}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times \text{fator de diluição} \times 10.000 \quad \text{Equação 2}$$

A velocidade específica de crescimento (rX) foi calculada linearizando a curva da concentração de biomassa em função do tempo (Equação 3).

$$rX = \frac{dX}{dt} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

X é a contagem de células no tempo analisado;

rX é a velocidade instantânea de crescimento em (n. cel/mL) / hora;

dX é a variação contagem de células durante o período analisado;

dt é a variação do tempo em horas;

6.7 Morfologia bacteriana

A morfologia celular foi avaliada em microscópio óptico, utilizando coloração de Gram.

6.8. Métodos estatísticos - Análise de Variância (ANOVA) no Software Origin

Para avaliar a influência das condições de cultivo e do meio de cultura no crescimento e metabolismo das espécies de *Lactobacillus*, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) utilizando o software Origin (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA). Os dados de crescimento bacteriano, consumo de carboidratos e variação de pH foram analisados por meio de ANOVA de uma via (one-way ANOVA) e, quando necessário, ANOVA de duas vias (two-way ANOVA) para verificar a interação entre fatores experimentais, como tipo de meio (MRS ou FVS) e condição de cultivo (estático ou agitado).

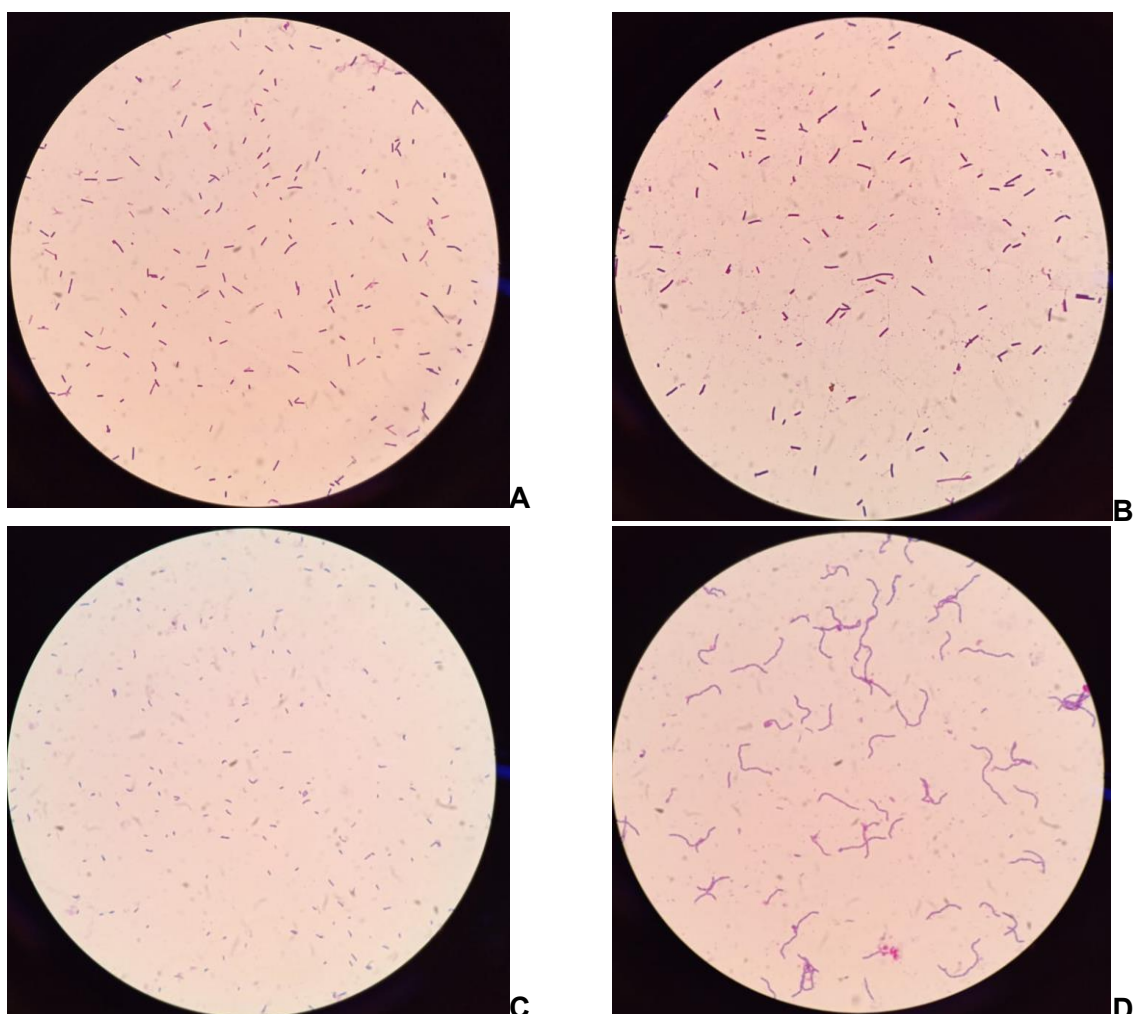
A suposição de homogeneidade das variâncias foi testada pelo teste de Levene, e a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando a ANOVA indicou diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, garantindo uma análise detalhada das diferenças entre os grupos experimentais. Todas as análises estatísticas foram conduzidas no Origin, e os gráficos gerados foram utilizados para melhor visualização dos resultados.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Morfologia celular

As cepas do presente estudo foram cultivadas em meio MRS contendo glicose 20 g/L. Após 48 h de cultivo estático, a 30 °C, foi realizada coloração de gram e observado ao microscópio óptico, com aumento de 1000 vezes e objetiva de imersão. A Fig 4 apresenta as imagens obtidas.

Assim como descrito na literatura, as cepas de *Lactobacillus* do presente estudo apresentam formato bacilar e coloração gram positiva. No entanto, cada um dos microrganismos apresentou características morfológicas próprias. Cada uma das espécies apresenta um tamanho de célula diferente, sendo *L. johnsonii* (Fig C) as de menores dimensões e as de *L. rhamnosus* (Fig D), formam cordões semelhantes a streptococcus.





E

Figura 4: Morfologia celular das cepas de *Lactobacillus* utilizadas no presente estudo. A) *L. crispatus*; B) *L. acidophilus*, C) *L. johnsonii*, D) *L. rhamnosus* E) *L. gasseri*. Condições de análise: Coloração de gram, microscópio ótico Olympus CX21, aumento de 1000 x

7.2 Influência da aeração na multiplicação celular de cepas de *Lactobacillus* cultivadas em Fluido Vaginal Simulado (FVS) e glicose

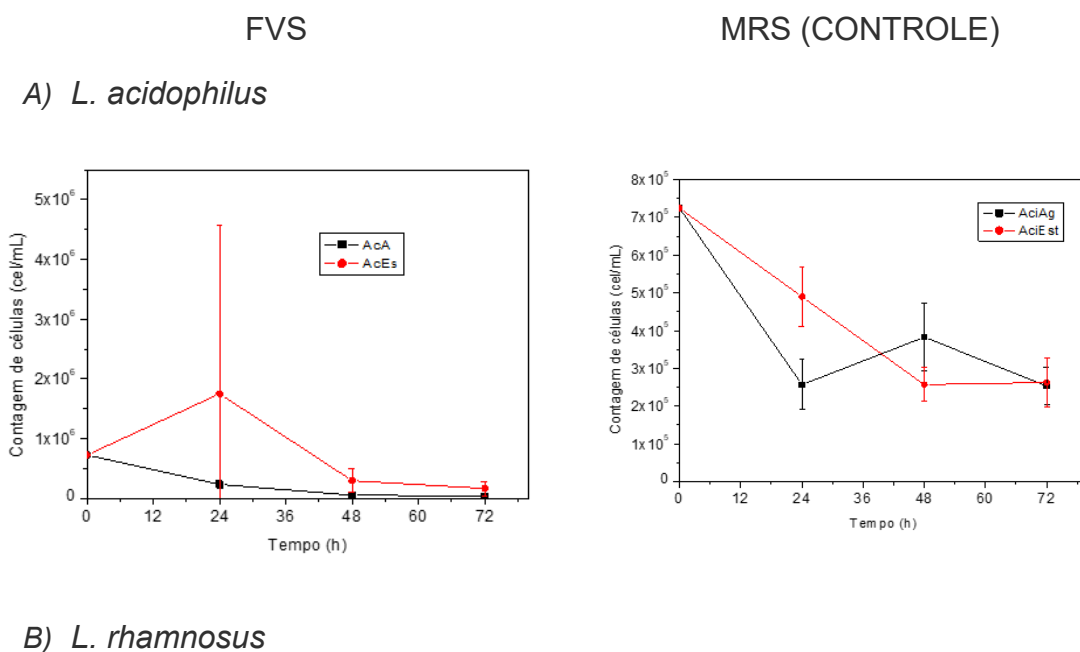
Para avaliar a influência da aeração no desenvolvimento de bactérias do gênero *Lactobacillus* em FVS, foram realizados cultivos estáticos e em agitação de 180 rpm. Cultivos em meio MRS, estáticos e agitados, foram realizados como controle.

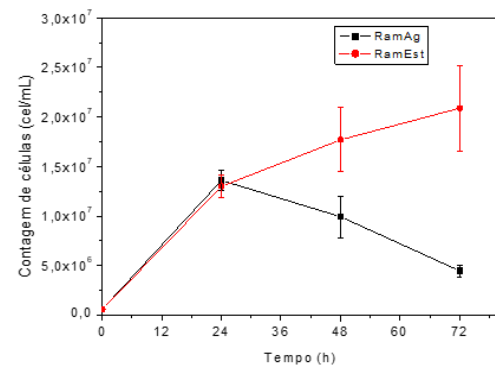
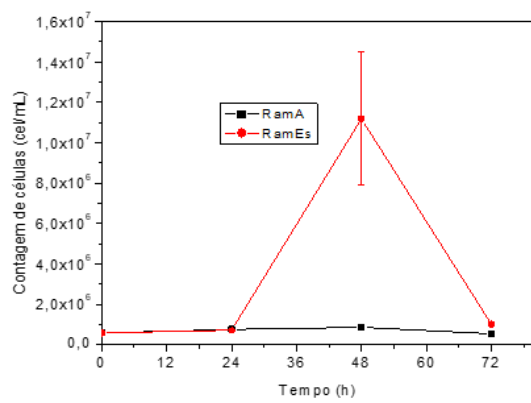
Considerando o meio MRS, usado para controle, verificou-se contagem de células na ordem de 10^7 células/mL de meio de cultura para 4 das 5 cepas (*L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. crispatus*) (Figuras 5 C e D), indicando que as bactérias estavam viáveis e poderiam ser usadas para avaliar o meio FVS (Figuras 5 A e B), proposto neste projeto.

Em meio FVS, considerando as cepas de *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii* e *L. crispatus*, observou-se crescimento celular, tanto em condições de cultivo com aeração quanto estáticos. A contagem de células permaneceu na ordem de 10^6 células/mL de meio de cultura tanto nos cultivos estáticos quanto aerados. Ainda que o crescimento tenha sido menor do que o obtido em meio controle (MRS), o experimento demonstrou que bactérias do gênero *Lactobacillus* podem ser cultivadas em meio FVS e que esta condição de cultivo pode ser explorada para estudo da fisiologia destas

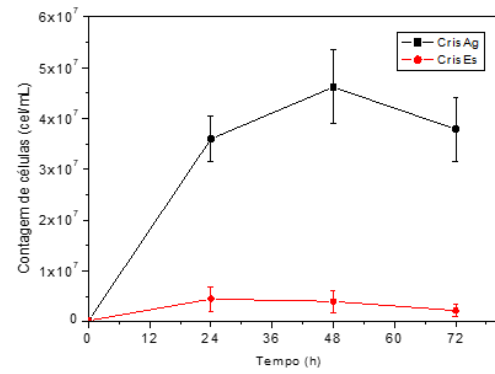
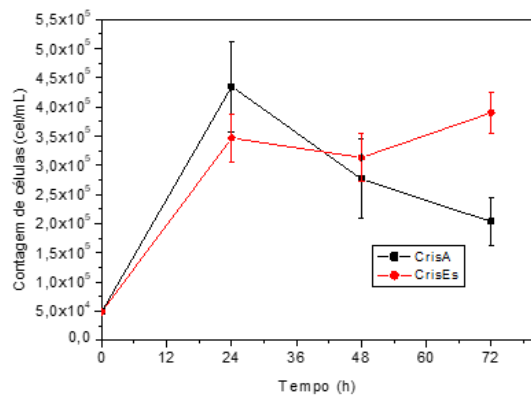
cepas em ambiente que simule o vaginal. Por outro lado, os dados também demonstram que cada espécie, dentro do gênero *Lactobacillus*, apresenta seu próprio padrão de crescimento, indicando que devem ser realizados estudos individuais para cada uma delas, e posteriormente, ser avaliada também a interação dessas cepas em cultivos mistos.

Analisando a importância da aeração no crescimento destes microrganismos, verificou-se que, em meio FVS, dentre as 5 espécies estudadas, *L. rhamnosus* se destacou pelo crescimento superior aos demais, tanto em cultivos estáticos, quanto agitados (Figura 6 A e B). A maior contagem de células em meio FVS foi obtida em cultivo de *L. rhamnosus*, em 48h de cultivo estático, na ordem de 10^7 células/mL de meio de cultivo. *L. johnsonii* apresentou crescimento superior aos demais entre 48 e 72 h em cultivos agitados e nenhuma alteração na contagem de células nos cultivos estáticos.

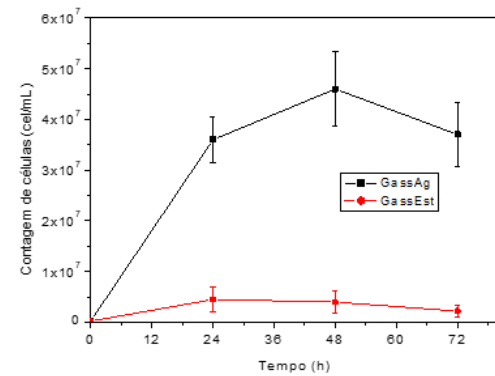
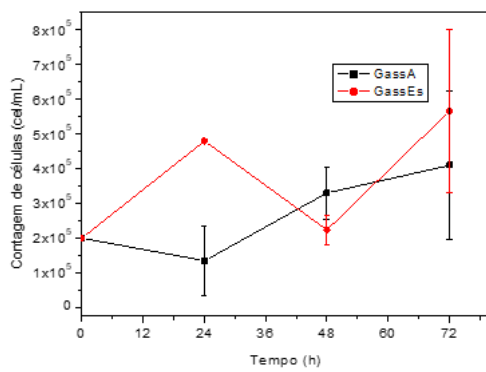




C) *L. crispatus*



D) *L. gasseri*



E) *L. johnsonii*

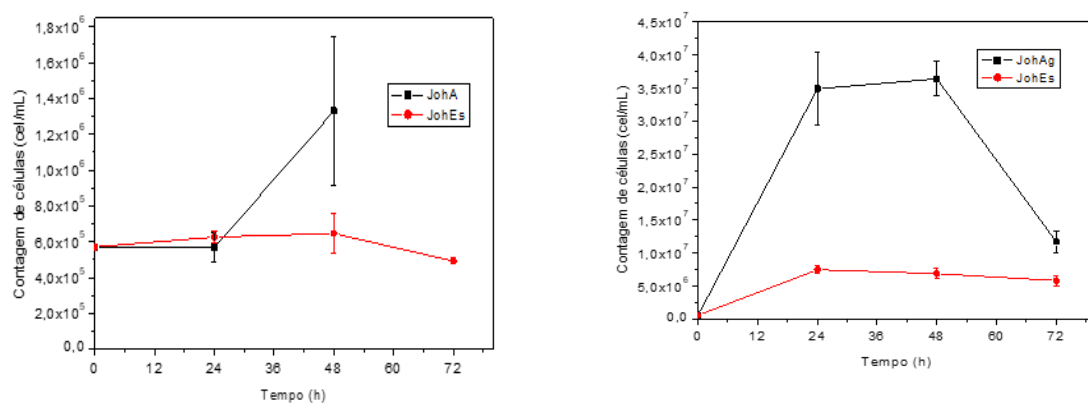
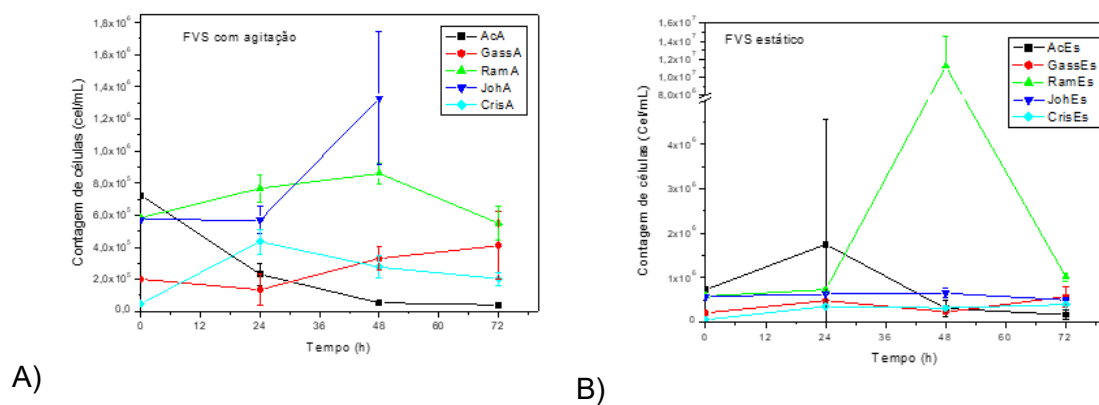
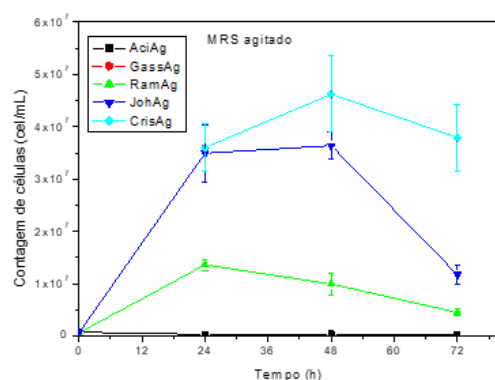


Figura 5: Análise individual das cepas em meio Fluido Vaginal Simulado (FVS) (A) *L. acidophilus*, (B) *L. rhamnosus*, (C) *L. crispatus*, (D) *L. gasseri*, (E) *L. johnsonii*. Cultivos em meio FVS, estáticos (●) ou agitados (■), a 30°C, com contagem em câmara de Neubauer a cada 24 horas. Cultivos controle realizados em meio MRS. As barras de erro representam o desvio padrão e cada ponto corresponde à média de 3 réplicas.

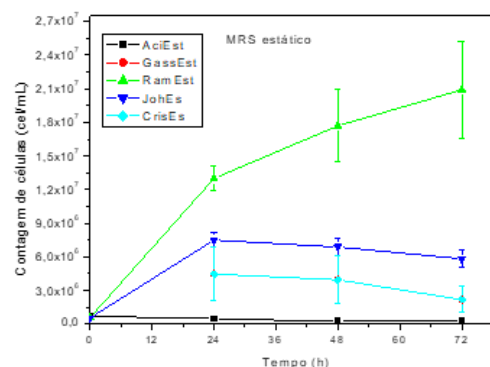


A)

B)



C)



D)

Figura 6: Análise comparativa entre as cepas em meio Fluido Vaginal Simulado (FVS), em cultivos estáticos ou agitados (180 rpm), 30 °C, análises a cada 24 h, contagem de células na câmara de Neubauer. Cultivos controle realizados com meio MRS. **Figuras A e B:** Cultivos em Fluido Vaginal Simulado (FVS) com agitação (A) e estático (B); **Figuras C e D:** cultivos controle com meio MRS com agitação (C) e estático (D). Microrganismos: *L. acidophilus* (■); *L. gasseri* (●); *L. rhamnosus* (▲); *L. johnsonii* (▼); *L. crispatus* (◆).

Ao contrário do observado no meio FVS, no meio controle MRS verificou-se uma diferença marcante entre cultivos estáticos e agitados em relação à contagem de células (Fig. 5). As espécies *L. gasseri*, *L. johnsonii* e *L. crispatus* apresentaram maior contagem de células nos cultivos com agitação. Entretanto, *L. rhamnosus* exibiu um comportamento distinto: até 24 horas de incubação, as contagens celulares foram semelhantes em condições estáticas e agitadas, mas, após esse período, os cultivos estáticos apresentaram maior crescimento em comparação aos agitados.

De acordo com os resultados, a relação entre a presença de oxigênio e o crescimento celular varia com a espécie e também com a composição do meio de cultivo, sendo obtidos resultados diferentes quando se compara o mesmo microrganismo em meio FVS e em meio MRS.

7.3 Determinação de glicose e proteínas no sobrenadante de cultivo

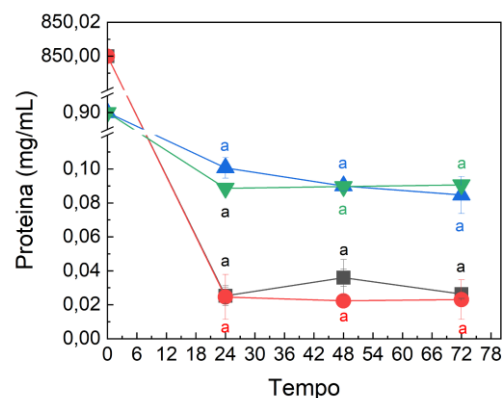
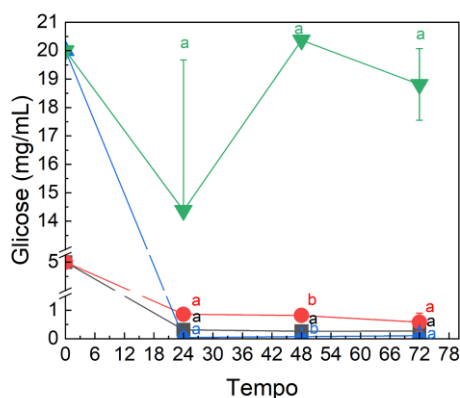
As determinações de glicose foram realizadas no sobrenadante de cultivo, após a separação das células por centrifugação (Figura 6). Observou-se intenso consumo de glicose, em todos os cultivos, aproximando-se da exaustão em 24 h de cultivo, tanto em meio MRS quanto FVS, para ambas as condições, estática e agitada.

A velocidade de consumo da glicose (Tabela 2), foi maior nos cultivos controle (meio MRS) do que nos meios com FVS. para todas as cepas testadas. Considerando os cultivos com FVS, as variações no consumo entre as cepas de *Lactobacillus* foi muito pequena, variando entre 0,06 e 0,23 mg/mL/h. Por outro lado, é interessante destacar que a presença de oxigênio não proporcionou aumento significativo na velocidade de consumo de glicose, já que não foi observada diferença significativa entre cultivos agitados e estáticos, para todos os microrganismos estudados.

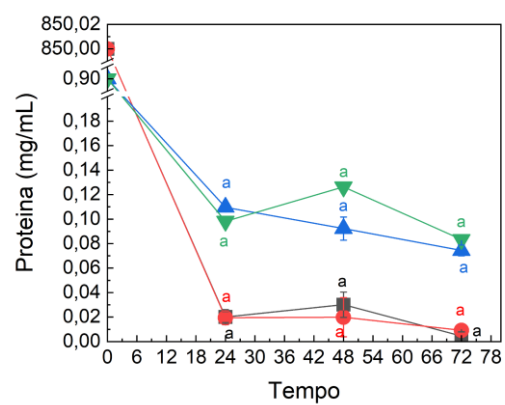
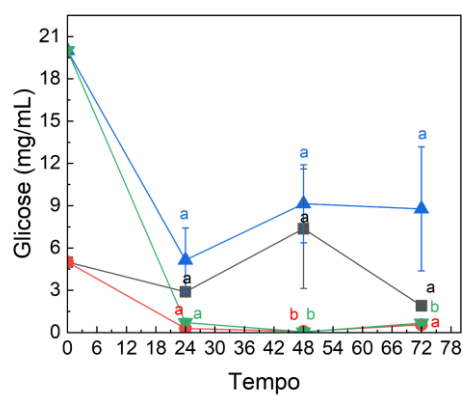
Tabela 2: Velocidade de consumo de glicose (mg/mL/h) em 24 h por diferentes espécies de *Lactobacillus* em Fluido Vaginal Simulado (FVS).

Microrganismo	<i>L.crispatus</i>	<i>L.johnsonii</i>	<i>L. gasseri</i>	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. acidophilus</i>
FVS agitado	0,20	0,149	0,19	0,13	0,13
FVS estático	0,19	0,063	0,09	0,12	0,06
MRS agitado	0,23	0,69	0,8	0,55	0,37
MRS estático	1,25	0,67	0,62	0,50	0,37

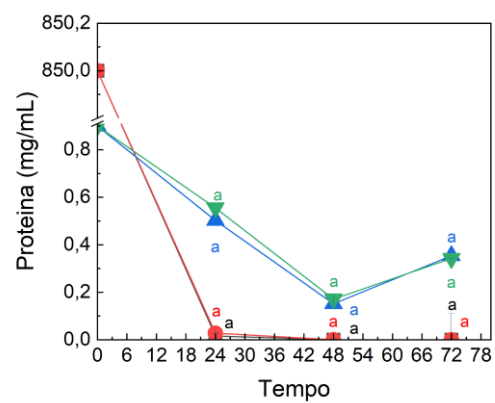
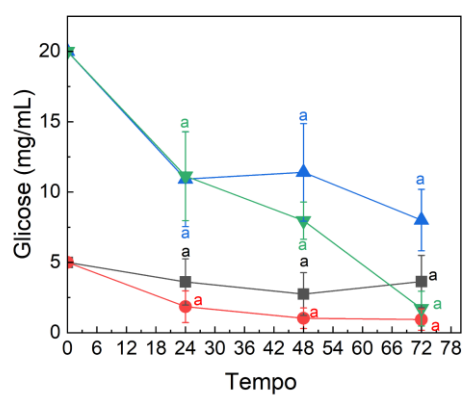
A) *L. crispatus*



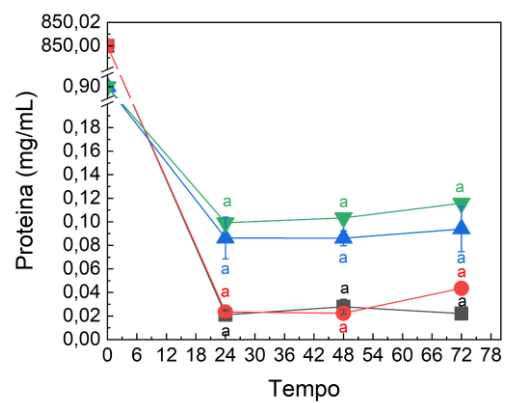
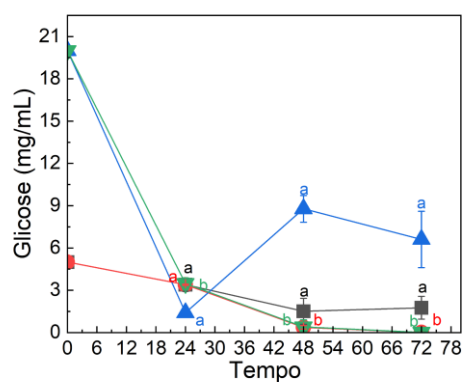
B) *L. gasseri*



C) *L. acidophilus*



D) *L. johnsonii*



E) *L. rhamnosus*

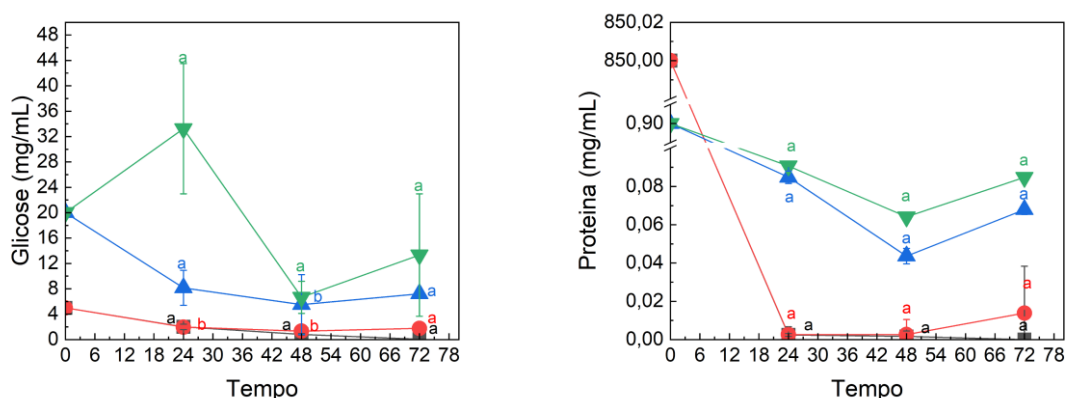


Figura 7: Determinação de glicose nos sobrenadantes de cultivos de *Lactobacillus* em meio Fluido Vaginal Simulado (FVS) e controle (MRS). Cultivos em FVS com agitação (▼) e estático (▲). Cultivos controle com meio MRS com agitação (●) e estático (■). Condições de cultivo: agitação de 180 rpm, 30°C.

As determinações de proteína foram realizadas no sobrenadante do meio de cultivo, após a remoção das células por centrifugação (Figura 7). Dada a concentração limitada de fonte de nitrogênio em meio FVS, as medidas de proteína apresentaram valores próximos de zero, devido ao consumo desta fonte. Por outro lado, em meio MRS, que contém concentrações de fonte de nitrogênio muito superiores, aproximadamente 944,44 vezes maiores que no meio FVS, não foram observadas variações significativas na determinação de proteínas, o que permite supor que esse nutriente estava disponível em quantidade superior à necessidade metabólica.

7.4 Determinação de pH e acidez

Foram realizadas determinações de pH do sobrenadante do meio de cultivo, após remoção das células por centrifugação. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 8. De maneira geral, os *Lactobacillus* são aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, sendo consumidores de glicose e produtores de ácido lático. Dessa forma, seria esperada a acidificação do meio para valores em torno de pH 3 e 4. De fato, observou-se acidificação do meio nos cultivos com *L. crispatus*, *L. rhamnosus* e *L. acidophilus*, em ambas as condições de cultivos, estática ou agitada, tanto em meio FVS, quanto MRS.

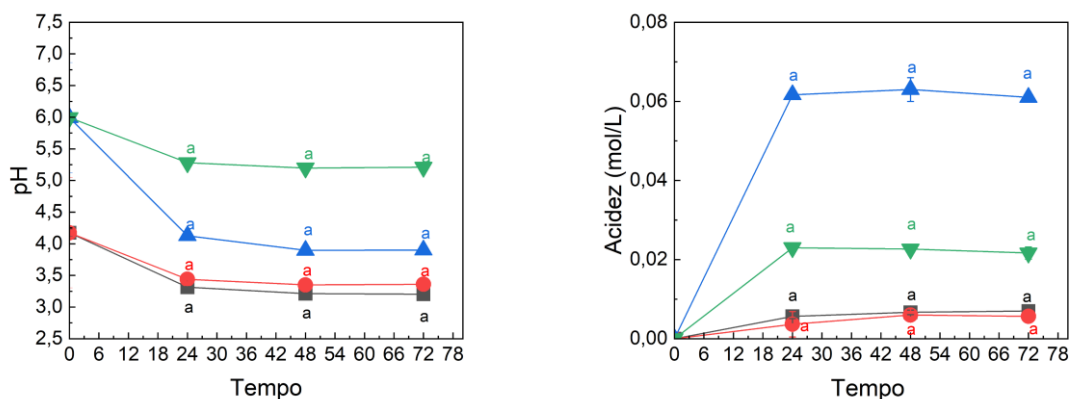
Os cultivos com *L. johnsonii* e *L. gasseri* mostraram algumas diferenças em relação aos demais *Lactobacillus*. Nos cultivos com *L. johnsonii*, em meio controle MRS ocorreu acidificação tanto nos cultivos agitados quanto estáticos. Porém, em meio FVS, o pH dos cultivos estáticos permaneceu sem alteração e em valor em torno de 4,5. Já nos cultivos agitados verificou-se aumento de pH, alcançando pH 7 com 48 h de cultivo.

Nos cultivos com *L. gasseri*, em meio MRS ocorreu acidificação do meio, ainda que menos intensa do que observado para as outras espécies. Em meio FVS, o pH permaneceu constante e em torno de pH 4,5, tanto estático, quanto agitado.

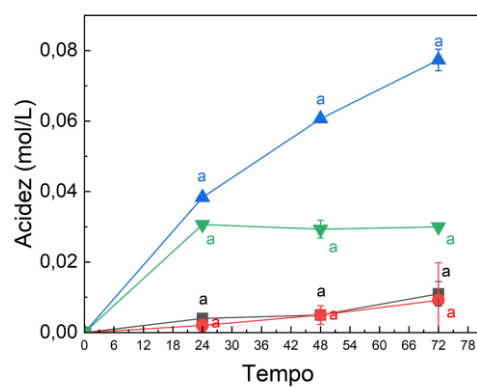
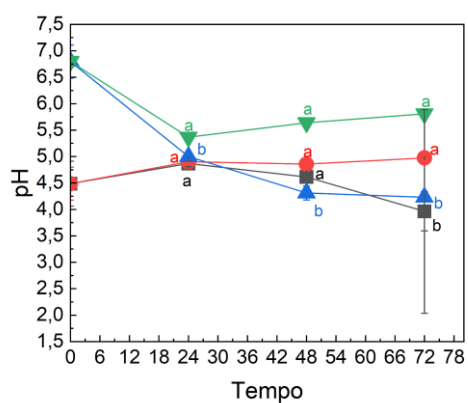
É importante destacar que o pH inicial não foi corrigido, resultando em variação na medida inicial tanto no MRS quanto no FVS. Além disso, é relevante mencionar os baixos desvios-padrão, que variam de 0,03 a 0,6.

Todos os *Lactobacillus* utilizados neste trabalho são homofermentativos. Isso significa que essas cepas são capazes de degradar açúcares através da via glicolítica, levando à formação de piruvato. Este último é posteriormente reduzido a ácido láctico graças à presença da lactato desidrogenase (LDH). Nas espécies homofermentativas, uma molécula de glicose é convertida em duas moléculas de ácido láctico. Nas espécies heterofermentativas, uma molécula de glicose é convertida em uma molécula de ácido láctico e uma molécula diferente, como etanol, CO₂ ou outros ácidos (TORTORA et al.2017).

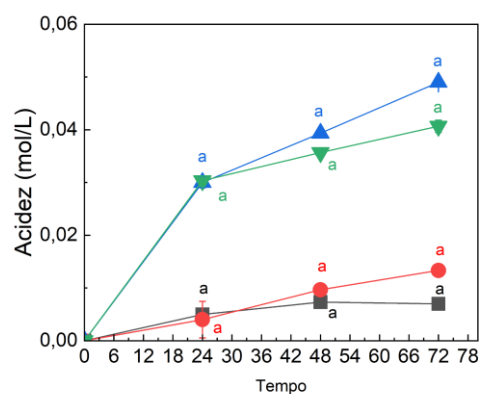
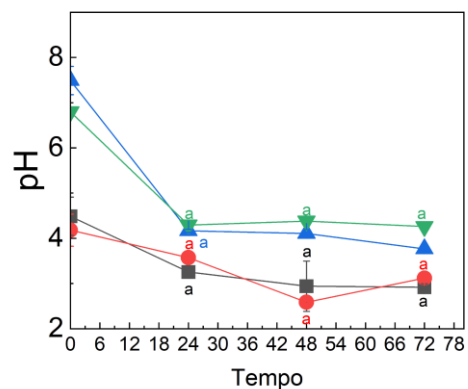
A) *L. crispatus*



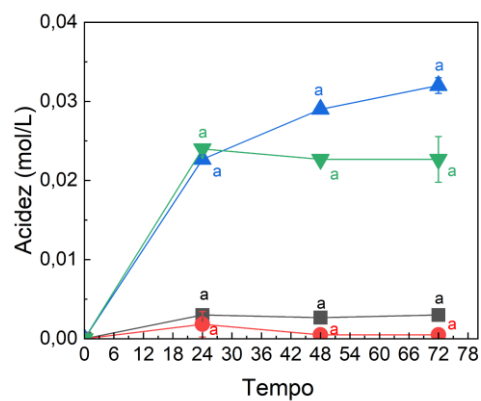
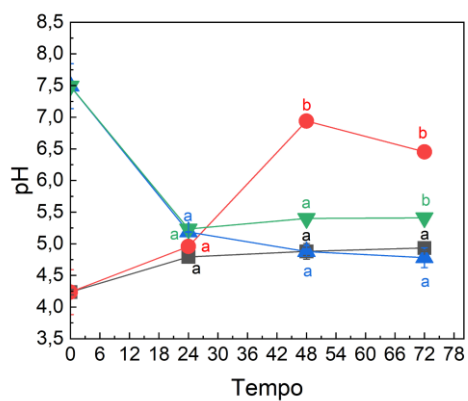
B) *L. gasseri*



C) *L. acidophilus*



I) *L. johnsonii*



D) *L. rhamnosus*

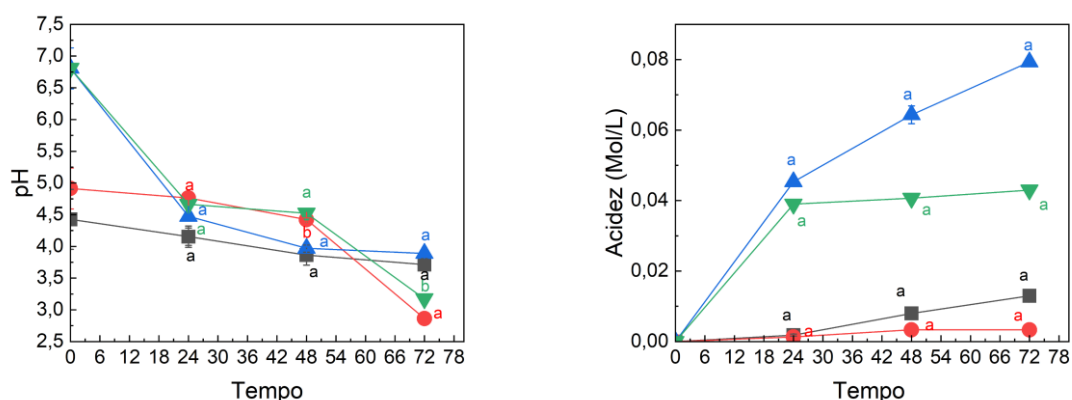


Figura 8: Determinação de pH nos sobrenadantes de cultivos de *Lactobacillus* em meio Fluido Vaginal Simulado (FVS) e controle (MRS). Cultivos em FVS com agitação (●) e estático (■). Cultivos controle com meio MRS com agitação (▼) e estático (▲). Condições de cultivo: agitação de 180 rpm, 30°C.

A determinação de acidez foi realizada com o sobrenadante do meio de cultivo, após remoção das células por centrifugação, utilizando método titulométrico. A acidez foi determinada como acidez total, por neutralização com NaOH 0,1 mol/L. Observa-se que os cultivos com meio MRS apresentaram maiores valores de acidez do que os cultivos em meio FVS. Em meio FVS, os cultivos estáticos ou agitados demonstraram o mesmo perfil de acidez, provavelmente devido à pequena concentração de glicose inicial, que consequentemente foi convertida à pequena concentração de ácidos.

Com os cultivos com *L. johnsonii* e *L. acidophilus*, destaca-se o fato de que comparando-se os meios estáticos e agitados, de um mesmo meio de cultivo (MRS ou FVS), não foi observada diferença significativa no perfil de acidez.

8. INFLUÊNCIA DAS DIFERENTES FONTES DE CARBONO NO CULTIVO DE *LACTOBACILLUS* EM FLUIDO VAGINAL SIMULADO.

8.1 Monossacarídeos (glicose, frutose e galactose)

Para realização dos experimentos, foi preparado inóculo cultivando as cepas em meio MRS contendo 20 g/L de glicose. Após 48 h de incubação, 1 mL do meio foi transferido para os frascos com FVS ou MRS (controle). Cada frasco continha inicialmente 10^6 cel/mL. Os diferentes *Lactobacillus* foram cultivados em meio FVS contendo glicose, frutose ou galactose, a 5 g/L, por 48 h, com agitação (180 rpm) ou estáticos.

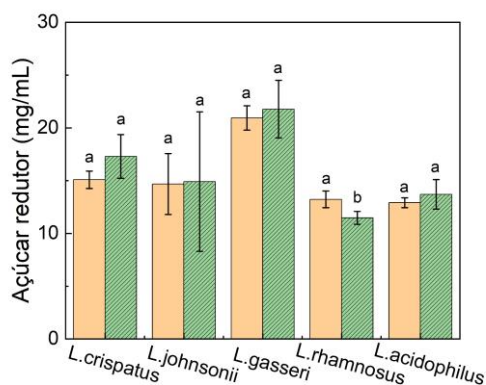
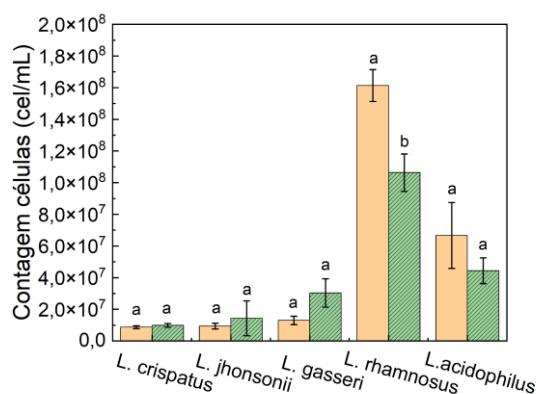
Em relação ao crescimento celular em meio FVS, podem ser destacados os seguintes resultados:

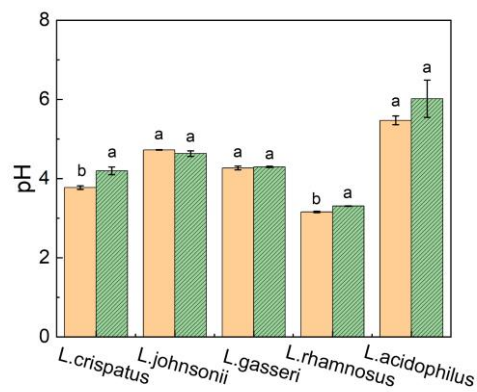
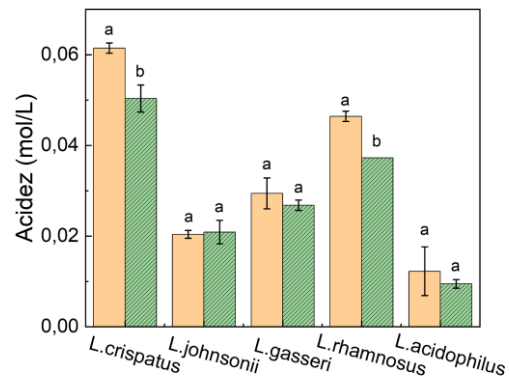
1. *L. rhamnosus* apresentou crescimento superior aos demais microrganismos com os 3 monossacarídeos testados.
2. Os cultivos com *L. rhamnosus* apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os valores de crescimento celular em processo estático e agitado. Porém, os resultados variaram com o açúcar adicionado: cultivos com frutose apresentaram maior crescimento agitados, enquanto com galactose e glicose, estáticos.
3. Cultivos com *L. acidophilus* apresentaram o segundo melhor crescimento nos diferentes açúcares, mas não houve diferença significativa entre processos estáticos ou agitados.
4. Cultivos com *L. gasseri* destacaram-se pelo terceiro melhor crescimento em glicose e galactose, e nestes experimentos, os processos estáticos e agitados apresentaram diferença estatisticamente significativa, com melhores resultados nos cultivos agitados.
5. Cultivos com *L. johnsonii* apresentaram destaque apenas nos cultivos com frutose em processo agitado.

Em relação ao açúcar redutor quantificado após as 48 h de cultivo em meio FVS, destacam-se os seguintes resultados:

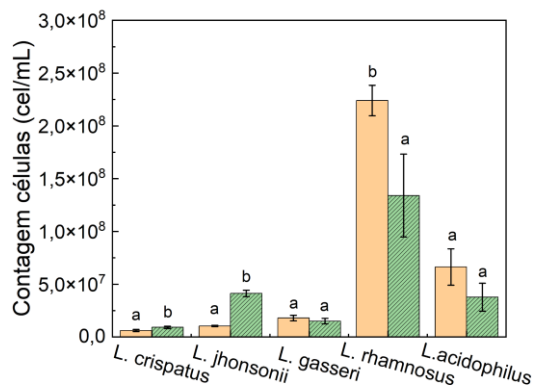
1. A quantificação do açúcar redutor residual resultou em valores entre 8 e 22 mg/mL, para todos os microrganismos e açúcares testados. Considerando que os experimentos foram iniciados com 5 g/L de cada monossacarídeo, verificou-se consumo de 95 a 99% da quantidade inicial.
2. Na maioria dos cultivos, o consumo de açúcar não foi estatisticamente diferente nos processos estáticos ou agitados. As únicas exceções foram os cultivos com: *L. rhamnosus*, que apresentaram maior consumo de açúcares nos cultivos estáticos; e *L. gasseri*, que com maior consumo de galactose em cultivo agitado

Cultivos com glicose

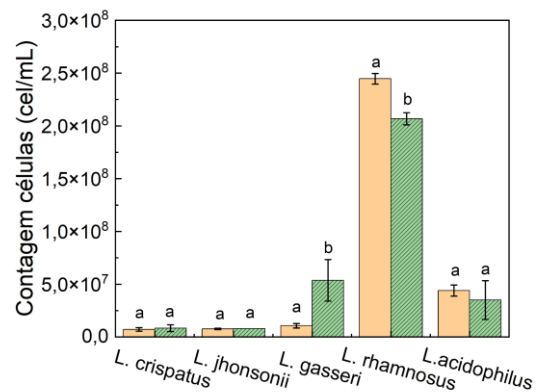




Cultivos com frutose



Cultivos com galactose



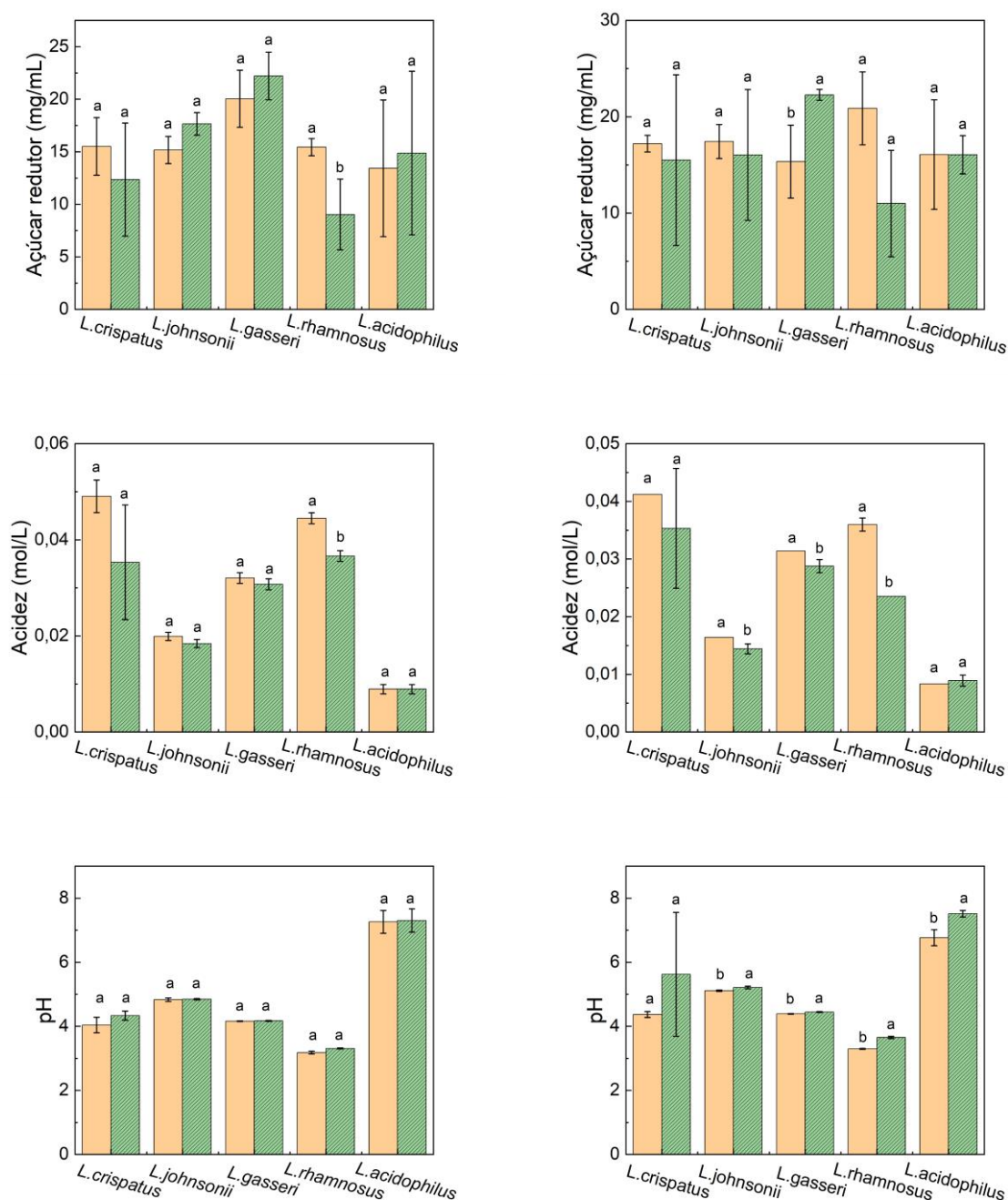


Figura 9: Determinação de crescimento na presena de diversas fontes de carbono em cultivos de *Lactobacillus* em meio Fluido Vaginal Simulado (FVS). Cultivos em estático (■) e com agitação (■). Condições de cultivo: agitação de 180 rpm, 30°C, 48 h. Microrganismos: *L. crispatus* ; *L. johnsonii* ; *L. gasseri* ; *L. rhamnosus* ; *L. acidophilus*

Em relao a acidez e pH do meio de cultivo FVS verificou-se que:

1. Os cultivos com *L. crispatus* foram os que proporcionaram maiores valores de acidez em todos os aares testados. Entretanto, apenas nos cultivos com

glicose observou-se maior acidez em meio estático do que agitado, com uma diferença estatisticamente significativa.

2. Os cultivos com *L. rhamnosus* apresentaram valores de acidez menores do que *L. crispatus*, mas superiores aos demais *lactobacilos*, em todos os açúcares testados. Destaca-se o fato de que os cultivos com *L. rhamnosus* apresentaram maior acidez em processo estático do que agitado, e a diferença foi estatisticamente significativa.
3. Os cultivos com *L. gasseri* apresentaram valores de acidez intermediários entre os diferentes *lactobacilos* testados. Apenas nos cultivos com galactose observou-se maior acidez no processo agitado do que no estático, estatisticamente significativa. Com glicose e frutose, não houve diferença entre os processos.
4. Os cultivos com *L. johnsonii* e *L. acidophilus* apresentaram os menores valores de acidez, sem diferença significativa entre processo estático ou agitado.
5. As medidas de pH do meio de cultivo nos experimentos com *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. gasseri* e *L. rhamnosus* variaram entre 3 e 5. Ainda que os testes estatísticos até apontem diferenças significativas, analisando médias e desvio-padrão, não há diferença importante entre os processos estáticos ou agitados em relação ao parâmetro pH para esses microrganismos.
6. Corroborando com os resultados de acidez (foram as menores medidas), os cultivos de *L. acidophilus* apresentaram os maiores valores de pH, sem diferença estatística entre processos estáticos ou agitados.

8.2 Lactose

Para realização dos experimentos, as cepas foram crescidas em meio MRS contendo 20 g/L de glicose. Após 48 h de incubação, 1 mL do meio foi transferido para os frascos com meio FVS e lactose ou meio MRS e glicose (controle). Cada frasco continha inicialmente 10^6 cel/mL. (Figuras 10)

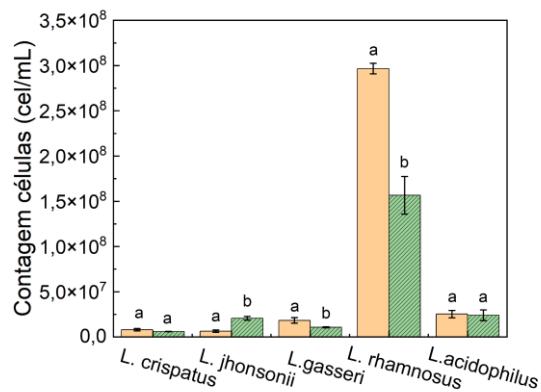
Em relação ao crescimento celular em meio FVS contendo lactose, observa-se que:

1. Os cultivos com *L. rhamnosus* foram os que apresentaram os maiores valores de crescimento celular em comparação com as outras cepas, na ordem de 10^8

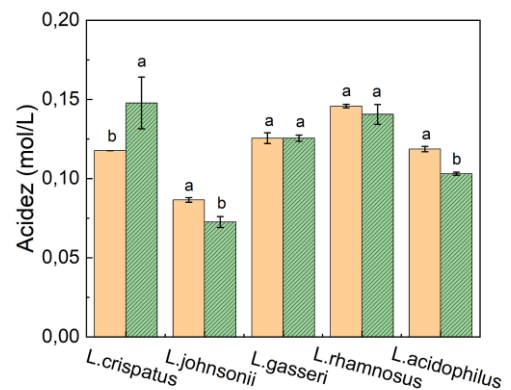
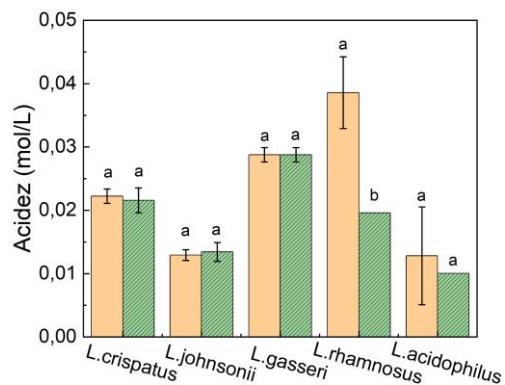
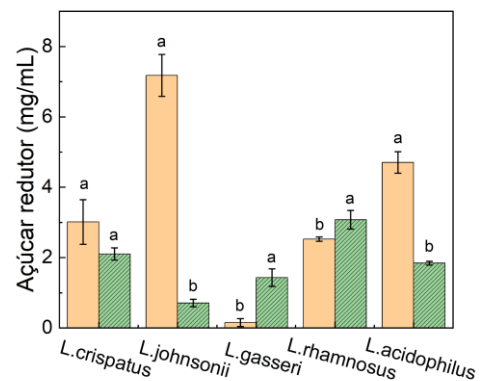
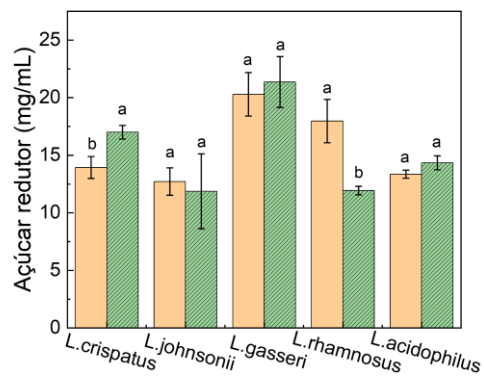
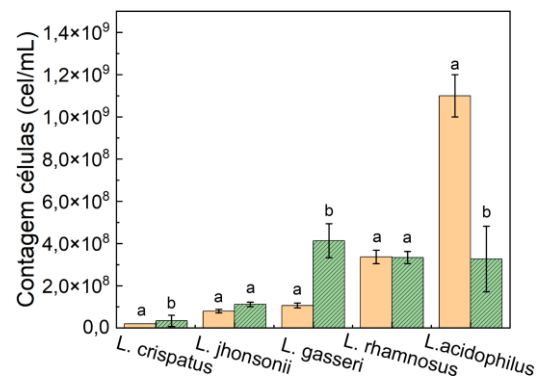
cel/mL. Destaca-se que o processo estático proporcionou resultados significativamente superiores.

2. As demais cepas apresentaram crescimento na ordem de 10^7 cel/mL, sem diferença importante entre cultivos estáticos ou agitados.

FVS Lactose



MRS Glicose



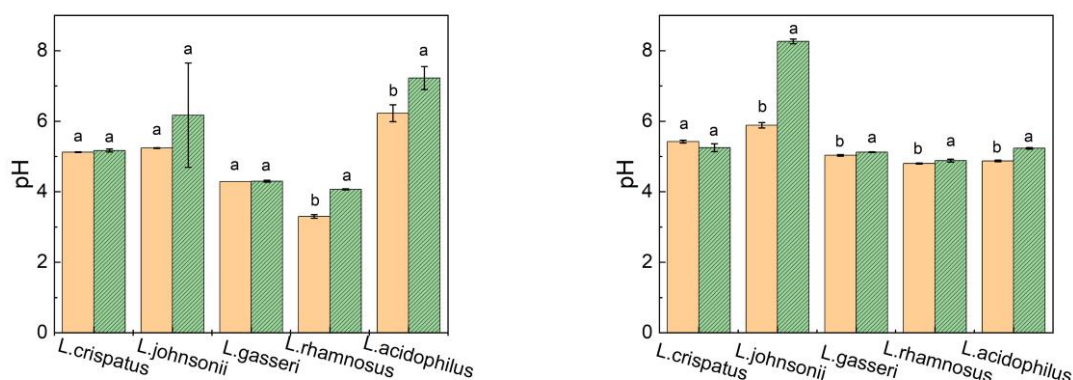


Figura 10: Determinação de crescimento na presença de dicarrídeos como fonte de carbono em cultivos de *Lactobacillus* em meio Fluido Vaginal Simulado (FVS) e o Meio controle (MRS). Cultivos em FVS e MRS estático (■) ou com agitação (■). Condições de cultivo: agitação de 180 rpm, 30°C, 48 h. Microrganismos: *L. crispatus* ; *L. johnsonii* ; *L. gasseri* ; *L. rhamnosus* ; *L. acidophilus*..

Em relação aos parâmetros de cultivo, observa-se que:

1. As medidas de açúcar redutor foram quantificadas entre 2 e 10 mg/mL em todos os experimentos com meio FVS. Isso significa que todas as cepas consumiram mais de 90% do açúcar inicial, independente do processo ser agitado ou estático. Os resultados indicam que as cepas do presente estudo produzem lactases (3.2.1.108 lactose galactohidrolase), permitindo a hidrólise da ligação glicosídica, liberação dos monossacarídeos e sua utilização como fonte de energia (Fig 10).
2. O maior valor de acidez (em média 40 mmol/L) e o menor valor de pH (em torno de 3,5) foram medidos nos cultivos estáticos de *L. rhamnosus*, nos quais também foram detectados os maiores valores de crescimento celular. Destaca-se que neste experimento, os processos estáticos e agitados foram estatisticamente diferentes (Fig 10).
3. Nos cultivos com *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. johnsonii* e *L. acidophilus*, os valores de acidez variaram entre 10 e 30 mmol/L, e pH entre 4 e 7, sem diferença estatisticamente significativa entre os processos agitados e estáticos (Fig 10).

8.3 Amido

Para realização dos experimentos, as cepas foram crescidas em meio MRS contendo 20 g/L de glicose. Após 48 h de incubação, 1 mL do meio foi transferido para os frascos com meio FVS e amido ou meio MRS e amido (controle). Cada frasco continha inicialmente 10^6 cel/mL. (Figuras 11).

Em relação ao crescimento celular, os dados indicaram crescimento irrisório, tanto em meio FVS quanto MRS. A análise de outros parâmetros de cultivo corrobora esse resultado, como destacado a seguir:

1. Neste experimento, diferente do que havia sido realizado nos experimentos anteriores, o açúcar foi medido pelo método Fenol sulfúrico, pois o amido é polissacarídeo não redutor, tendo que ser quantificado por método de açúcar total. Observou-se consumo muito pequeno do amido, tanto em meio MRS quanto FVS. Os resultados indicam que as cepas de *Lactobacillus* não secretaram carboidrases necessários para a hidrólise do polissacarídeo, pois mesmo em meio rico em nutrientes, como o meio MRS, não houve consumo desse polissacarídeo. Da mesma forma, a presença de oxigênio não alterou o consumo do carboidrato.
2. Um teste qualitativo com adição de iodo ao sobrenadante de cultivo corroborou a afirmação de que o amido praticamente não foi consumido. Os tubos testes ficaram fortemente coloridos pela complexação do iodo com o amido.
3. Observou-se pH acima de 5 e baixos valores de acidez em todos os experimentos, tanto em meio MRS quanto FVS. Esses resultados refletem o pequeno consumo do açúcar, não ocorrendo produção de ácidos orgânicos, como o ácido láctico.
4. Apesar de alguns resultados pontuais apresentarem diferença estatística entre processos estáticos e agitados, os dados no geral não indicam que um processo ou outro promova o crescimento/metabolismo dos microrganismos na presença de amido.

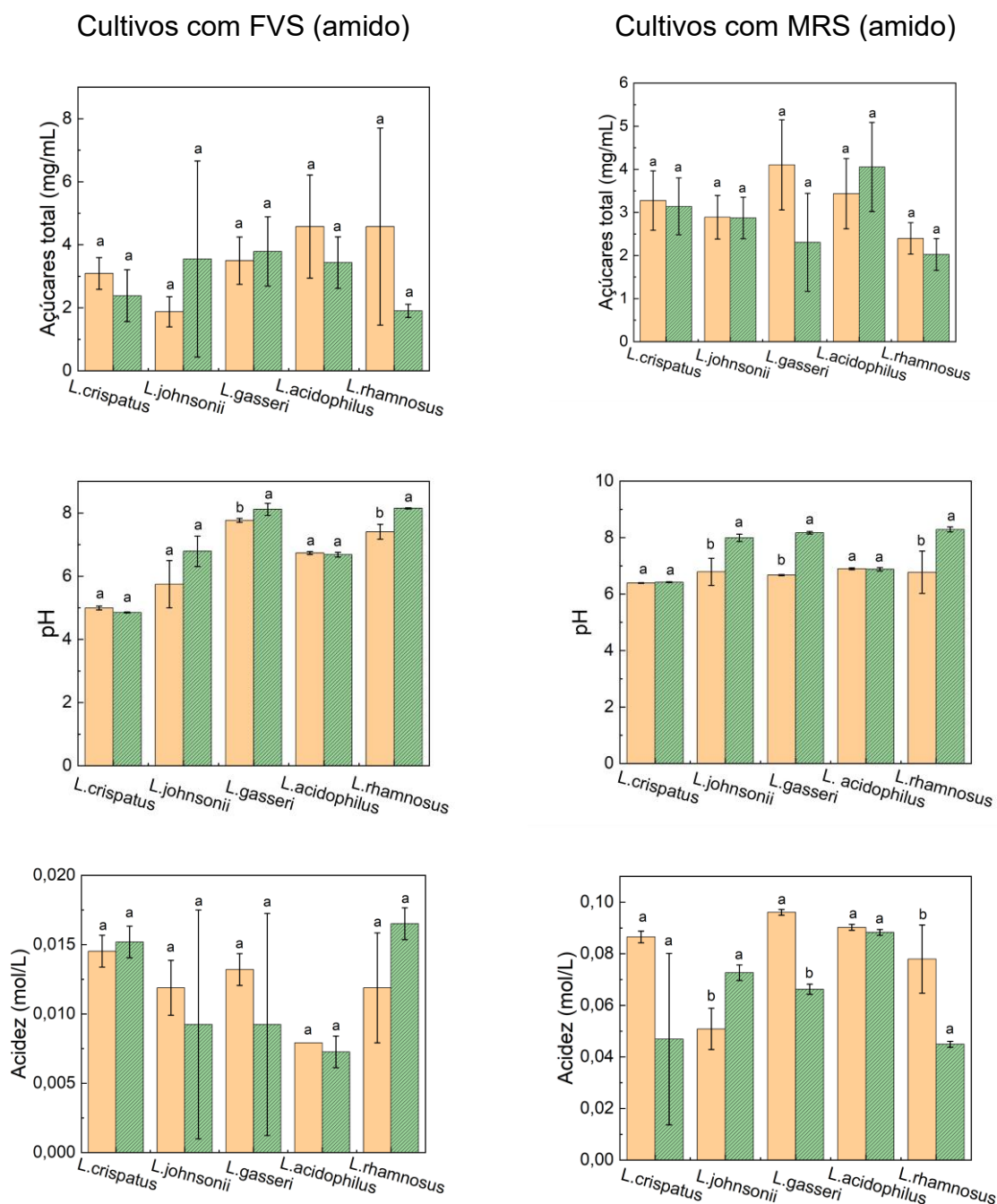


Figura 11: Parâmetros de cultivo na presença de amido como fonte de carbono em cultivos de *Lactobacillus* em meio FVS ou meio controle (MRS). Cultivos estático (■) e agitado (■). Condições de cultivo: agitação de 180 rpm, 30°C, 48 h. Microrganismos: *L. crispatus* ; *L. johnsonii* ; *L. gasseri* ; *L. rhamnosus* ; *L. acidophilus*..

8.4 Curva de crescimento de *Lactobacillus crispatus* em glicose

Para avaliar com mais detalhes o crescimento celular e parâmetros de cultivo em meio FVS, foi realizada uma curva de crescimento utilizando glicose. Para isso, foi selecionada a cepa de *L. crispatus*, por pertencer a microbiota vaginal e estar inserida

na classe CST I proposta por Ravel et al. (2011). Os cultivos foram realizados em frascos de 125 mL com 25 mL de meio FVS ou MRS, ambos com glicose.

Em relação ao crescimento celular, em meio FVS não foi observado o perfil de crescimento típico de microrganismos, com uma fase lag, uma fase log ou exponencial e uma fase estacionária. Na verdade, por todo o período do experimento observou-se um lento crescimento. Para explicar esse comportamento, parece razoável propor que a composição do meio FVS precisa ser adequada para o crescimento de microrganismos em relação a outros nutrientes, além da fonte de carbono. Em meio MRS, observou-se perfil de crescimento próximo do esperado, concordando com a idéia de que o resultado obtido em meio FVS não se deve à cepa, mas sim à composição do meio.

Em meio MRS, a fase exponencial de crescimento ocorreu nas primeiras 12 h do experimento, entretanto, em um período no qual não foram coletadas amostras. Devido aos poucos dados experimentais, não foi possível calcular com precisão a velocidade específica de crescimento. Realizando um cálculo aproximado, obteve-se uma velocidade média de 2×10^8 cel/mL/h.

Em relação aos parâmetros de cultivo, podem ser destacados os seguintes resultados:

1. As medidas de açúcar redutor indicaram rápido consumo nas primeiras 6 h de cultivo, tanto com o meio MRS quanto FVS.
2. As medidas de proteína não apresentaram flutuações significativas ao longo do cultivo. As medidas com MRS são superiores ao meio FVS porque a composição do meio de cultivo apresenta quantidade superior de fonte de nitrogênio orgânica.
3. Os cultivos com meio FVS apresentaram aumento de acidez nas primeiras horas de cultivo, mantendo-se constantes nos períodos posteriores. Esse resultado reflete o esgotamento do açúcar após 6 h de cultivo, impossibilitando a produção de ácidos a partir desse período. A acidez em meio MRS é bastante superior ao meio FVS, justamente pela maior quantidade de açúcar adicionado. Ainda assim, destaca-se o fato dos perfis de produção de ácidos serem iguais entre os dois meios.
4. As medidas de pH do meio de cultivo corroboram as medidas de acidez, observando-se intensa queda de pH nas primeiras horas de cultivo, quando também são consumidos os açúcares do meio.

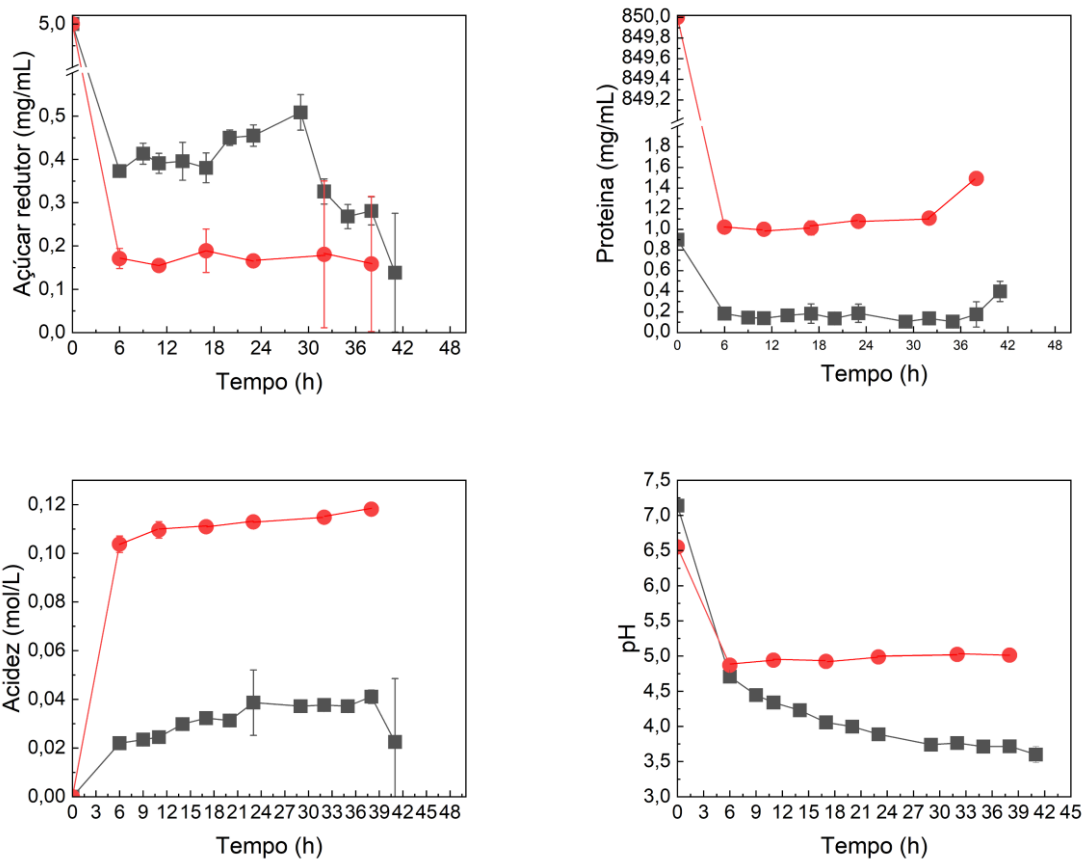


Figura 12: Determinação de crescimento celular e parâmetros de cultivo em meio FVS contendo glicose como fonte de carbono em cultivos de *Lactobacillus crispatus*. MRS (●) FVS(■). Condições de cultivo: agitação de 180 rpm, 30°C. Microrganismo: *L.crispatus*.

9.0 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O objetivo do presente estudo é contribuir com o conhecimento sobre a fisiologia/bioquímica de bactérias do gênero *Lactobacillus* em ambiente vaginal simulado, visando a utilização destes microrganismos como probióticos. Dessa forma, o Fluido Vaginal Simulado (Owen e Katz et al., 1999) foi utilizado como meio de cultura para estes microrganismos, a fim de investigar as possíveis respostas destas bactérias às condições do aparelho genito-urinário feminino em relação a crescimento, consumo de glicose e acidificação do ambiente. O estudo do crescimento de *Lactobacillus* em meio FVS é inovador, uma vez que na literatura atual, até o momento, só existem referências ao FVS (Owen e Katz et al., 1999) em estudos que abordam a relação desse fluido com os biofilmes que podem ocorrer na região vaginal (Borges et al., 2011; Fernandes et al., 2023).

Os *Lactobacillus* são bactérias amplamente conhecidas e estudadas. *L. acidophilus*, por exemplo, foi isolada por Moro (1900) das fezes de crianças alimentadas com leite materno e acreditava-se ser a mesma espécie dos *Lactobacillus* vaginais, denominados genericamente de Bacilos de Doderlein. Estas bactérias crescem em caldo glicosado a 2% com gotas de ácido láctico ou acético, com pH em torno de 5. O crescimento é estimulado por vitaminas do complexo B, presentes em extrato de levedura. A temperatura ótima de crescimento é de 37°C. São bactérias consumidoras de glicose e lactose, e produzem acidificação até pH 3,5 a 4. Essa descrição já estava no livro de Microbiologia e Imunologia, de Otto Bier, publicado em 1965. Entretanto, as condições fisiológicas e patológicas da região vaginal são diferentes das condições laboratoriais da microbiologia básica. Sendo assim, o entendimento destas bactérias em condições que simulem o ambiente *in vivo* é de suma importância.

Para controle dos experimentos, neste trabalho, foi utilizado o meio MRS (De Man, Rogosa e Sharpe), amplamente empregado na literatura para o cultivo de *Lactobacillus* em estudos de microbiologia. A Tabela 1 apresenta a comparação de nutrientes entre os meios MRS e FVS, evidenciando que o meio MRS contém maior concentração de glicose, além de fontes de nitrogênio orgânico e extrato de levedura como fonte de vitaminas.

Por outro lado, o meio FVS apresenta uma formulação menos rica em nutrientes, com concentração de glicose quatro vezes menor que o meio MRS. Quando analisadas as fontes de nitrogênio, observa-se uma diferença ainda mais significativa: enquanto o meio MRS contém 25 g/L (proveniente de extrato de carne, extrato de levedura e proteose peptona), o meio FVS possui apenas 0,5 g/L (derivado de albumina e ureia), representando uma diferença de 50 vezes na disponibilidade desse nutriente. Assim, o meio FVS se mostra menos favorável ao crescimento de *Lactobacillus*, mas serve como uma referência mais próxima do ambiente humano.

Tabela 3: Composição dos meios MRS e FVS utilizados para cultivo das cepas de *Lactobacillus* - fontes de carbono e nitrogênio

Componentes	MRS (g/L)	FVS (g/L)
Extrato de carne	10	
Extrato de levedura	5	
Proteose peptona	10	
Glicose	20	5
Albumina bovina		0,018
Ácido acético		1
glicerol		0,16
ureia		0,4

9.1 Influência da aeração no crescimento de *Lactobacillus* em meio FVS

Em relação à disponibilidade de oxigênio, os *Lactobacillus* são classificados como anaeróbios facultativos (Tortora et al. 2017 e Nelson et al., 2019). Para avaliar a influência do oxigênio no crescimento bacteriano considerando o ambiente vaginal, foram realizados cultivos agitados e estáticos, em meio FVS.

No meio FVS, as contagens celulares apresentaram a mesma ordem de grandeza em ambas as condições (agitada e estática), possivelmente devido à escassez de

glicose e fontes de nitrogênio, que foram rapidamente consumidas. Por outro lado, no meio MRS, observou-se que *L. gasseri*, *L. johnsonii* e *L. crispatus* apresentaram crescimento mais intenso em cultivos agitados, sugerindo um benefício da maior disponibilidade de oxigênio. Já *L. rhamnosus* foi a única espécie que apresentou crescimento favorecido em cultivo estático, enquanto *L. acidophilus* demonstrou comportamento indiferente à agitação.

Considerando que os *Lactobacillus* são anaeróbicos facultativos, podem realizar tanto respiração aeróbica quanto anaeróbica (Fig. 13). Na respiração aeróbica, a glicose é completamente oxidada, sendo todos os carbonos convertidos a CO₂. A glicose é inicialmente oxidada pela via glicolítica, até piruvato (no citoplasma). O piruvato é convertido a acetil-CoA por descarboxilação oxidativa e posteriormente oxidado nas reações do ciclo de Krebs (matriz mitocondrial). Todas as oxidações liberam elétrons que são carregados por transportadores como NADH e FADH₂, para a cadeia respiratória (membrana mitocondrial interna). Neste processo, o oxigênio é oceptor final dos elétrons, gerando água e CO₂. Graças ao bombeamento de prótons que ocorre simultaneamente ao transporte de elétrons, na cadeia respiratória, a enzima ATP sintase catalisa a ligação de um fosfato a uma molécula de ADP, liberando ATP. Neste processo, uma molécula de glicose proporciona o rendimento de 32 moléculas de ATP, e não ocorre a formação de ácido láctico (Nelson et al., 2019).

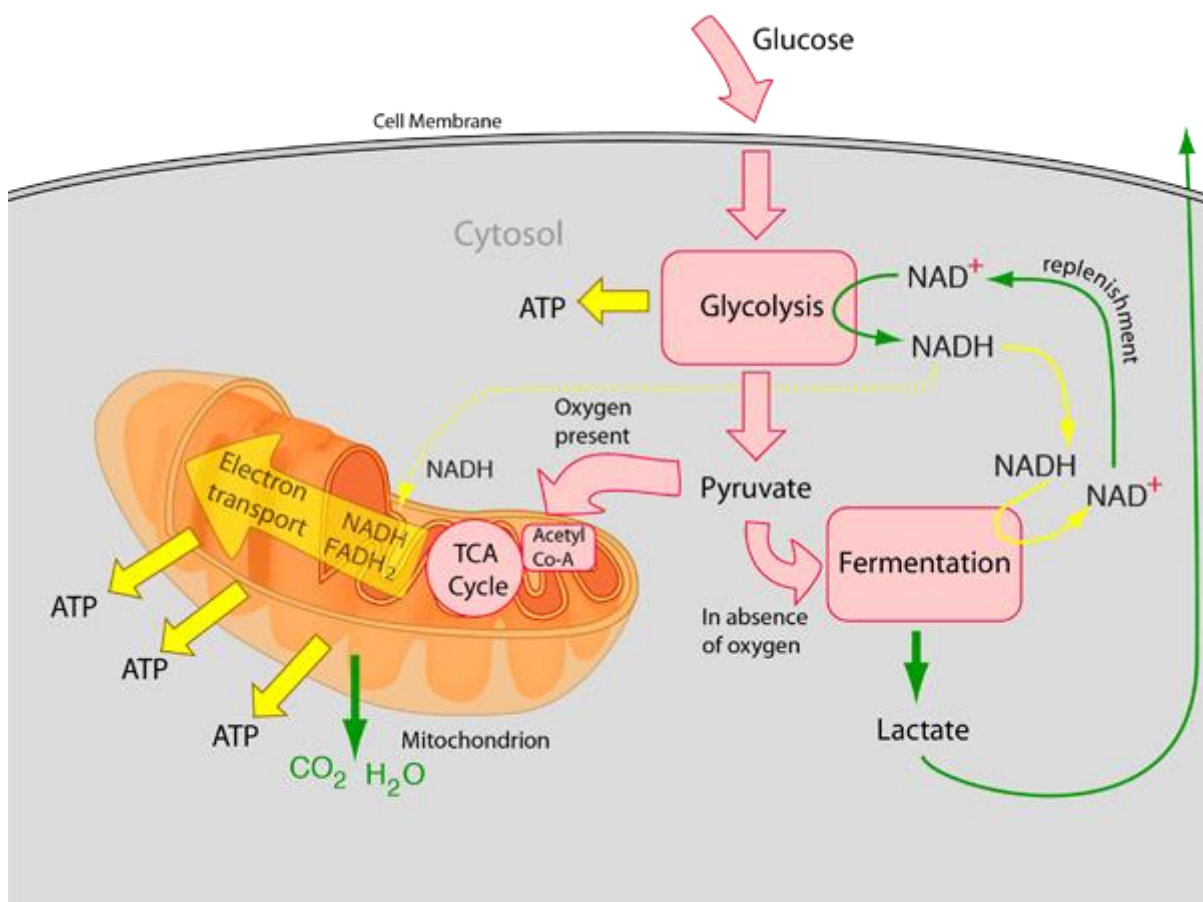


Figura 13: Mecanismo de respiração celular

Fonte: <http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/Biology/celres.html>

No entanto, em condições de baixa disponibilidade de oxigênio ou em bactérias anaeróbicas, ocorrem vias metabólicas alternativas, como a fermentação (oxidação anaeróbica). A glicólise é uma via metabólica que ocorre no citoplasma, independente da presença de oxigênio. Para cada molécula de glicose, a via glicolítica proporciona a liberação de 2 moléculas de ATP até a formação de piruvato. No caso dos *Lactobacillus*, na ausência de oxigênio, a oxidação da glicose é incompleta, e o piruvato é convertido a ácido láctico pela ação da lactato desidrogenase, regenerando o NAD⁺, um cofator essencial para a continuidade da glicólise. Sem essa regeneração, a glicólise cessaria, comprometendo a produção de ATP e levando à morte celular (Madigan et al. 2016; Tortora et al. 2017). Nesse contexto metabólico, o rendimento energético é menor do que em aerobiose, há a formação e acúmulo de ácido láctico e maior consumo de glicose (Nelson et al., 2019).

Dessa forma, era esperado que nos cultivos estáticos ocorresse maior acidificação do meio de cultura. Esse resultado foi verificado no presente estudo em todos os cultivos em meio MRS, em todas as cepas avaliadas. Ainda que a acidez tenha aumentado também nos meios agitados, a acidez dos cultivos com meio MRS em processo estático foi superior. Os cultivos com meio FVS apresentavam 4 vezes menos glicose do que o meio MRS. O rápido esgotamento do açúcar deve ter contribuído para a pequena acidez detectada nessa condição.

A variação de pH e acidez desempenha um papel crucial no ambiente cervical, pois influencia diretamente os microrganismos presentes na microbiota, determinando se estará em estado de eubiose (equilíbrio) ou disbiose (desequilíbrio). A disbiose, em particular, contribui para a redução da integridade do muco cervical, já que bactérias anaeróbicas presentes nesse estado tendem a consumir ácido siálico, gerando metabólitos como a sialidase, uma enzima que degrada o muco cervical. Esse processo está associado a complicações importantes, como parto prematuro, infecção intrauterina durante a gravidez e infecções vaginais (Lacroix et al., 2020 e Guillaume et al., 2020).

9.2 Influência de diferentes açúcares no crescimento de *Lactobacillus*, em meio FVS, estático e agitado.

No presente estudo, foram utilizadas diversas fontes de carboidratos para analisar os padrões nutricionais dos *Lactobacillus*, abrangendo:

- 1) monossacarídeos (glicose e galactose, ambas aldo-hexoses, e a frutose, uma cetohexose Fig 14),
- 2) dissacarídeo (lactose, açúcar redutor, glicose $\beta(1\rightarrow4)$ galactose, Fig 15).
- 3) polissacarídeo (glicogênio, Fig 16 e amido, Fig 17.).

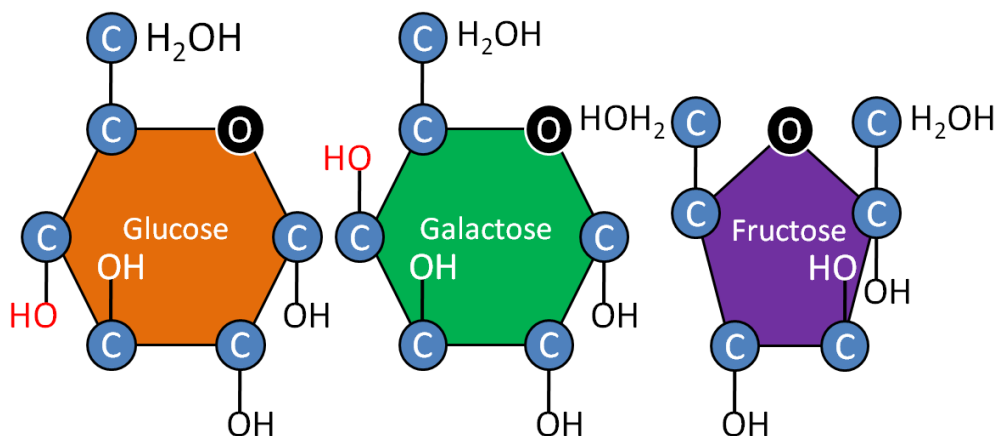


Figura 14: Estrutura química das fontes de carbono simples ($C_6H_{12}O_6$) (Nelson et al. 2019).

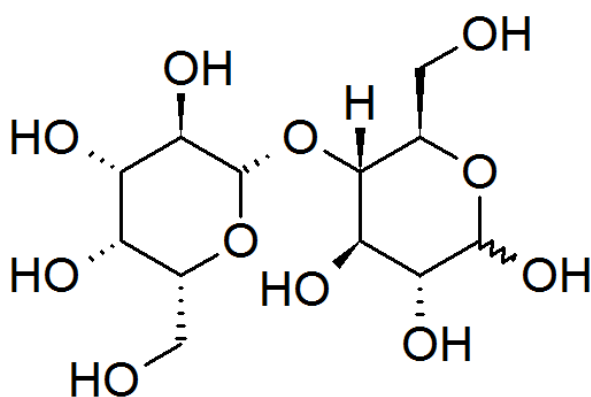


Figura 15: Estrutura química da Lactose (Nelson et al. 2019).

Considerando os experimentos em meio FVS, todas as cepas de *Lactobacillus* foram capazes de crescer em glicose, galactose, frutose e lactose em meio FVS. Entretanto, a intensidade do crescimento celular variou de acordo com a espécie. O crescimento na presença desses açúcares, em um meio nutritivo que simula o ambiente *in vivo* no qual se deseja empregar essas bactérias é de vital importância para estudos de desenvolvimento de probióticos. Tanto para garantir energia metabólica para manter a eubiose no ambiente vaginal, quanto como estratégia de tratamento em caso de disbiose. Entender o metabolismo energético dessas bactérias permitirá propor estratégias de fortalecimento dessas linhagens ou reposição de sua presença, associando assim ação probiótica com prevenção e tratamento de infecções.

Considerando a fisiologia vaginal, a principal fonte de carbono para fornecimento de energia para *Lactobacillus* é o glicogênio, presente nas células da mucosa (Ravel et al. 2011). No presente estudo, utilizou-se amido nos cultivos com *Lactobacillus* na intenção de simular a presença do glicogênio. Tanto o amido quanto o glico-

gênio são polímeros de glicose, unidos por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ em suas cadeias principais e $\alpha(1\rightarrow6)$ em suas ramificações. O grão de amido é composto por dois tipos de cadeia, uma linear (amilose) e outra ramificada (amilopectina). O glicogênio é similar a amilopectina, diferenciando-se por apresentar maior densidade de ramificações (uma a cada 8-12 resíduos de glicose) em comparação com amilopectina (ramificações a cada 20-30 resíduos) Nelson et al. 2019. Neste trabalho, optou-se por utilizar o amido de mandioca justamente pela maior proporção de amilopectina (amilose, cerca de 20-30% e amilopectina, 70-80%) Nelson et al. 2019. A adição de amido de mandioca ao meio FVS poderia se aproximar do ambiente fisiológico e se trata de material muito mais acessível, podendo ser adquirido no comércio local, ao contrário do glicogênio.

O entendimento do metabolismo do glicogênio por *Lactobacillus* é fundamental para esclarecer aspectos diversos da microbiota no canal vaginal, visto que é a fonte primária de energia para esses microrganismos e a origem da produção de ácido láctico, que afeta diretamente o pH local. Apesar dessa importância, ainda existem muitas lacunas a serem esclarecidas e percebe-se que apenas recentemente esse tema tem sido explorado de forma incisiva.

A utilização de glicogênio como fonte primária de carbono para o crescimento e colonização da microbiota do canal vaginal é controversa. Existem relatos indicando que os lactobacilos utilizam os produtos hidrolisados do glicogênio gerados pelas α – amilase humana presente nos fluidos vaginais e não seriam capazes de secretar as próprias carboidrases.

Entretanto, recentemente têm surgido estudos indicando o oposto. Os estudos sobre metabolismo de glicogênio têm sido realizados especialmente com *L. crispatus*, e a identificação de suas carboidrases. As referências nesse sentido tem se acumulado como van der Veer et al. (2019), Zhang et al. (2022), Argentini et al.(2022) e Jenkins et al. (2023).

O trabalho de Argentini et al.(2022) verificou a capacidade de *L. crispatus* em degradar o glicogênio e de atuar em co-culturas com outros *Lactobacillus* fornecendo glicose a partir de glicogênio. O mesmo trabalho identificou genes de carboidrases em *L. crispatus*. Ainda neste estudo, os autores verificaram que outras espécies de *Lactobacillus* de fato não tem capacidade de metabolizar o glicogênio, e que dependeriam de relacionamentos simbióticos para isso.

As cepas utilizadas no presente estudo foram adquiridas no comércio farmacêutico local e são vendidas em cápsulas para uso probiótico oral. Era esperado, portanto, que tivessem capacidade metabólica para sobrevivência em ambiente vaginal e intestinal. As cepas testadas, incluindo *L. crispatus*, não apresentaram capacidade de metabolizar uma alfa-glucana ramificada semelhante ao glicogênio - amilopectina. Na verdade, mesmo a alfa-glucana linear que estava presente em menor proporção - amilose, também não foi hidrolisada. Esse resultado não parece ser devido ao fluido vaginal simulado usado como meio de cultura, pois mesmo em meio de cultura MRS (controle), não ocorreu crescimento, indicando que as cepas não estavam secretando as carboidrases necessárias.

Por outro lado, no trabalho de Argentini et al.(2022) também foi relatado que nem todas as cepas de *L. crispatus* isoladas de amostras de secreção vaginal apresentavam a capacidade de metabolizar o glicogênio.

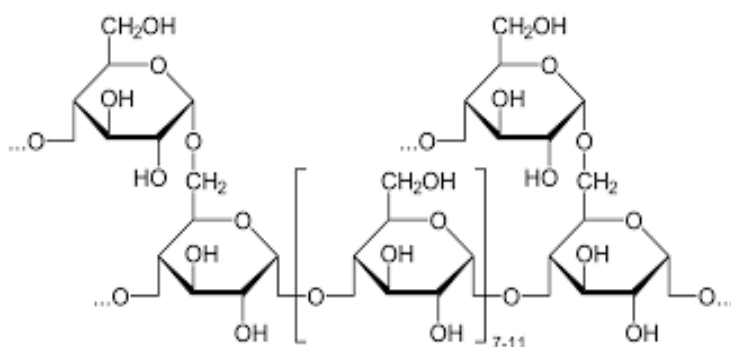


Figura 16: Estrutura química do glicogênio (Nelson et al. 2019).

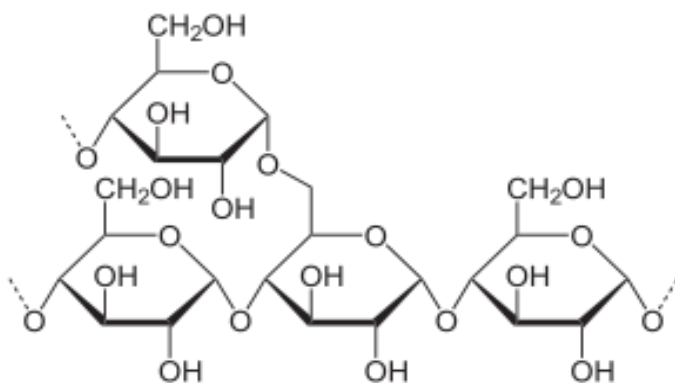


Figura 17: Estrutura química da amilopectina (Nelson et al. 2019).

10. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo indicam que as espécies de *Lactobacillus* analisadas apresentam diferenças significativas em morfologia, crescimento e metabolismo, influenciadas pelo meio de cultura e pelas condições de cultivo. O meio FVS demonstrou ser adequado para o crescimento de *L. crispatus*, *L. gasseri* e *L. johnsonii*, mesmo com baixos níveis de macro e micronutrientes, enquanto no meio MRS, a disponibilidade de oxigênio influenciou o crescimento, conforme esperado para bactérias anaeróbicas facultativas.

O consumo de glicose foi intenso nas primeiras 24 horas, sendo maior no meio MRS, enquanto a limitação de nitrogênio no FVS resultou em baixa concentração de proteína no sobrenadante. A acidificação do meio foi evidente na maioria dos cultivos, com *L. crispatus* apresentando maior produção de ácidos, enquanto *L. johnsonii* cresceu melhor na presença de frutose sob agitação. *L. rhamnosus* destacou-se pelo maior crescimento e eficiência na utilização de açúcares, especialmente em cultivos estáticos.

A análise do consumo de açúcares mostrou que todas as cepas metabolizaram glicose, frutose, galactose e lactose com alta eficiência, consumindo mais de 90% da concentração inicial. No entanto, a incapacidade de metabolizar amido sugere a ausência de enzimas amilolíticas, indicando uma limitação no uso de carboidratos complexos. O efeito da agitação variou conforme a cepa e o tipo de açúcar utilizado, sendo que, para *L. rhamnosus*, o cultivo estático favoreceu o crescimento e a produção de ácidos, enquanto para *L. gasseri*, o cultivo agitado foi mais eficiente. No entanto, para a maioria das cepas, as diferenças entre processos estáticos e agitados não foram estatisticamente significativas quanto ao consumo de açúcar e ao pH final do meio.

Diante desses achados, torna-se evidente a necessidade de estudos adicionais para aprofundar a compreensão dos padrões fisiológicos e bioquímicos dos *Lactobacillus*, incluindo a influência das fontes de carbono, a presença de ácido lático no início da fermentação e possíveis respostas imunológicas mediadas por esses microrganismos. Além disso, o aprimoramento do meio FVS, incorporando parâmetros adicionais, poderá ampliar seu potencial como modelo experimental. Essas questões represen-

tam desafios instigantes para pesquisas futuras e poderão contribuir significativamente para o avanço do conhecimento no campo da microbiota vaginal e suas aplicações biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

- AL KASSAA, I et al. **Antiviral potential of lactic acid bacteria and their bacteriocins.** Probiotics and antimicrobial proteins vol. 6,3-4 (2014): 177-85. doi:10.1007/s12602-014-9162-6.
- ALIMENA, Stephanie et al. The vaginal microbiome: A complex milieu affecting risk of human papillomavirus persistence and cervical cancer. **Current Problems in Cancer**, v. 46, n. 4, p. 100877, 2022.
- ARGENTINI, Chiara et al. Evaluation of modulatory activities of *Lactobacillus crispatus* strains in the context of the vaginal microbiota. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 2, p. e02733-21, 2022.
- BORGES, Sandra F.; SILVA, Joana GL; TEIXEIRA, Paula CM. Survival and biofilm formation of *Listeria monocytogenes* in simulated vaginal fluid: influence of pH and strain origin. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 62, n. 3, p. 315-320, 2011.
- BLUM, H., Beier, H. and Gross, H.J. (1987) **Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels** Electrophoresis, 8, 93-99.
- BRADFORD, M. M.; *Anal. Biochem.* **1976**, 72, 248
- BRUST, Henrike; ORZECOWSKI, Slawomir; FETTKE, Joerg. **Starch and glycogen analyses: Methods and techniques.** Biomolecules, v. 10, n. 7, p. 1020, 2020.
- BRUSSELAERS, Nele et al. **Vaginal dysbiosis and the risk of human papillomavirus and cervical cancer: systematic review and meta-analysis.** American journal of obstetrics and gynecology vol. 221,1 (2019): 9-18. e8. doi: 10.1016/j.ajog.2018.12.011.
- BRUSSELAERS, Nele et al. **Vaginal dysbiosis and the risk of human papillomavirus and cervical cancer: systematic review and meta-analysis.** American journal of obstetrics and gynecology, v. 221, n. 1, p. 9-18. e8, 2019.
- DOORBAR, John. **Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer.** Clinical science (London, England : 1979) vol. 110,5 (2006): 525-41.
- CHEN, Ranzhong et al. Effects of vaginal microbiota on human papillomavirus infection and its related diseases. **Microbial Pathogenesis**, p. 106761, 2024.

CONSOLARO MEL, Maria-Engler SS. **Citologia clínica cérvico-vaginal: texto e atlas**. São Paulo: Roca; 2012.

COQUILLARD G, Palao B, Patterson BK. **Quantification of intracellular HPV E6/E7 mRNA expression increases the specificity and positive predictive value of cervical cancer screening compared to HPV DNA**. Gynecol Oncol. 2011 Jan;120(1):89-93. doi: 10.1016/j.ygyno.2010.09.013. Epub 2010 Oct 14. PMID: 20950847.

DASARI S, Wudayagiri R, Valluru L. Cervical cancer: **Biomarkers for diagnosis and treatment**. Clin Chim Acta. 2015;445: 7–11.

DEREK H. Owen* and David F. Katz. **A Vaginal Fluid Simulant**. Contraception 1999;59:91–95

DONG, Mengting et al. Interactions between microbiota and cervical epithelial, immune, and mucus barrier. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 13, p. 1124591, 2023.

ENGBERTS MK, Verbruggen BS, Boon ME, van Haaften M, Heintz AP. **Candida and dysbacteriosis: a cytologic, population-based study of 100,605 asymptomatic women concerning cervical carcinogenesis**. Cancer. 2007 Oct 25;111(5):269-74. doi: 10.1002/cncr.22947. PMID: 17823916.

FAINTUCH, J. editor. **Microbioma, disbiose, probióticos e bacterioterapia**. Barueri, SP: Ed. Manole, 2017

FERNANDES, Liliana et al. Simulated vaginal fluid: Candida resistant strains' biofilm characterization and vapor phase of essential oil effect. **Journal of Medical Mycology**, v. 33, n. 1, p. 101329, 2023.

HERTZBERGER R, May A, Kramer G, van Vondelen I, Molenaar D, Kort R. **Genetic Elements Orchestrating *Lactobacillus crispatus* Glycogen Metabolism in the Vagina**. Int J Mol Sci. 2022 May 17;23(10):5590. doi: 10.3390/ijms23105590. PMID: 35628398;

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2017.

JENKINS DJ, Woolston BM, Hood-Pishchany MI, Pelayo P, Konopaski AN, Quinn Peters M, France MT, Ravel J, Mitchell CM, Rakoff-Nahoum S, Whidbey C, Balskus EP. **Bacterial amylases enable glycogen degradation by the vaginal microbiome**. Nat Microbiol. 2023 Sep;8(9):1641-1652. doi: 10.1038/s41564-023-01447-2. Epub 2023 Aug 10. PMID: 37563289; PMCID: PMC10465358.

JUÁREZ TOMÁS MS, Nader-Macías MEF. **Effect of a medium simulating vaginal fluid on the growth and expression of beneficial characteristics of potentially probiotic lactobacilli.** In: Méndez-Vilas A, editor. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*. Badajoz, Spain: FORMATEX; 2007. pp. 732–9.

KALIA, Namarta et al. **“Microbiota in vaginal health and pathogenesis of recurrent vulvovaginal infections: a critical review.”** Annals of clinical microbiology and antimicrobials vol. 19,1 5. 28 Jan. 2020, doi:10.1186/s12941-020- 0347-4.

KUSUMA KANDATI A, c, 1, Praveen Belagal b, 1, John Sushma Nannepaga a, *, Buddolla Viswanath c, ** **Role of probiotics in the management of cervical cancer: An update.** Clinical Nutrition ESPEN 48 (2022) 5e16

KENETTA L.N., Jeremy C.C., Joshua N.A., Engbrecht K., Fillmore T., Forney L.J., Vincent B.Y. **Amylases in the Human Vagina.** *mSphere*. 2020;5:e00943-20.

KUMAR, Vinay; ASTER, Jon C.; ABBAS, Abul K.. Robbins & Cotran Patologia: **bases patológicas das doenças**. 9 Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021, 1421 p.

KUMARI, Seema; BHOR, Vikrant M. **Association of cervicovaginal dysbiosis mediated HPV infection with cervical intraepithelial neoplasia.** Microbial Pathogenesis, v. 152, p. 104780, 2021.

LAEMMLI, U.K. 1970. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** Nature, v.227, p.680-685.

LACROIX, Guillaume et al. The cervicovaginal mucus barrier. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, p. 8266, 2020.

LEBEAU, Alizee et al. **HPV infection alters vaginal microbiome through down-regulating host mucosal innate peptides used by Lactobacilli as amino acid sources.** *Nature Communications*, v. 13, n. 1, p. 1076, 2022.

LEWIS, Felicia M T et al. **“Vaginal Microbiome and Its Relationship to Behavior, Sexual Health, and Sexually Transmitted Diseases.”** Obstetrics and gynecology vol. 129,4 (2017): 643-654. doi:10.1097/AOG.0000000000001932

LI, Pengcheng et al. **“Lactobacillus acidophilus S-layer protein-mediated inhibition of Salmonella-induced apoptosis in Caco-2 cells.”** Biochemical and biophysical research communications vol. 409,1 (2011): 142-7. doi:10.1016/j.bbrc.2011.04.131

MADIGAN, Michael T.; BENDER, Kelly S.; BUCKLEY, Daniel H.; STAHL, David A. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.

MANCABELLI, Leonardo et al. **“Comparative genome analyses of *Lactobacillus crispatus* isolated from different ecological niches reveal an environmental adaptation of this species to the human vaginal environment.”** Applied and environmental microbiology, vol. 87,8 e02899-20. 12 Feb. 2021, doi:10.1128/AEM.02899-20.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012 **Atlas de citopatologia ginecológica**. Brasília 2012 Atlas de citopatologia ginecológica/ Daisy Nunes de Oliveira Lima – Brasília: Ministério da Saúde; CEPESC: Rio de Janeiro, 2012. 204p.

MITRA A, MacIntyre DA, Ntritsos G, Smith A, Tsilidis KK, Marchesi JR, Bennett PR, Moscicki AB, Kyrgiou M. **The vaginal microbiota associates with the regression of untreated cervical intraepithelial neoplasia 2 lesions.** Nat Commun. 2020 Apr 24;11(1):1999. doi: 10.1038/s41467-020-15856-y. PMID: 32332850; PMCID: PMC7181700.

NAMI, Yousef et al. **Probiotic potential and biotherapeutic effects of newly isolated vaginal *Lactobacillus acidophilus* 36YL strain on cancer cells.** Anaerobe, v. 28, p. 29-36, 2014.

NAVARRO S, Abila H, Delgado B, Colmer-Hamood JA, Ventolini G, Hamood AN. **Glycogen availability and pH variation in a medium simulating vaginal fluid influence the growth of vaginal *Lactobacillus* species and *Gardnerella vaginalis*.** BMC Microbiol. 2023 Jul 13;23(1):186. doi: 10.1186/s12866-023-02916-8. PMID: 37442975; PMCID: PMC10339506.

NAYAR, Ritu.; WILBUR, C. David. **Sistema Bethesda Para Relato de Citologia Cervical**. 1: Livromed Paulista, 2018.

NELSON, David L.; COX, Michael M.. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 7 Porto Alegre: Artmed, 2019, 1278 p.

OH HY, Kim BS, Seo SS, Kong JS, Lee JK, Park SY, Hong KM, Kim HK, Kim MK. **The association of uterine cervical microbiota with an increased risk for cervical intraepithelial neoplasia in Korea.** Clin Microbiol Infect. 2015 Jul;21(7):674.e1-9. doi: 10.1016/j.cmi.2015.02.026. Epub 2015 Mar 6. PMID: 25752224.

OWEN, Derek H.; KATZ, David F. A vaginal fluid simulant. **Contraception**, v. 59, n. 2, p. 91-95, 1999.

PAN, Meichen et al. Comparative analysis of *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus crispatus* isolated from human urogenital and gastrointestinal tracts. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 3146, 2020.

RAVEL, Jacques et al. **“Vaginal microbiome of reproductive-age women.”** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America vol. 108 Suppl 1, Suppl 1 (2011): 4680-7. doi:10.1073/pnas.1002611107.

RECALCATI, S. Locati, M. Marini, A. Santambrogio, P. Zaninotto, F. De Pizzol, M. Zammataro, L. Girelli, D. Cairo, G. **Differential regulation of iron homeostasis during human macrophage polarized activation.** European Journal of Immunology 40(3):824-35. 2010.

SANTELLA B, Schettino MT, Franci G, De Franciscis P, Colacurci N, Schiattarella A, Galdiero M. **Microbiota and HPV: The role of viral infection on vaginal microbiota.** J Med Virol. 2022 Sep;94(9):4478-4484. doi: 10.1002/jmv.27837. Epub 2022 May 16. PMID: 35527233; PMCID: PMC9544303.

SHINICHI TAKAHASHI, Takato Abe ,Jun Gotoh,Yasuo Fukuuchi **Substrate-dependence of reduction of MTT:a tetrazolium dye differs in cultured astroglia and neurons.** Neurochemistry International 40 (2002) 441–448.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. Microbiologia. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

VAGIOS, Stylianos; MITCHELL, Caroline M. Mutual preservation: a review of interactions between cervicovaginal mucus and microbiota. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 676114, 2021.

VAN DER VEER, Charlotte et al. **“Comparative genomics of human Lactobacillus crispatus isolates reveals genes for glycosylation and glycogen degradation: implications for in vivo dominance of the vaginal microbiota.”** Microbiome vol. 7,1 49. 29 Mar. 2019, doi:10.1186/s40168-019-0667-9.

WANG, KD., Xu, DJ., Wang, BY. et al. **Inhibitory Effect of Vaginal Lactobacillus Supernatants on Cervical Cancer Cells. Probiotics & Antimicro.** Prot. 10, 236–242 (2018).

WITKIN, Steven S et al. **“Influence of vaginal bacteria and D- and L-lactic acid isomers on vaginal extracellular matrix metalloproteinase inducer: implications for protection against upper genital tract infections.”** mBio vol. 4,4 e00460-13. 6 Aug. 2013, doi:10.1128/mBio.00460-13.

XU, Huishu et al. Vaginal colonization of Lactobacilli: mechanism and function. **Microbial Pathogenesis**, p. 107141, 2024.

YANG, Xi et al. **“Role of Lactobacillus in cervical cancer.”** Cancer management and research vol. 10 1219-1229. 16 May. 2018, doi:10.2147/CMAR.S165228.

ZHANG, Jie et al. "**Characterization of a novel type of glycogen-degrading amylopullulanase from *Lactobacillus crispatus***." Applied microbiology and biotechnology vol. 106,11 (2022): 4053-4064. doi:10.1007/s00253-022-11975-2.