

FÁBIO PEREIRA DE CARVALHO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial probiótico de linhagens de *Lactobacillus* provenientes do canal vaginal de mulheres saudáveis, contra *Candida* spp.

UFMG

2007

Fábio Pereira de Carvalho

Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial probiótico de linhagens de *Lactobacillus* provenientes do canal vaginal de mulheres saudáveis, contra *Candida* spp.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Maria Aparecida de Resende
Universidade Federal de Minas Gerais

Co-orientador: Jacques Robert Nicoli
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
2007

043

Carvalho, Fábio Pereira de.

Avaliação in vitro e in vivo do potencial probiótico de linhagens de Lactobacillus spp. provenientes do canal vaginal de mulheres saudáveis, contra Candida spp. [manuscrito] / Fábio Pereira de Carvalho. – 2007.

xi, 82 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Maria Aparecida de Resende.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

1. Microbiologia – Teses. 2. Lactobacilo – Teses. 3. Lactobacillus. 4. Candida – Teses. 5. Candidíase – Teses. 6. Candidíase vulvovaginal - Terapia. 7. Probióticos – uso terapêutico. I. Resende, Maria Aparecida. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 616.992.28



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

FORMULÁRIO PARA A DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ESTUDANTE: FÁBIO PEREIRA DE CARVALHO Nº Matrícula: 2005208110

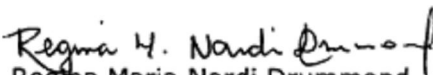
Programa de Pós-graduação em Microbiologia - NÍVEL MESTRADO

Defesa de Dissertação: 28 de fevereiro de 2007


TÍTULO: "Avaliação *in vitro* e *in vivo* do potencial probiótico de linhagens de *Lactobacillus* spp. provenientes do canal vaginal de mulheres saudáveis, contra *Candida* spp".

Co-orientador: Prof. Jacques Robert Nicoli


A Dissertação foi submetida à apreciação da Profa. Edel Figueiredo Barbosa Stancioli que emitiu parecer favorável.


Prof. Regina Maria Nardi Drummond
Examinadora

Aprovado: Sim


Prof. Marcos Mendonça
Examinador

Aprovado: Sim


Prof. Maria Aparecida de Resende
Orientadora

Aprovado: SIM


P/ Prof. Erna Geessien Kroon
Coordenadora

Aos meus pais, Antônio Carlos e Silvana, pelo amor, dedicação, compreensão e incentivo. À minha irmã Emanuela e minha avó Benita, pelo carinho, amizade, presença constante e apoio irrestrito.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Maria Aparecida de Resende. Obrigado por acreditar em mim, pelos valorosos exemplos, ensinamentos, pela dedicação, incentivo, carinho e apoio, contribuindo enormemente para a minha formação.

Ao meu co-orientador, Prof. Jacques Robert Nicoli, por me receber no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos, pelo exemplo de pessoa e pesquisador que é, pela disponibilidade e convívio agradável. Obrigado pela contribuição inestimável no decorrer de todo o trabalho.

Ao Prof. Marcos Mendonça, pela grande contribuição, paciência, incentivo, presteza e atenção, desde o início do trabalho.

À Profa. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho, não só pelo exemplo de pessoa, pesquisadora e educadora que é, mas também pelo interesse e contribuição com a minha formação.

À Profa. Regina Maria Nardi Drummond, pela contribuição, pelo convívio agradável, apoio, interesse e ensinamentos.

À Profa. Denise Carmona, que executou todos os exames histológicos deste trabalho e por sua disponibilidade e paciência na execução do mesmo.

Aos colegas do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos: Aline, Danielle, Gil, Flávia, Flaviano, Luiz, Flávio, Silvana, Ariane, Fabiana, Sílvia, Tássia, Glauciane, Cristiane, Wagner, Felipe, Bernardo, Leandro e Jeniffer. Obrigado pelos ensinamentos, pela colaboração ativa na realização deste projeto, pela força, por cada sorriso e pelo convívio tão agradável.

À Gorete, Bernardo e Walquíria, por toda a ajuda técnica e agradável presença.

Aos colegas do Laboratório de Micologia: Juliana, Suzana, Cleide, Rodrigo, Marcilene, Betânia, Lidiane, José Antônio, Hyllo, Daniele, Giselle, Rodrigo, Verônica, Wigres e Thaís. Obrigado pelo convívio e por tudo o que aprendi com vocês.

Ao Donaldo, Fulgêncio e Gilberto, meus professores de Microbiologia em Diamantina: obrigado pelo exemplo, pelo convívio e pelos valorosos ensinamentos, que levarei por toda a vida. A vocês devo o despertar de meu interesse pela Microbiologia. À Maria Lúcia Onofre, pela amizade, alegria, paciência e por tudo o que me ensinou.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia, pelos valorosos ensinamentos.

À Kelly, pela contribuição e apoio.

À Danúbia e ao Pablo, pela amizade e apoio antes e durante todo o período do mestrado, e a quem não poderia deixar de agradecer por cada momento que partilhamos juntos.

À Jordianne Silva, aluna de iniciação científica, que me acompanhou durante boa parte dos experimentos. Obrigado pela amizade, paciência, auxílio e por tudo o que aprendemos juntos.

À Marilene da Conceição Silva, bibliotecária do ICB, pela presteza e pela valorosa contribuição na elaboração da versão final desta dissertação.

À Capes, pela concessão da Bolsa de Mestrado.

Aos meus familiares.

A todos os amigos que sempre me apoiaram.

A Deus, por seu amor infinito.

“Como não ter Deus?! Com Deus existindo, tudo dá esperança: sempre um milagre é possível, o mundo se resolve. Mas, se não tem Deus, há-de a gente perdidos no vai-vem, e a vida é burra. É o aberto perigo das grandes e pequenas horas, não se podendo facilitar – é todos contra os acasos. Tendo Deus, é menos grave se descuidar um pouquinho, pois, no fim dá certo. Mas, se não tem Deus, então, a gente não tem licença de coisa nenhuma!”

João Guimarães Rosa

RESUMO

A candidíase vaginal é uma doença causada por fungos do grupo das leveduras e do gênero *Candida*. É um problema que aflige milhões de mulheres anualmente em todo o mundo. A maior parte dos casos é resolvida com o uso de antifúngicos, mas estima-se que 5 a 10% das pacientes apresentem infecções recorrentes. Por esta razão, terapias alternativas têm sido propostas, como o uso de lactobacilos. Neste trabalho, foi avaliado o potencial probiótico de 15 amostras de *Lactobacillus crispatus* e seis amostras de *Lactobacillus johnsonii*, obtidas do fluido vaginal de mulheres saudáveis, contra espécies de *Candida*. As duas espécies utilizadas foram as mais freqüentemente isoladas em estudo prévio da microbiota vaginal de 16 mulheres ginecologicamente saudáveis. Para os estudos *in vitro*, foram feitos testes de antagonismo pela técnica de difusão em ágar contra as seguintes linhagens de leveduras: *C. albicans* ATCC 18804, *C. tropicalis* ATCC 750 e *C. krusei* ATCC 20298. Todos os testes foram feitos em duplicata. Três amostras de *L. crispatus* revelaram atividade antagonista contra maior número de linhagens de *Candida* spp. e foram selecionadas para testes *in vivo* subseqüentes, que foram realizados com fêmeas de camundongos BALB-c da linhagem NIH, isentos de germes. Os testes *in vivo* foram realizados em três etapas, variando-se a cada vez a amostra de *Candida* utilizada. Os animais dos grupos teste (n=7, 6 e 6) e controle (n=7, 6 e 6) foram respectivamente inoculados intravaginalmente com um coquetel contendo as três amostras de *L. crispatus* e com caldo MRS estéril. Quatro dias após, os camundongos dos dois grupos receberam inóculos subcutâneos com estrogênio, para garantir a viabilidade das infecções experimentais por *Candida* spp. Sete dias após o inóculo com lactobacilos, ambos os grupos foram inoculados com uma das seguintes linhagens de leveduras: *C. albicans* ATCC 18804, *C. tropicalis* ATCC 750 e, ainda, uma amostra de *C. albicans* isolada de uma paciente com candidíase vaginal. Para a análise estatística dos testes *in vivo*, foi utilizado o teste T de Student. Não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e teste quando utilizadas *C. albicans* ATCC 18804 e *C. albicans* de origem clínica ($p < 0,05$). Por outro lado, houve diferença estatística quando utilizada *C. tropicalis* ATCC 750. Neste caso, os lactobacilos não apresentaram eficácia na redução das infecções

experimentais por *Candida tropicalis*, mas dificultaram o aumento dos níveis populacionais de leveduras. Os dados obtidos indicam possível atividade probiótica dos lactobacilos testados, embora mais testes sejam necessários para melhor avaliação de suas propriedades antagônicas e aplicabilidade no tratamento da candidíase vaginal.

Palavras-chave: candidíase vaginal, probióticos, *Candida*, *Lactobacillus*

ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis is a disease caused by a fungus from the group of yeasts and the genus *Candida* that affects millions of women every year worldwide. Most cases can be solved by antifungals, but it is estimated that 5 to 10% of women present recurrence. For this reason, alternative therapies have been proposed, such as the use of probiotic lactobacilli. In this study, the probiotic properties of 15 samples of *Lactobacillus crispatus* and six samples of *Lactobacillus johnsonii*, obtained from the vaginal fluid of healthy women, have been tested against *Candida* species. Both species were the most commonly found in a previous study with 16 healthy patients. The double-layer technique was used to evaluate *in vitro* antagonism against *Candida albicans* ATCC 18804, *C. tropicalis* ATCC 750 and *C. krusei* ATCC 20298. All tests were performed in duplicate. Three samples of *L. crispatus* showed antagonistic activity against a greater number of *Candida* strains and were selected for subsequent *in vivo* studies with NIH germ-free female BALB-c mice. The *in vivo* studies were divided into three phases, which differed by the *Candida* strain used. The animals of the test (n=7, n=6 and n=6) and control groups (n=7, n=6 and n=6) were respectively intravaginally inoculated with a pool containing the three samples of *L. crispatus* and sterilized MRS broth. Four days after, the mice from both groups were inoculated subcutaneously with estrogen to ensure the viability of *Candida* infections. Seven days after the first inoculations, the animals from both groups were inoculated by one of the following yeasts strains: *C. albicans* ATCC 18804, *C. tropicalis* ATCC 750 and a strain of *Candida albicans* isolated from a patient with vulvovaginal candidiasis. Student T test was used for statistical analysis of *in vivo* studies. No difference was observed between control and test groups when *C. albicans* ATCC 18804 and *C. albicans* from the patient with vulvovaginal candidiasis were used ($p < 0,05$). On the other hand, a significant difference was found when *C. tropicalis* ATCC 750 was used. In this case, the lactobacilli did not show efficacy in preventing or reducing the *Candida* infection, but it seemed not to allow the increase of the yeast population. Obtained data indicate a possible probiotic activity of the tested lactobacilli, although more tests are needed to better evaluate their antagonistic properties and applicability in the treatment of vulvovaginal candidiasis.

Key words: vaginal candidiasis, probiotics, *Candida*, *Lactobacillus*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Aspecto do crescimento da levedura proveniente de uma paciente com CV, em Chromagar Candida	42
Figura 2 -	Aspecto do crescimento de <i>Candida albicans</i> em ágar fubá, acrescido de Tween 80, a 37°C, por 4 dias	42
Figura 3 -	Teste de antagonismo microbiano <i>in vitro</i> pelo método da difusão em camada dupla de ágar	44
Figura 4 -	Técnica de administração intravaginal de microrganismos crescidos em caldo, em camundongos NIH	46
Figura 5 -	Anatomia do trato urogenital da fêmea do camundongo de laboratório	48
Figura 6 -	Aspecto <i>in vivo</i> do trato urogenital da fêmea do camundongo NIH	48
Figura 7 -	Macerador e pistilo utilizados para homogeneização dos tecidos vaginais de camundongos NIH isentos de germes .	48
Figura 8 -	Resultados de testes de antagonismo <i>in vitro</i> pela técnica de difusão em camada dupla de ágar, por amostras de <i>L. crispatus</i> (produtoras) e <i>C. albicans</i> ATCC 18804 (reveladoras).....	53
Figura 9 -	Halos de inibição do crescimento de <i>Candida tropicalis</i> ATCC 750, produzidos pela mesma amostra de <i>L. crispatus</i> (duplicata).....	53
Figura 10 -	Cortes histológicos de mucosa vaginal de camundongos NIH isentos de germes e convencionais	60
Figura 11 -	Cortes histológicos de mucosa vaginal de camundongos NIH isentos de germes – grupo tratado com amostras de <i>L. crispatus</i> e infectado com <i>C. albicans</i> ATCC 18804 e grupo controle	61
Figura 12 -	Cortes histológicos de mucosa vaginal de camundongos NIH isentos de germes – grupo tratado com amostras de <i>L. crispatus</i> e infectado com <i>C. tropicalis</i> ATCC 750 e grupo controle	62

Figura 13 -	Cortes histológicos de mucosa vaginal de camundongos NIH isentos de germes – grupo tratado com amostras de <i>L. crispatus</i> e infectado com <i>C. albicans</i> proveniente de paciente com CV e grupo controle	63
Gráfico 1 -	Níveis populacionais de leveduras (<i>C.albicans</i> ATCC 18804) e <i>L. crispatus</i> (coquetel contendo amostras 3, 5 e 12) nos tecidos vaginais de camundongos NIH gnotoxênicos de cerca de 30 dias de idade	56
Gráfico 2 -	Níveis populacionais de leveduras (<i>C.tropicalis</i> ATCC 750) e <i>L. crispatus</i> (coquetel contendo amostras 3, 5 e 12) nos tecidos vaginais de camundongos NIH gnotoxênicos de cerca de 30 dias de idade	57
Gráfico 3 -	Níveis populacionais de leveduras (<i>C. albicans</i> , proveniente de paciente com CV) e <i>L. crispatus</i> (coquetel contendo amostras 3, 5 e 12) nos tecidos vaginais de camundongos NIH gnotoxênicos de cerca de 30 dias de idade	58
Quadro 1 -	Seqüência de eventos dos experimentos realizados com camundongos isentos de germes, ao longo de um período de 15 dias	45
Quadro 2 -	Inibição do crescimento de <i>Candida</i> spp., por amostras de <i>L. crispatus</i> , em testes de antagonismo <i>in vitro</i> , pela técnica de difusão em camada dupla de ágar	51
Quadro 3 -	Inibição do crescimento de <i>Candida</i> spp., por amostras de <i>L. crispatus</i> , em testes de antagonismo <i>in vitro</i> , pela técnica de difusão em camada dupla de ágar	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CV	candidíase vaginal
CVR	candidíase vaginal recidivante
VB	vaginose bacteriana
ATCC	American Type Culture Collection
ágar MRŚ	ágar deMan, Rogosa and Sharpe
HE	hematoxilina e eosina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Microbiota do trato urogenital feminino	19
2.1.1	Os lactobacilos	21
2.2	Infecções do trato genito-urinário feminino	23
2.2.1	Vaginose bacteriana	23
2.2.2	Candidíase vaginal	25
2.2.2.1	Candidíase vaginal recidivante	27
2.3	Probióticos	28
2.3.1	Probióticos no tratamento de infecções do trato genito-urinário feminino	30
2.3.2	Os lactobacilos	31
2.4	O modelo animal gnotobiótico	34
3	OBJETIVOS	37
3.1	Objetivo geral	38
3.2	Objetivos específicos	38
4	METODOLOGIA	39
4.1	Aspectos éticos	40
4.2	Animais isentos de germes	40
4.3	Amostras de <i>Lactobacillus</i>	40
4.3.1	Conservação das amostras de <i>Lactobacillus</i>	41
4.4	Amostras de <i>Candida</i>	42
4.4.1	Conservação das amostras de <i>Candida</i>	43
4.5	Testes de inibição <i>in vitro</i>	43
4.6	Testes de inibição <i>in vivo</i>	45
4.6.1	Administração de estrogênio	45
4.6.2	Tratamento	46
4.6.3	Desafio.....	47

4.6.4	Determinação do efeito das amostras de <i>Lactobacillus</i> na colonização vaginal por <i>Candida albicans</i> ATCC 18804, <i>C. albicans</i> recém isolada e <i>C. tropicalis</i> ATCC 750 em camundongos gnotoxênicos	47
4.7	Análise estatística	49
4.8	Exames histopatológicos	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1	Verificação da produção de substância(s) antagonista(s) – Testes de antagonismo <i>in vitro</i>	51
5.2	Testes de antagonismo <i>in vivo</i>	55
5.3	Exames histopatológicos	60
6	CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	66
	ANEXO	82

INTRODUÇÃO

As infecções do trato urogenital feminino estão entre as causas mais frequentes de visitas aos consultórios ginecológicos. Anualmente, milhões de casos de vaginites são diagnosticados em todo o mundo (SOBEL & CHAIM, 1996; SINGH *et al.*, 2002), e cerca de 25% destes são decorrentes de alterações vulvovaginais resultantes da proliferação exagerada de espécies de *Candida* spp. (SÃO PAULO 2008).

A candidíase vaginal (CV) pode ser caracterizada clinicamente por sintomas que causam grande desconforto para a paciente, como prurido intenso, ardor, eritema, fissuras na pele, odor malcheiroso, disúria (dor, ardor ou sensação de queimação ao urinar), dispareunia (dor durante o ato sexual) e corrimento esbranquiçado, consistente, semelhante a “leite talhado” (ECKERT *et al.*, 1998; NYIRJESY, 2001; COCO & VANDENBOSCHE, 2000).

Embora a imunopatogênese da CV ainda não esteja bem estabelecida, o uso de antibacterianos, diabetes *mellitus* não controlada, imunossupressão por doença ou por uso de medicamento, uso de duchas para higienização vaginal e de roupas apertadas de tecidos que não permitam passagem de ar (BINGHAM, 1999; MACNEIL & CAREY, 2001) são fatores reconhecidos como predisponentes.

Boa parte das infecções é resolvida por antifúngicos, mas a recorrência é comum. Além disso, as CV decorrentes de espécies não-*albicans*, como *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*, que ocorrem em cerca de 15% dos casos de CV, são comumente refratárias ao tratamento com antimicrobianos e, além disso, o tratamento é muito demorado e caro (DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2008).

Como uma forma de possibilitar às pacientes a cura de casos recidivantes de vaginites por espécies de *Candida*, tratamentos alternativos têm sido propostos, como a utilização de ácido bórico e, mais recentemente, a utilização de probióticos (VAN KESSEL *et al.* 2003).

A constatação de que os lactobacilos são os principais componentes da microbiota vaginal indígena de mulheres em idade reprodutiva, e que sua presença está relacionada à manutenção da saúde da hospedeira, permitiu a concepção de que lactobacilos de origem exógena poderiam ser utilizados como probióticos no

trato urogenital feminino, para o tratamento de diversos tipos de infecções, dentre as quais a CV (REID *et al.*, 2003b). Embora alguns estudos demonstrem a eficácia de amostras de *Lactobacillus* contra espécies de *Candida* (HILTON *et al.* 1995; BORIS *et al.*, 1998; OKKERS *et al.*, 1999; MASTROMARINO *et al.*, 2002; REID *et al.*, 2003a; METTS *et al.*, 2003), nenhuma espécie é considerada, até o momento, um probiótico de efeito comprovado no tratamento de CV (REID, 1999c), o que evidencia a importância de mais pesquisas com o intuito de identificar as espécies que possam, de fato, ser utilizadas como probióticos para esse tipo de vaginite.

Por essa razão, acreditamos que estudos que correlacionem o comportamento *in vitro* e *in vivo*, com a finalidade de esclarecer o potencial probiótico de várias espécies de *Lactobacillus* contra *Candida* spp., sejam importantes para identificar aquelas que realmente poderiam ser utilizadas na prevenção e tratamento da CV.

