

KARINE CACHOEIRA RODRIGUES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Potencial probiótico de *Lactobacillus crispatus* isolados do ecossistema vaginal de mulheres saudáveis em menacme

UFMG

2012

KARINE CACHOEIRA RODRIGUES

Potencial probiótico de *Lactobacillus crispatus* isolados do ecossistema vaginal de mulheres saudáveis em menacme

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Regina Maria Nardi Drummond

BELO HORIZONTE

2012

043 Rodrigues, Karine Cachoeira.
Potencial probiótico de lactobacillus crispatus isolados do ecossistema vaginal de mulheres saudáveis em menacme [manuscrito] / Karine Cachoeira Rodrigues. - 2012.

139 f.: il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Regina Maria Nardi Drummond.

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

1. Lactobacillus crispatus. 2. Probióticos. 3. Vaginose bacteriana. 4. Microbiologia - Teses. I. Drummond, Regina Maria Nardi. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.8

TERMO DE APROVAÇÃO



**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**

ALUNA: KARINE CACHOEIRA RODRIGUES

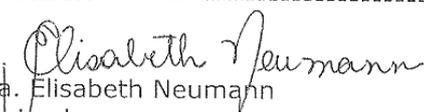
Nº matrícula: 2010652090

Programa de Pós-graduação em Microbiologia - NÍVEL MESTRADO

Defesa de Dissertação: 18 de abril de 2012

Título: "Potencial probiótico de *Lactobacillus crispatus* recuperados de mulheres saudáveis em menacme"

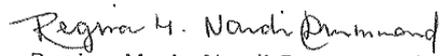
A Dissertação foi submetida à apreciação do Prof. Flaviano dos Santos Martins que emitiu parecer favorável.


Prof. Elisabeth Neumann
Examinadora

Aprovada: *Sim*


Prof. Sílvia Beza de Moura
Examinadora

Aprovada: *sim*


Prof. Regina Maria Nardi Drummond
Orientadora

Aprovada: *sim*


Prof. Cláudio Antônio Bonjardim
Coordenador

À minha família e ao meu noivo, Fernando, que de muitas formas incentivaram e ajudaram para que fosse possível a concretização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por conceder-me saúde, perseverança, conforto espiritual, amor imensurável e proporcionar-me a conclusão de mais uma etapa que se consuma neste trabalho. Agradeço pelas oportunidades que me foram dadas, principalmente, por ter conhecido pessoas queridas, mas também por ter vivido fases difíceis, que foram fontes de aprendizado.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), ao Instituto de Ciências Biológicas (ICB) e ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, pela infra-estrutura e excelência de ensino, fundamentais para a realização do Mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo incentivo à pesquisa e pela concessão da Bolsa de Mestrado e de recursos financeiros.

À minha orientadora, professora Regina Maria Nardi Drummond, pela credibilidade, confiança, amizade, convivência agradável e dedicação dispensados à concretização deste trabalho.

Ao professor Jacques Robert Nicoli, exemplo de pessoa, pesquisador e educador, por quem tenho imensa admiração e carinho por ter me acolhido em seu laboratório.

À professora Denise Carmona Cara Machado, que realizou as análises histológicas, por sua disponibilidade e paciência.

Ao Centro de Microscopia da UFMG, em especial à professora Elizabeth Ribeiro da Silva, pelo auxílio na microscopia eletrônica, bem como ao Breno, à Janine, Natália e Roberta.

À professora Elisabeth Neumann, por toda a ajuda e preciosas sugestões prestadas durante o Mestrado, que contribuíram de maneira significativa e enriquecedora. Obrigada pelo apoio, incentivo, pela atenção, disponibilidade e gentileza em ensinar.

À professora Silvia Beleza de Moura, pela agradável convivência, por todas as palavras de carinho, sempre com um sorriso no rosto.

Os resultados obtidos com os animais gnotobióticos não foram incluídos neste trabalho, mas não poderia deixar de agradecer imensamente ao professor Flaviano dos Santos Martins pela gentileza e confiança em disponibilizar os camundongos *germ-free*.

À professora Vera Lúcia dos Santos, pelo incentivo, conselhos e por suas doces palavras nos momentos de dificuldade. Obrigada por tudo, pela contribuição para a minha formação profissional e pessoal.

À professora Simone Gonçalves dos Santos, pelo apoio, interesse, ensinamentos, pela contribuição e sensibilidade que a diferencia como educadora.

À professora Maria Auxiliadora Roque de Carvalho e ao professor Luiz de Macêdo Farias, exemplos de profissionalismo, competência e seriedade, pela disponibilidade em partilhar suas experiências. Obrigada por confiarem em mim e, gentilmente, abrirem as portas do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios por inúmeras vezes.

Aos demais professores e funcionários do Departamento de Microbiologia, pelos valorosos ensinamentos, cada um de forma especial contribuiu para a conclusão deste trabalho e conseqüentemente para a minha formação.

À fofoquinha Tássia Costa Souza, pela amizade sincera em todos os momentos. Obrigada por tudo que você ensinou-me, pelo exemplo de pessoa e pesquisadora, pelo seu carinho, por sua disponibilidade desde o momento em que nos conhecemos, sempre dividindo comigo as alegrias e preocupações. Sou grata pelo seu apoio, que contribuiu de forma inestimável para a realização deste trabalho e pelos valores que levarei para a vida inteira.

À Ariane, Éricka e ao Samir pelo empenho e pela gentileza na colaboração durante os experimentos com os animais *germ-free*.

Ao Mário Abatemarco Júnior, com quem pude contar com a sua sincera amizade, cumplicidade, gestos e palavras de conforto, sempre me incentivando.

À querida Renata Maria da Fonseca Gomes, pela sua força e cativante alegria de viver, por cada sorriso e pelo ombro amigo, imprescindíveis nesta jornada.

Ao querido Rafael de Castro Faria, por momentos tão divertidos, pelo carinho, pela verdadeira amizade que construímos para além dos espaços da Universidade.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos (LEFM), Adriano, Aline, Bianca, Bruna, Clélia, Cristiane, Elisa, Fabiana, Fábio, Laís, Marcella, Maurício, Michelle, Nayara, Patrick, Rafael, Raphael, Sílvia Crispim, Sílvia Pietra e

Spencer. Obrigada pela paciência, convivência agradável, pelos ensinamentos e pelo apoio indispensáveis na condução do Mestrado.

Aos colegas dos Laboratórios de Microbiologia aplicada (LMA), Aline, Fernanda, Irany e Mariana; de Microbiologia Oral e Anaeróbios (MOA), Ana, Daniela, Hanoch, Jaqueline, João, Mariana, Patrícia e Sérgio; de Taxonomia, Biodiversidade e Biotecnologia de Fungos, Cristiane, Gabriella, Fernanda e María Cristina e do Laboratório de Genética Molecular de Protozoários Parasitas (LGMPP), Bruno, Débora, Igor, Luige e Sávio, pela simpatia, colaboração ativa, cordialidade, solidariedade e atenção que sempre tiveram comigo.

Aos colegas da pós-graduação, Adriana do Nascimento, Gisele Rodrigues, Juliana Santos, Leandro Chinalia, Rodrigo de Holanda e Tânia Pinho, pelo incentivo, carinho, pela força, amizade, e por todas as palavras amigas e oportunas que partilhamos durante nosso caminhar.

À minha mãe, Terezinha, pelo amor incondicional e pela dedicação que sempre teve comigo. Mulher pela qual tenho o maior orgulho de chamar de mãe, meu eterno agradecimento pelos momentos em que estive ao meu lado não me deixando desistir e mostrando que sou capaz de chegar onde desejo. Sem dúvida, foi quem me deu o maior incentivo para conseguir concluir esta etapa. Pessoa que sigo como exemplo, amiga, batalhadora, abriu mão de muitas coisas para me proporcionar a realização deste trabalho. Obrigada por ser a pessoa que mais me apóia e acredita na minha capacidade.

Aos meus familiares, pelas oportunidades oferecidas, pela confiança, por terem feito o possível e o impossível para me oferecerem a oportunidade de estudar em Minas Gerais, longe deles, acreditando e respeitando minhas decisões e nunca deixando que as dificuldades acabassem com os meus sonhos, serei imensamente grata.

Ao meu noivo, Fernando, por compreender a importância dessa conquista, respeitando e aceitando a minha ausência. Você se envolveu na minha caminhada, provando que amar não é olhar um para o outro, e, sim olharmos juntos na mesma direção.

Às queridíssimas Andressa e Cássia pelo ombro amigo, convívio agradável e pela paciência. Às amigas Cleide Knabben, Deise Kolling, Jaqueline Flores, Joicy de Sá, Michelle Peters, Renata Rudolf e Mariana Araújo, que mesmo distantes sempre torceram por mim.

“O correr da vida embrulha tudo. Ávida é assim, esquenta e esfria, aperta e depois afrouxa, aquieta e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre e amar, no meio da alegria. E ainda mais no meio da tristeza. Todo o caminho da gente é resvaloso, mas cair não prejudica demais, a gente levanta, a gente sobe, a gente volta”.

João Guimarães Rosa (1956)

RESUMO

Os lactobacilos são, normalmente, os micro-organismos mais prevalentes no conteúdo vaginal de mulheres saudáveis em menacme. Estes exercem importante influência no ecossistema local ao protegerem a mucosa contra o estabelecimento de patógenos, incluindo aqueles associados à vaginose bacteriana (VB), o tipo de vaginite mais comum entre as mulheres em idade reprodutiva. Isto ocorre, principalmente, devido à capacidade dos lactobacilos aderirem às células epiteliais vaginais e devido à inibição do crescimento de patógenos. Parece indiscutível que o rompimento do equilíbrio microbiológico constitui a base desta complexa doença, o que implica que o tratamento deve ser baseado na correção da disbiose sem causar impacto negativo sobre a microbiota lactobacilar residente. A existência de estudos que investigam a melhor alternativa para o tratamento desta infecção é consequência das baixas taxas de cura e dos altos índices de recorrência reportados com os tratamentos atualmente preconizados. A maioria dos ensaios que avaliaram os lactobacilos como probióticos utilizou amostras mal caracterizadas ou que não possuem as propriedades necessárias para tal fim. O presente trabalho investigou *in vitro* e *in vivo* as propriedades probióticas de duas amostras de *Lactobacillus crispatus* isoladas do ecossistema vaginal de mulheres saudáveis em menacme, uma vez que esta espécie, frequentemente, predomina nesse microambiente. A amostra L.04 foi selecionada para os ensaios *in vivo*, pois melhor expressou produção de substância(s) antagonista(s), hidrofobicidade da superfície celular e perfil de susceptibilidade aos antibióticos testados. O uso do modelo murino de VB em camundongos convencionais permitiu observar que houve proteção contra a infecção experimental com *Gardnerella vaginalis* ATCC[®] 14018, evidenciada pela redução nas lesões histopatológicas provocadas por esta bactéria.

Palavras-chave: *Lactobacillus crispatus*. Probióticos. Vaginose bacteriana.

ABSTRACT

Lactobacilli are usually the most prevalent microorganisms on vaginal fluid of healthy women in menacme. These microorganisms play an important role on the local ecosystem as they protect the mucosa against the pathogens, including those associated with bacterial vaginosis (BV), which is the most common vaginitis among women of reproductive age. That happens mainly due to the lactobacilli ability to adhere to vaginal epithelial cells and also due to pathogens growth inhibition. It seems incontestable that the disruption of the microbial balance is the basis of this complex disease. Therefore the treatment should be based on correcting the dysbiosis without a negative impact on the resident microbiota lactobacilli. The existence of studies that investigate the best alternative to treat this infection is a consequence of the low cure rates and the high levels of recurrence reported by the currently recommended treatments. Most of the studies that have evaluated the lactobacilli as probiotics used mischaracterized samples that do not have the necessary properties for this purpose. The present work investigated the *in vitro* and *in vivo* probiotic properties of two *Lactobacillus crispatus* samples isolated from the vaginal ecosystem of healthy women in menacme, since it is often the predominant specie in this microenvironment. The *in vivo* tests were carried out with sample L.04 because it showed a better antagonist substance production, cellular surface hydrophobicity and susceptibility to the evaluated antibiotics. The use of BV murine model in conventional mice revealed a protection against the *Gardnerella vaginalis* ATCC® 14018 experimental infection, which was evidenced by the reduction in histopathological lesions caused by this bacterium.

Key words: *Lactobacillus crispatus*. Probiotics. Bacterial vaginosis.