



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Detecção de biofilme e citocinas no conteúdo vaginal de gestantes  
com vulvovaginites

**LUCAS DOS SANTOS**

**BRUNA RIBEIRO DE ANDRADE RAMOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção de Bacharel em Ciências Biomédicas.

**BOTUCATU – SP  
2025**

S237d

Santos, Lucas dos

Detecção de biofilme e citocinas no conteúdo vaginal de gestantes com vulvovaginites / Lucas dos Santos. -- Botucatu, 2025

22 p. : il.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biomédicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu

Orientadora: Bruna Ribeiro de Andrade Ramos

Coorientadora: Marcia Guimarães da Silva

1. Gravidez. 2. Trabalho de parto prematuro. 3. Vaginose bacteriana. 4. Candidíase. 5. Biofilmes. I. Título.

LUCAS DOS SANTOS

## **Detecção de biofilme e citocinas no conteúdo vaginal de gestantes com vulvovaginites**

Trabalho de Conclusão de Curso, apresentado a Universidade Estadual Paulista, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel, do curso de Graduação em Ciências Biomédicas.

Botucatu, 08 de Dezembro de 2025.

### **BANCA EXAMINADORA**



Documento assinado digitalmente  
**BRUNA RIBEIRO DE ANDRADE RAMOS**  
Data: 18/12/2025 14:24:56-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Profa. Dra. Bruna Ribeiro de Andrade Ramos**  
Departamento de Tocoginecologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP  
Docente na Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)



Documento assinado digitalmente  
**MARIANA DE CASTRO SILVA**  
Data: 18/12/2025 13:38:47-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

---

**Dra. Mariana de Castro Silva**  
Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP

## SUMÁRIO

<b>1. AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>1</b>
<b>2. RESUMO.....</b>	<b>2</b>
<b>3. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>3-6</b>
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>7-10</b>
<b>4.1 Pacientes e métodos</b>	
<b>4.2 Diagnóstico de vaginose bacteriana e candidíase vulvovaginal</b>	
<b>4.3 Coleta do conteúdo vaginal e mensuração das citocinas</b>	
<b>4.4 Quantificação de biofilme</b>	
<b>4.5 Análise estatística</b>	
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>11-12</b>
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>13-14</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>16-20</b>

## AGRADECIMENTOS

Uso esta dedicatória para expressar àqueles que lêem minha maior conquista neste ciclo, que ultrapassa um mero título de “Bacharel”, afinal, minhas vitórias nesse tempo são todas representadas por aqueles que posso ter o prazer de expressar gratidão neste texto. Vocês são parte do que sou hoje, serei amanhã e talvez, em outras vidas.

Agradeço, em primeiro lugar, a minha família, em especial minha mãe Conceição e minha irmã Natália, pelos sacrifícios realizados para que eu pudesse me manter financeiramente nessa instituição, mantendo esse sonho vivo da forma mais altruísta possível.

Agradeço imensamente a República Bagaçu de Kana, minha segunda família, e também meu lar, afinal, é neste lugar onde entendi o sentimento de pertencimento. Aos moradores que tive o prazer de conviver, minha gratidão será eterna, vocês me mostraram que a irmandade nada tem a ver com laços de sangue.

Agradeço à minha orientadora Bruna, por todo seu cuidado e gentileza durante esse período, me guiando com sabedoria e calma. Espero que nossa parceria encontre frutos ao longo desses anos futuros.

Agradeço também as maiores responsáveis pela minha tutoria dentro do laboratório, Mariana e Jeniffer, por toda a paciência e empatia que depositaram em mim, todo conhecimento e técnica ensinadas valem mais do que ouro, cada aprendizado me lapidou para que, o ambiente de laboratório se torne mais simples.

Expresso gratidão para meus colegas de laboratório, que tornaram o ambiente acolhedor, simples, leve, feliz. Aos que foram, Guilherme, Luiza e Marina, e aos que irão, Ana Carolina e Laura, vocês seguem comigo como parte da leveza que busco carregar. Aos que ficam, Maria Eduarda e Rafael, me mostrem mais dessa paz e alegria, para que possamos seguir.

Agradeço imensamente minha coorientadora Márcia Guimarães da Silva pela oportunidade e apoio concedidos neste laboratório e também à FAPESP pelo apoio financeiro sob o processo 2025/03732-0.

Por fim, deixo para agradecer os maiores responsáveis pela saudade que sentirei deste efêmero ciclo. Meus amigos Cintia, Sarah, Reggina, Lucas Kenji e Rafael Marques, infeliz é este limitado amontoado de palavras que uso para agradecê-los, pois, como uma barreira, são completamente incapazes de expressar tamanho sentimento. Neste tempo, que rápido passou, entre idas e vindas, tropeços e agitos, falhas e acertos, vocês me marcaram de tal forma que se enraizaram no mais profundo âmago de minha alma. Por isso, para onde esta pobre alma for, vocês estarão comigo, sempre e para sempre. Essa eternidade com vocês passará rápido como um raio, mas, claro, forte como um carvalho, certamente!

## RESUMO

O parto pré-termo (PPT), definido como aquele que ocorre anteriormente à 37ª semana de gestação, representa uma das principais causas de mortalidade neonatal e está associado a diversas complicações de curto e longo prazo, como lesões neurológicas e pulmonares. O Brasil figura entre os 10 países com as maiores taxas de PPT. Dentre os fatores que contribuem para o PPT estão o encurtamento cervical, infecções intra-amnióticas e vulvovaginites. A microbiota vaginal saudável, geralmente, é dominada por *Lactobacillus* spp., e exerce papel protetor pela produção de bacteriocinas e ácido láctico, responsável pela manutenção do pH ácido vaginal. Dentre as vulvovaginites mais frequentes, a vaginose bacteriana VB resulta da redução ou depleção de lactobacilos e aumento de bactérias anaeróbias, como *Gardnerella vaginalis*, elevando o risco de infecção ascendente e inflamação intrauterina. A candidíase vulvovaginal (CVV) envolve a proliferação excessiva de *Candida* spp., principalmente *Candida albicans*, e é associada a inflamação e maior risco de PPT, especialmente quando recorrente. OBJETIVO: O estudo visou correlacionar a presença de biofilme e a produção de citocinas (IL-10 e CXCL-8) com vulvovaginites em gestantes de primeiro e segundo trimestres. MÉTODOS: Foi conduzido um estudo de coorte retrospectivo com amostras de conteúdo vaginal de gestantes do município de Jaú - SP, distribuídas em cinco grupos conforme o diagnóstico de VB, CVV ou eubiose. A análise envolveu quantificação de biofilme por cristal violeta e dosagem de citocinas por ELISA, além de aplicação de testes estatísticos apropriados para verificação. RESULTADOS: A quantificação por ELISA não demonstrou diferença estatística relevante entre os grupos e momentos para a CXCL-8, entretanto, a quantificação de IL-10 se apresentou em níveis reduzidos no segundo momento do grupo que manteve o diagnóstico de VB. A quantificação de biofilme por cristal violeta não atingiu uma padronização adequada para resultados que reflitam a realidade.

**Palavras-chave:** Gravidez; Trabalho de parto prematuro; Vaginose bacteriana; Candidíase; Biofilmes.

## INTRODUÇÃO

O parto a termo é um evento complexo, resultado da interação coordenada entre diferentes mecanismos que em conjunto configuram o trabalho de parto. Dentre esses mecanismos, destaca-se a contratilidade uterina, na qual o miométrio transita de um estado quiescente, induzido pela ação da progesterona, para um estado contrátil, mediado por fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e proteínas associadas a contratilidade. Outro processo fundamental é a dilatação cervical, que envolve o remodelamento do colo uterino. Nesse contexto, a matriz extracelular passa por alterações, incluindo a perda de ligações cruzadas de colágeno e um aumento de glicosaminoglicanos, reduzindo a resistência ao estiramento cervical. Por fim, o terceiro evento biológico associado ao nascimento é o enfraquecimento e rotura das membranas corioamnióticas. A rotura das membranas fetais é induzida por processos como a dissolução de componentes de junção celular, como as fibronectinas, e ativação de mecanismos de morte celular, como a apoptose (1). Os sinais envolvidos no trabalho de parto são orquestrados por células inflamatórias e pelas membranas fetais, tecidos que oferecem ao feto suporte mecânico, proteção imunológica e compartimentalização para seu crescimento e desenvolvimento. Esses eventos são regulados pela expressão de citocinas, quimiocinas e proteases, entre outros mediadores (1).

O parto pré-termo (PPT), definido como aquele que ocorre anteriormente à 37ª semana de gestação (2), é a principal causa de mortalidade neonatal e segunda causa mais comum de mortes entre crianças menores de 5 anos (3). Em 2019, das 5,3 milhões de mortes registradas entre crianças menores de 5 anos, a principal causa foi a prematuridade e suas complicações decorrentes, representando 17,7% do total de mortes nessa faixa etária (4). Ademais, recém-nascidos pré-termo têm maior probabilidade de apresentar complicações a curto e a longo prazo como dano cerebral, displasia pulmonar e enterocolite necrosante, entre outras morbidades. Esses danos podem acarretar sequelas irreversíveis, diminuindo a qualidade de vida do neonato (1, 2). Estima-se que, anualmente, ocorram entre 12 a 15 milhões de nascimentos pré-termo no mundo (5). De acordo com a OMS, o Brasil está entre os 10 países com os maiores números de PPT (6). No ano de 2023 ocorreram 302.050 nascimentos pré-termo em território nacional, resultando em uma taxa de prematuridade de 12% (7). O PPT pode ser classificado em espontâneo ou induzido. Nos casos em que a indução é necessária, ela se dá por indicação médica, em situações em que o ambiente intrauterino está comprometido, frequentemente devido à insuficiência placentária e ao prejuízo no fluxo sanguíneo, independentemente da associação com restrição de crescimento fetal (8). Por outro lado, nos casos de PPT espontâneo, que representam 70% dos casos de PPT (9), os principais

fatores de risco incluem o encurtamento cervical, hemorragias uterinas no segundo e terceiro trimestres, infecção intra-amniótica e desequilíbrios da microbiota vaginal. Esses fatores podem ocorrer com ou sem a integridade das membranas preservadas, como nos casos de trabalho de parto pré-termo (TPP) ou rotura prematura de membranas pré-termo (RPM-PT), respectivamente (10).

A microbiota vaginal fisiológica é composta por um conjunto diversificado de microrganismos, incluindo espécies benéficas e patógenos oportunistas, que interagem em um microambiente complexo (11). Essas comunidades microbianas vaginais, apesar de suas individualidades, apresentam características comuns. Mulheres cisgênero em idade reprodutiva frequentemente apresentam uma microbiota vaginal dominada por espécies de *Lactobacillus*, configuração associada a uma microbiota vaginal saudável (12).

Em 2011, Ravel et al. (13) clusterizaram o microbioma vaginal de mulheres em idade reprodutiva em cinco diferentes comunidades (Community State Types – CSTs), que se diferenciam de acordo com as espécies de maior abundância. As CSTs I, II, III e V são dominadas por *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* e *L. jensenii*, respectivamente, enquanto a comunidade IV é marcada por uma alta diversidade microbiana, com predominância de bactérias anaeróbias estritas, que compõe o core patológico da vaginose bacteriana.

As espécies lactobacilares mantêm uma relação de mutualismo com o epitélio vaginal, fornecendo proteção contra patógenos residentes e invasores. Esse efeito protetor é mediado pela produção de componentes antimicrobianos, como bacteriocinas e peróxido de hidrogênio, cuja atividade antimicrobiana aumenta a eficiência na inibição de outras espécies bacterianas (14). A composição da microbiota vaginal é influenciada pela ação do estrogênio, que induz a maturação do epitélio vaginal, aumentando a biodisponibilidade de glicogênio, que serve como substrato energético para *Lactobacillus* spp.. Durante esse processo de fermentação do glicogênio, os lactobacilos produzem ácido lático, principal responsável por acidificar o pH vaginal, criando um ambiente hostil para patógenos. Essa acidificação funciona como um mecanismo de defesa fisiológico ao inibir o crescimento de bactérias patogênicas, desestabilizando a membrana externa de bactérias gram-negativas (15).

Em contraste com o estado de eubiose da microbiota vaginal, formada predominantemente por espécies do gênero *Lactobacillus* spp., as disbioses já estão estabelecidas como fatores de risco para complicações no âmbito sexual e reprodutivo (16). A vaginose bacteriana (VB), principal vulvovaginite que acomete mulheres em idade reprodutiva, é caracterizada pela perda ou redução significativa de *Lactobacillus* spp. e pela substituição por um core patológico de bactérias anaeróbias, tendo como uma das bactérias

mais comumente associadas a *Gardnerella vaginalis* (17). O diagnóstico da VB é realizado por meio de análise de morfotipos em esfregaço vaginal, baseando-se no escore proposto por Nugent et al. em 1991 (20). Esse escore classifica a microbiota em três categorias: microbiota normal (0-3), microbiota intermediária (4-6) e vaginose bacteriana (7-10).

A VB é uma condição recorrente em mulheres em idade reprodutiva e está associada a complicações obstétricas devido ao risco aumentado de bactérias patológicas ascenderem ao útero (21). A infecção intra-amniótica ocorre quando a cavidade amniótica é invadida por microrganismos patogênicos, desencadeando uma resposta inflamatória local. Essa resposta resulta em concentrações elevadas de citocinas inflamatórias associadas ao TPP e à RPM-PT. Estima-se que aproximadamente 25% dos PPT espontâneos estejam relacionados a infecções intra-amnióticas (22). Mulheres com o diagnóstico de VB no início da gestação apresentam risco elevado de desenvolverem PPT ou darem a luz a um neonato com baixo peso ref. A presença em conjunto de *Fannyhessea vaginae* e *Gardnerella vaginalis*, assim como a redução de *Lactobacillus crispatus*, é fortemente associada com o desfecho gestacional adverso (23).

A microbiota vaginal da maioria das mulheres saudáveis em idade reprodutiva também pode ser colonizada por espécies de *Candida* spp., principalmente *Candida albicans*, de maneira simbiote com as bactérias. Entretanto, em determinadas condições, estas espécies podem proliferar na mucosa vulvovaginal, resultando em Candidíase vulvovaginal (CVV), ocasionando uma resposta inflamatória exacerbada e podendo gerar os sintomas característicos de prurido e corrimento grumoso (24). A infecção por espécies de *Candida* spp., apesar de se apresentar pelo menos uma vez durante a vida reprodutiva em até 75% das mulheres, ocorre com maior frequência durante a gestação, devido a alterações hormonais e imunológicas, à maior umidade local e variações na microbiota que alteram o pH vaginal decorrentes do período gestacional (25). A CVV é associada também com ascensão do trato genital feminino e consequente infecção intrauterina, o que acarreta um processo inflamatório crônico na região, descrito como um fator de risco para PPT, principalmente ao ocorrer no primeiro trimestre de gestação, período crítico do desenvolvimento fetal (26).

Em conjunto, a ocorrência dessas vulvovaginites representa um problema de saúde emergente, devido às altas prevalências e grandes chances de recorrência dos quadros. A CVV recorrente se manifesta em até 5% das mulheres ao redor do mundo, e é comumente definida pela manifestação de 4 ou mais episódios de CVV no período de um ano (27). A VB recorrente, referida como a ocorrência de 3 ou mais episódios de VB num período de 12 meses, configura um grande desafio ao bem-estar de mulheres em menacme, visto que mais

de 50% das mulheres diagnosticadas com VB e posteriormente tratadas apresentam recaídas dentro de 6 meses, e até 76% das mulheres com VB recorrente não respondem ao tratamento preconizado de metronidazol oral (28). A falha no tratamento pode estar relacionada com a presença de biofilme no epitélio vaginal, composto por uma matriz extracelular viscosa, produzida por espécies de *G. vaginalis*, *Atopobium vaginae* e outras espécies bacterianas, nos casos de VB, ou por espécies fúngicas, nos casos de CVV (33). O biofilme representa um fator decisivo para a recorrência ou persistência de vulvovaginites, uma vez que se mantém apenas metabolicamente inativo após o tratamento, de modo a ocasionar uma infecção residual e menor suscetibilidade a agentes antimicrobianos durante o tratamento (19, 29-30).

Considerando a alta prevalência e a relevância da vaginose bacteriana e da candidíase vulvovaginal no contexto gestacional, bem como a escassez de estudos nessa área, estudar a correlação entre a presença de componentes de biofilme e a produção local de citocinas anti-inflamatórias e de quimiocinas é fundamental para a compreensão dos mecanismos envolvidos nos casos de vulvovaginites em gestantes e pode fornecer informações valiosas sobre potenciais marcadores para predição de parto pré-termo associado às vulvovaginites.

## METODOLOGIA

### *Pacientes e métodos*

Foi conduzido estudo retrospectivo de coorte com amostras de conteúdo vaginal de gestantes de primeiro e segundo trimestres provenientes das unidades da rede básica de saúde do município de Jaú - SP, incluídas no projeto de pesquisa de implementação “Estratégia para identificação de gestantes de alto risco para parto pré-termo e implementação de medidas para redução de riscos no município de Jaú - SP.” (CAAE 63623922.7.0000.5515), em andamento.

Em suma, as gestantes participantes do projeto de implementação são submetidas a consultas adicionais ao pré-natal, com o objetivo de identificar precocemente fatores de risco para prematuridade e implementar medidas preventivas. Na primeira consulta, conduzida entre 11 semanas e 13 semanas e 6 dias de gestação, as gestantes passam por entrevista detalhada para identificação de fatores de risco associados à prematuridade (tais como histórico prévio de PPT e hábito tabagista) e coleta de material vaginal para análise. Na segunda consulta, conduzida entre 20 semanas e 23 semanas e 6 dias de gestação, é realizada nova coleta de conteúdo vaginal e realização de ultrassonografia transvaginal para avaliação do comprimento do colo uterino. Qualquer anormalidade detectada (como disbiose vaginal ou encurtamento do colo uterino) é tratada conforme os protocolos estabelecidos pelo Ministério da Saúde/CDC, com o intuito de minimizar o risco de complicações gestacionais e promover melhores desfechos materno-fetais. Adicionalmente, todas as gestantes incluídas foram orientadas quanto a hábitos de higiene íntima que auxiliam na prevenção de vulvovaginites. As gestantes atendidas pelas unidades da rede básica de saúde do município de Jaú representam um grupo heterogêneo, refletindo a diversidade socioeconômica e epidemiológica da região.

Foram incluídas no presente estudo amostras de conteúdo vaginal coletadas no primeiro e segundo trimestres gestacionais (até 13 semanas e 6 dias e entre 20 e 23 semanas e 6 dias, respectivamente). Gestantes com IST diagnosticadas em exames sorológicos de rotina (soropositivas para HIV ou sífilis), gestação gemelar, aborto ou encurtamento de colo uterino foram excluídas do estudo.

Considerando-se a taxa de prevalência total de disbioses de 60% (Gondo; Duarte; Da Silva et al., 2010), com confiabilidade de 95%, margem de erro de 10%, população finita de 1400 gestantes, o tamanho amostral mínimo calculado foi de 87 pacientes, que foram distribuídas entre 5 grupos, de acordo com o diagnóstico de VB e CVV recebido:

- G1 (n esperado=18) - pacientes com eubiose mantida no 1º e 2º trimestres gestacionais.
- G2 (n esperado=18) - pacientes com VB no 1º trimestre e eubiose no 2º trimestre;
- G3 (n esperado=18) - pacientes diagnosticadas com VB no 1º e 2º trimestres gestacionais;
- G4 (n esperado=18) - pacientes com CVV no 1º trimestre e eubiose no 2º trimestre;
- G5 (n esperado=18) - pacientes diagnosticadas com CVV no 1º e 2º trimestres gestacionais;

Para cada grupo foram analisadas duas amostras de cada paciente, uma amostra do 1º e outra do 2º trimestre gestacional. Mulheres que apresentassem a concomitância das disbioses estudadas não foram incluídas na composição dos grupos amostrais. Por se tratarem de amostras provenientes de um estudo de implementação, não foi possível distinguir entre vulvovaginites recorrentes e persistentes, uma vez que o delineamento do estudo de implementação não contemplava controle de cura precoce das pacientes por questões logísticas. No entanto, essa limitação não compromete a relevância do estudo, visto que as condições avaliadas são altamente prevalentes e representam um desafio clínico significativo, refletindo a realidade da população estudada.

#### *Diagnóstico de vaginose bacteriana e candidíase vulvovaginal*

A avaliação da microbiota vaginal foi realizada durante o desenvolvimento do projeto “Estratégia para identificação de gestantes de alto risco para parto pré-termo e implementação de medidas para redução de riscos no município de Jauá - SP.”, a partir da coleta de conteúdo do terço médio da parede vaginal, com swab, para confecção de lâminas coradas pelo método de Gram para análise em microscopia ótica.

Os esfregaços de conteúdo vaginal foram corados pelo método de Gram e avaliados microscopicamente de acordo com os critérios de Nugent (Nugent; Krohn; Hillier, 1991), Cibley & Cibley (Cibley; Cibley, 1991) e Donders (Donders; Vereecken; Spitz et al., 2002). O diagnóstico da VB foi realizado por meio de análise de morfotipos em esfregaço vaginal,

baseando-se no escore proposto por Nugent et al. em 1991 (16), sob análise de campos microscópicos de grande aumento (1000 vezes). Esse escore classifica a microbiota em três categorias: microbiota normal (0-3), microbiota intermediária (4-6) e vaginose bacteriana (7-10). Participantes diagnosticadas com VB foram tratadas com metronidazol 500 mg via oral de 12/12 horas por 7 dias (42).

O diagnóstico de candidíase vulvovaginal foi realizado pela visualização de blastoconídeos e/ou pseudo-hifas na presença de resposta inflamatória no exame microscópico dos esfregaços. Gestantes diagnosticadas com CVV foram tratadas com aplicação tópica de nistatina creme vaginal por 7 noites (43).

Para garantir a reprodutibilidade das leituras microscópicas, todas as amostras selecionadas para o estudo foram avaliadas por dois microscopistas independentes, seguindo os critérios aqui descritos. Casos de incongruência entre os microscopistas foram reavaliados e excluídos, caso necessário.

#### *Coleta do conteúdo vaginal e mensuração das citocinas*

A coleta de conteúdo vaginal foi realizada no momento do exame ginecológico com o auxílio de pipeta Pasteur estéril, adicionando-se 3 ml de soro fisiológico estéril na parede vaginal, o qual foi homogeneizado, recuperado e acondicionado em tubos tipo eppendorf e armazenado a -20° C. As amostras de conteúdo vaginal foram utilizadas para avaliação da citocina antiinflamatória IL-10 e da quimiocina CXCL-8 por ensaio imunoenzimático (ELISA) em duplicatas, com os limites mínimos e máximos detectáveis para IL-10 e CXCL-8 sendo, respectivamente, 0,337 pg/mL a 2000 pg/mL e 0,034 pg/mL a 2099,215 pg/mL, utilizando-se o kit comercial DuoSet (R&D), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

#### *Quantificação de biofilme*

A quantificação de biofilme foi realizada por meio de coloração com cristal violeta. As amostras de conteúdo vaginal foram plaqueadas em placas de 96 poços e submetidas a uma solução de cristal violeta a 0,1% em água deionizada. Após 20 minutos de incubação em temperatura ambiente, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS com o intuito de remover o corante não ligado. O cristal violeta foi extraído dos biofilmes com etanol a 96% e a absorção da solução violeta resultante foi medida utilizando um fotômetro a 600 nm. Amostras

laboratoriais com biofilme previamente caracterizado foram utilizadas como controle positivo para a quantificação. (44)

#### *Análise estatística*

Foram realizados testes estatísticos para comparar dados biológicos, clínicos e sociodemográficos dos grupos estudados. Foi realizada avaliação descritiva dos dados e foi verificada a dispersão dos dados. Dados quantitativos, de distribuição normal, foram expressos pela média seguida de desvio padrão e foram comparados por teste t pareado (comparações por momento M1 x M2) ou por ANOVA de medidas repetidas (comparações por grupos G1 x G2 x G3), aplicado para CXCL-8. Dados quantitativos de distribuição não paramétrica foram representados pela mediana seguida da amplitude interquartílica e foram comparados pelo teste de Wilcoxon para análises pareadas ou por Kruskal-Wallis para comparações entre grupos, conforme aplicado para IL-10.

Foi utilizado o software Prism 5.0 e adotado um nível de significância de 5% para os testes empregados, garantindo o rigor estatístico na interpretação dos resultados.

## RESULTADOS

Foram incluídas 96 amostras de 48 gestantes: 18 pacientes em G1, 17 em G2 e 13 em G3, até o momento. A idade média das gestantes incluídas foi de  $28,4 \pm 7,1$  anos e 67,3% relataram estar casadas/união estável.

Foram analisadas as concentrações de CXCL-8 e IL-10 nas amostras cervicovaginais das gestantes avaliadas no primeiro (M1) e segundo (M2) trimestres de gestação incluídas nos grupos 1 a 3. Os grupos 4 e 5 relacionados com a candidíase não atingiram um tamanho amostral satisfatório para resultados fidedignos ( $n=3$  e  $n=2$ ).

Para CXCL-8, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os níveis mensurados de CXCL-8 no lavado cervicovaginal, independentemente do status microbiano (Flora I, VB seguida de eubiose ou VB mantida) ou do momento avaliado (primeiro ou segundo trimestre) (Média dos grupos: G1/M1=1352,  $p=0.2683$ ; G1/M2=1010,  $p=0.4239$ ; G2/M1=1052,  $p=0.5178$ ; G2/M2=718.8,  $p=0.0201$ ; G3/M1=1695,  $p=0.9697$ , G3/M2=1285,  $p=0.3385$ ) (Figura 1).

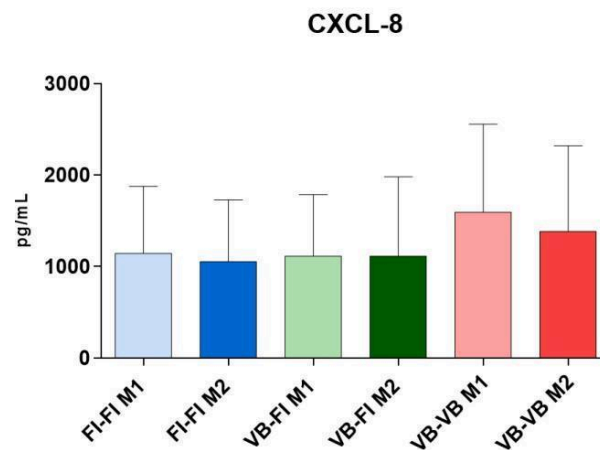


Figura 1: FI = Flora I, microbiota dominada por *Lactobacillus spp*

Já para IL-10, observou-se redução significativa nos níveis da citocina no grupo que manteve o diagnóstico de VB no segundo trimestre gestacional (Mediana dos grupos: G1/M1=149.1,  $p=0.0014$ ; G1/M2=110.7,  $p=0.3226$ ; G2/M1=157.3,  $p=0.4503$ ; G2/M2=148.7,  $p=0.0751$ ; G3/M1=145.4,  $p=0.0042$ , G3/M2=62.04,  $p=0.1449$ ). Nos demais grupos, não houve diferenças estatisticamente significativas (Figura 2).

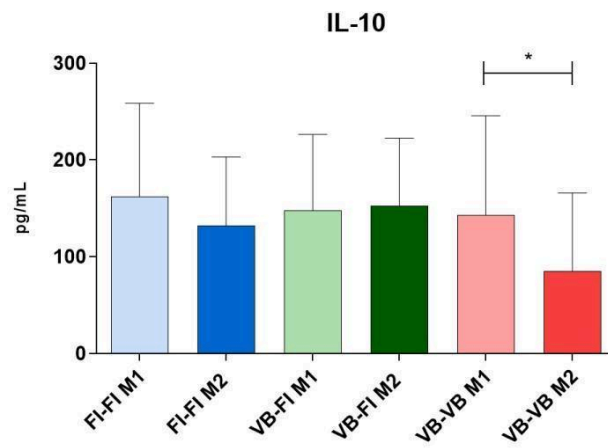


Figura 2: FI= Flora I, microbiota dominada por *Lactobacillus* spp

A detecção de biofilme não atingiu uma padronização satisfatória, impedindo a formação de resultados que refletissem a realidade, impossibilitando a correlação com os outros resultados obtidos.

## DISCUSSÃO

Os níveis constantes da quimiocina CXCL-8 detectados nas amostras de lavado cérvico-vaginal são condizentes com a ausência de recrutamento leucocitário característicos da vaginose bacteriana, uma vez que as espécies anaeróbicas presentes neste contexto expressam fatores de virulência que levam à evasão da resposta imune inata local (ref). De fato, a *G. vaginalis* apresenta diversos fatores de virulência que favorecem sua permanência no ambiente vaginal, incluindo mecanismos de sequestro de ferro, eliminando a competição com outras bactérias dependentes do mineral (18). Ademais, atua em sinergismo com a espécie *Prevotella bivia*, promovendo a formação de biofilme, a partir da produção de sialidase, enzima que degrada o muco cervical de modo a facilitar a adesão bacteriana (18).

Em contrapartida, detectamos redução nos níveis de IL-10 no lavado cérvico-vaginal de segundo trimestre de gestantes com diagnóstico mantido de vaginose bacteriana, em comparação ao primeiro trimestre. A IL-10 é uma potente citocina anti-inflamatória liberada por diversos tipos de células imunes e dos tecidos gestacionais (32). Estes resultados podem refletir uma exaustão da resposta imune local resultante da persistência ou recorrência da VB, reforçando a relevância desta vulvovaginite – e de sua manutenção – como fator de risco para desfechos gestacionais adversos.

A associação entre vulvovaginites e desfechos gestacionais adversos é majoritariamente embasada na desregulação de fatores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. A microbiota vaginal, quando dominada por espécies de *Lactobacillus* spp., induz um estado de quiescência imunológica, em que citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1 $\beta$ , e quimiocinas, como a CXCL8, tendem a se apresentar em quantidades inferiores na vagina quando comparadas com mulheres diagnosticadas com VB (11). Adicionalmente, metabólitos produzidos por espécies lactobacilares podem modular a resposta das células epiteliais de modo a estimular a produção de citocinas anti-inflamatórias, contribuindo para a homeostase imune do microambiente vaginal (31).

Todavia, os resultados aqui apresentados devem ser interpretados com cautela. Uma limitação do estudo, é sua característica preliminar, uma vez que ainda se faz necessário completar todos os grupos amostrais, em especial os grupos compostos por gestantes com candidíase. A dificuldade de completar os grupos com candidíase é explicada pela frequência de outras disbioses associadas ao quadro (VB ou flora intermediária). Adicionalmente, como etapas futura deste estudo, almejamos realizar uma análise mais abrangente do perfil inflamatório, que permitirá a melhor compreensão do paradigma anti-inflamatório vs. inflamatório local.

No presente estudo não foi possível realizar a avaliação de biofilme. A detecção de biofilme por cristal violeta geralmente é realizada em amostras de cultura bacteriana. A utilização de amostras biológicas cervicovaginais previamente coletadas com soro fisiológico e armazenadas em freezer à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  possivelmente dificultou a detecção do biofilme. O uso desta estratégia de coleta e armazenamento, ainda que ideal para a análise de citocinas, se mostrou ineficaz para a conservação de produtos bacterianos como o biofilme, possivelmente levando a degradação desses componentes. Dessa forma, em estudos futuros, outro tipo de coleta para esta finalidade deve ser considerada, com armazenamento em meio de cultura.

## **CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos são condizentes com a literatura, uma vez que a VB é uma entidade conhecida por causar pouca infiltração neutrofílica, assim sendo, era esperado que a citocina CXCL-8, responsável pela quimiotaxia de neutrófilos, fosse encontrada em níveis regulares. O fato do grupo que manteve o diagnóstico de VB em ambos os momentos, seja ele por persistência ou reinfecção, ter tido níveis reduzidos da citocina anti-inflamatória IL-10, indica uma possível exaustão da resposta imune local, como consequência da manutenção da disbiose no microambiente vaginal

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ROMERO, R.; DEY, S. K.; FISHER, S. J. Preterm labor: One syndrome, many causes. *Science*, v. 345, n. 6198, p. 760–765, 14 ago. 2014.
2. ZIERDEN, H. C. et al. Next generation strategies for preventing preterm birth. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 174, p. 190–209, 1 jul. 2021.
3. WALANI, S. R. Global burden of preterm birth. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, v. 150, n. 1, p. 31–33, 10 jun. 2020.
4. PERIN, J. et al. Global, regional, and national causes of under-5 mortality in 2000–19: an updated systematic analysis with implications for the Sustainable Development Goals. *The Lancet Child & Adolescent Health*, v. 6, n. 2, 17 nov. 2021.
5. ALIM SWARRAY-DEEN et al. Preterm birth in low-middle income countries. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, v. 95, p. 102518–102518, 1 jul. 2024.
6. ALTHABE, F. et al. Born too soon : the global action report on preterm birth. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2012.
7. TabNet Win32 3.0: Nascidos vivos - Brasil. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinasc/cnv/nvuf.def>>.
8. YLIJOKI, M. et al. The aetiology of preterm birth and risks of cerebral palsy and cognitive impairment: A systematic review and meta-analysis. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, v. 113, n. 4, p. 643–653, abr. 2024.
9. COUTINHO, C. M. et al. ISUOGPractice Guidelines: role of ultrasound in the prediction of spontaneous preterm birth. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, v. 60, n. 3, p. 435–456, 29 jul. 2022.

10. COBO, T.; KACEROVSKY, M.; JACOBSSON, B. Risk factors for spontaneous preterm delivery. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, v. 150, n. 1, p. 17–23, 10 jun. 2020.
11. CHEE, W. J. Y.; CHEW, S. Y.; THAN, L. T. L. Vaginal microbiota and the potential of *Lactobacillus* derivatives in maintaining vaginal health. *Microbial Cell Factories*, v. 19, n. 203, 2020.
12. FRANCE, M. et al. Towards a deeper understanding of the vaginal microbiota. *Nature Microbiology*, v. 7, n. 3, p. 367–378, mar. 2022.
13. RAVEL, J. et al. Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. Supplement\_1, p. 4680–4687, 3 jun. 2010.
14. SARAF, V. S. et al. Vaginal microbiome: normalcy vs dysbiosis. *Archives of Microbiology*, v. 203, n. 7, p. 3793–3802, 13 jun. 2021.
15. PENDHARKAR, S. et al. *Lactobacilli* and Their Probiotic Effects in the Vagina of Reproductive Age Women. *Microorganisms*, v. 11, n. 3, p. 636, 1 mar. 2023.
16. TACHEDJIAN, G. et al. The role of lactic acid production by probiotic *Lactobacillus* species in vaginal health. *Research in Microbiology*, v. 168, n. 9-10, p. 782–792, nov. 2017.
17. RAVEL, J.; MORENO, I.; SIMÓN, C. Bacterial vaginosis and its association with infertility, endometritis, and pelvic inflammatory disease. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v. 224, n. 3, p. 251–257, 1 mar. 2021.
18. AMABEBE, E. et al. Vaginal pharmacomicrobiomics modulates risk of persistent and recurrent bacterial vaginosis. *npj Biofilms and Microbiomes*, v. 11, n. 1, p. 1–12, jul. 2025.

19. MUZNY, C. A.; SCHWEBKE, J. R. Biofilms: An Underappreciated Mechanism of Treatment Failure and Recurrence in Vaginal Infections: Table 1. v. 61, n. 4, p. 601–606, 1 maio 2015.
20. NUGENT, R. P.; KROHN, M. A.; HILLIER, S. L. Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, n. 2, p. 297–301, 1991.
21. JAYARAM, P. M.; MOHAN, M. K.; KONJE, J. Bacterial vaginosis in pregnancy – a storm in the cup of tea. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 253, p. 220–224, out. 2020.
22. GOMEZ-LOPEZ, N. et al. The immunobiology of preterm labor and birth: intraamniotic inflammation or breakdown of maternal–fetal homeostasis. *Reproduction*, v. 164, n. 2, p. R11–R45, 1 ago. 2022.
23. CHEN, X. et al. The Female Vaginal Microbiome in Health and Bacterial Vaginosis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 11, n. 631972, 7 abr. 2021.
24. SUN, Z. et al. Vulvovaginal Candidiasis and Vaginal Microflora Interaction: Microflora Changes and Probiotic Therapy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 13, 3 fev. 2023.
25. DUARTE, G. et al. Vulvovaginitis in pregnant women. *Revista Brasileira Ginecologia e Obstetrícia*, v. 46, 1 jan. 2024.
26. MESSINA, A. et al. Candidiasis in Pregnancy: Relevant Aspects of the Pathology for the Mother and the Fetus and Therapeutic Strategies. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, v. 9, n. 5, p. 114, 1 maio 2024.
27. COOKE, G. et al. Treatment for recurrent vulvovaginal candidiasis (thrush). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 2022, n. 1, 10 jan. 2022.

28. ZENG, X.; AN, R.; LI, H. Risk factors of recurrent bacterial vaginosis among women of reproductive age: A cross-sectional study. *Open Medicine*, v. 18, n. 1, p. 20230743, 8 ago. 2023.
29. MUZNY, C. A.; KARDAS, P. A Narrative Review of Current Challenges in the Diagnosis and Management of Bacterial Vaginosis. *Sexually Transmitted Diseases*, v. Publish Ahead of Print, 26 mar. 2020.
30. FAUGHT, B. M.; REYES, S. Characterization and Treatment of Recurrent Bacterial Vaginosis. *Journal of Women's Health*, v. 28, n. 9, p. 1218–1226, 1 set. 2019.
31. MUZNY, C. A. et al. Host–vaginal microbiota interactions in the pathogenesis of bacterial vaginosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, v. 33, n. 1, p. 59–65, fev. 2020.
32. KAR ON CHENG et al. Inflammatory cytokine signalling in vulvovaginal candidiasis: a hot mess driving immunopathology. *Oxford Open Immunology*, 16 ago. 2024.
33. ROSATI, D. et al. An Exaggerated Monocyte-Derived Cytokine Response to Candida Hyphae in Patients With Recurrent Vulvovaginal Candidiasis. *The Journal of Infectious Diseases*, 23 jul. 2020.
34. HARRISON, M. S.; GOLDENBERG, R. L. Global burden of prematurity. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, v. 21, n. 2, p. 74–79, abr. 2016.
35. BECK, S. et al. The worldwide incidence of preterm birth: a systematic review of maternal mortality and morbidity. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 88, n. 1, p. 31–38, 1 jan. 2010.
36. DONDERS, G. G. G. et al. Definition of a type of abnormal vaginal flora that is distinct from bacterial vaginosis: aerobic vaginitis. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v. 109, n. 1, p. 34–43, jan. 2002.

37. GONDO, D. C. A. F. et al. Abnormal Vaginal Flora in Low-Risk Pregnant Women Cared for by a Public Health Service: prevalence and Association with Symptoms and Findings from Gynecological Exams. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, v. 18, p. 919–927, 1 out. 2010.
38. JAYARAM, P. M.; MOHAN, M. K.; KONJE, J. Bacterial vaginosis in pregnancy – a storm in the cup of tea. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 253, p. 220–224, out. 2020.
39. LINHARES, I. M.; GIRALDO, P. C.; BARACAT, E. C. Novos conhecimentos sobre a flora bacteriana vaginal. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 56, n. 3, p. 370–374, 2010.
40. SOBEL, J. D. Biofilm in Bacterial Vaginosis: A Legitimate Therapeutic Challenge? *The Journal of Infectious Diseases*, 29 abr. 2024.
41. SUN, Z. et al. Vulvovaginal Candidiasis and Vaginal Microflora Interaction: Microflora Changes and Probiotic Therapy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 13, 3 fev. 2023.
42. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Bacterial vaginosis - STI treatment guidelines. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/std/treatmentguidelines/bv.htm>>.
43. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Candidiasis: treatment. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/fungal/diseases/candidiasis/treatment.html>>.
44. GROSSMAN, A.; BURGİN, D.; RICE, K. C. Quantification of *Staphylococcus aureus* Biofilm Formation by Crystal Violet and Confocal Microscopy. p. 69–78, 1 jan. 2021.