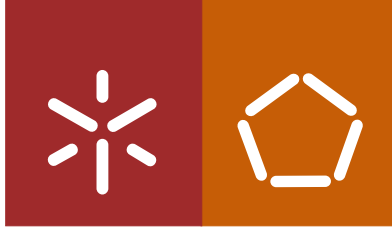


**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Carla Sofia da Silva Ferreira

**Comparação da microbiota vaginal entre  
mulheres Portuguesas saudáveis ou com  
vaginose bacteriana, através de tipagem  
molecular**



**Universidade do Minho**

Escola de Engenharia

Carla Sofia da Silva Ferreira

**Comparação da microbiota vaginal entre  
mulheres Portuguesas saudáveis ou com  
vaginose bacteriana, através de tipagem  
molecular**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica  
Ramo de Engenharia Clínica

Trabalho efetuado sob a orientação da  
**Doutora Diana Sousa**  
e co-orientação do  
**Doutor Nuno Cerca**

## **Declaração**

**NOME:** Carla Sofia da Silva Ferreira

**ENDEREÇO ELECTRÓNICO:** carsof\_87@hotmail.com

**CARTÃO DE CIDADÃO:** 13250186

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO:**

Comparação da microbiota vaginal entre mulheres Portuguesas saudáveis ou com vaginose bacteriana, através de tipagem molecular.

Comparison of vaginal microbiota fingerprints from healthy and Bacterial Vaginosis-positive Portuguese women.

**ORIENTADORA:** Doutora Diana Sousa

**CO-ORIENTADOR:** Doutor Nuno Cerca

**ANO DE CONCLUSÃO:** 2014

**MESTRADO EM:**

Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica- Ramo de Engenharia Clínica

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **Agradecimentos**

São muitas as pessoas a quem não posso deixar de manifestar o meu apreço e agradecimento sincero pelo apoio, acompanhamento, compreensão e dedicação, permitindo que esta dissertação fosse realizada.

Agradeço em primeiro lugar aos meus orientadores Diana Sousa e Nuno Cerca, pela oportunidade que me proporcionaram de conhecer de perto o mundo da investigação. Obrigada por todos os conhecimentos transmitidos, pela disponibilidade e dedicação, pela orientação e amizade. Obrigada por me transmitirem que mesmo em momentos difíceis e controversos, a persistência alcança os objetivos. Foi um prazer ter desenvolvido este trabalho convosco.

À Doutora Andreia Salvador que acompanhou de perto todo o meu trabalho e me mostrou que é possível conseguir o que queremos quando queremos muito. Obrigada por me ensinares que não há melhor forma de estar na vida do que ter a certeza de que tudo vai correr sempre bem. Sem dúvida te tornaste num exemplo de otimismo a seguir. Agradeço a amizade, a força, o sorriso e a palavra amiga nos momentos menos bons.

A todos os colegas do grupo “NC” pela forma como me acolheram e acompanharam.

À Joana Castro pela amizade e por todo o apoio!

Ao Sérgio Silva, pela ajuda e pela partilha da sua experiência.

À professora Doutora Alcina Pereira por ter estado sempre disponível para partilhar os seus conhecimentos e experiência.

À Doutora Joana Alves, por toda a ajuda e disponibilidade.

Ao professor Doutor Miguel Gama e à professora Doutora Mariana Henriques por todo o apoio e compreensão.

Ao meu filho Afonso, por ser a razão por que luto todos os dias pela vida e não desisto dela. Sem ti nada seria, nada faria e não viveria! És inspiração para tudo aquilo que faço.

Ao meu marido, amigo, conselheiro e companheiro Eduardo, que aguentou muitos momentos de *stress*, com muita calma e paciência. Uma palavra de reconhecimento muito especial, pelo amor incondicional e pela forma como ao longo de todos estes anos, tão bem, soube ajudar-me.

Aos meus pais e ao meu irmão, agradeço todo o apoio e incentivo nos bons e maus momentos. A vocês devo tudo aquilo que sou hoje. Espero que esta etapa, que agora termino, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me ofereceram.

À minha família, dedico todo este trabalho.

Esta dissertação foi financiada pelo projeto FCOMP-01-0124-FEDER-008991 (PTDC/BIA-MIC/098228/2008) e co-financiada pelos projetos FCOMP-01-0124-FEDER-027462 (RECI/BBB-EBI/0179/2012) e PEst-OE/EQB/LA0023/2013.

**FCT**  
Fundação para a Ciência e a Tecnologia  
MINISTÉRIO DA GERAL, FINANÇAS E ENSINO SUPERIOR

  
**COMPETE**

  
QUADRO  
DE REFERÊNCIA  
ESTRATÉGICO  
NACIONAL

  
**UNIÃO EUROPEIA**  
Fundo Europeu de  
Desenvolvimento Regional

## Resumo

A Vaginose Bacteriana (VB) é uma doença comum em mulheres em idade reprodutiva e, em termos microbiológicos, é caracterizada pela substituição de espécies de *Lactobacillus*, que são predominantes na microflora vaginal normal, por bactérias anaeróbias que proliferam rapidamente, particularmente *Gardnerella vaginalis*. Embora não fatal, a VB aumenta o fator de risco de aquisição de várias doenças sexualmente transmissíveis e está envolvida em abortos e partos prematuros. O objetivo deste trabalho foi estudar a estrutura das comunidades microbianas presentes na microflora vaginal de mulheres portuguesas saudáveis e com VB. Para isso, o DNA obtido a partir de amostras vaginais recolhidas de mulheres VB-negativas (21 amostras) e VB-positivas (17 amostras) foi submetido a amplificação por PCR e posterior análise por DGGE. Os microrganismos pertencentes aos grupos *Bacteria*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* spp. e *G. vaginalis* foram detetados por PCR com *primers* específicos para a amplificação do gene que codifica o 16S rRNA. Os perfis de DGGE obtidos para cada amostra foram comparados e a similaridade entre perfis determinada através do cálculo dos índices de similaridade. Obtiveram-se diferentes perfis de DGGE em amostras VB-positivas e VB-negativas com *primers* específicos para todos os grupos estudados. Os resultados obtidos mostram que existem alterações na estrutura da comunidade microbiana de amostras VB-positivas e negativas e que estas são detetadas por PCR-DGGE. Os perfis de DGGE obtidos a partir de amostras de mulheres VB-positivas são mais diversos comparativamente aos perfis obtidos a partir de amostras de mulheres saudáveis, refletindo assim a maior diversidade das comunidades bacterianas em mulheres VB-positivas. A análise do padrão das bandas eletroforéticas obtido para *Bacteria* revela uma diversidade intrínseca dentro dos dois grupos estudados: as semelhanças nos perfis de DGGE bacterianos variam entre 9-71% e 13-100% para amostras VB-positivas e VB-negativas, respetivamente. *G. vaginalis* não foi detetada em nenhuma das amostras de mulheres saudáveis, por outro lado, foi detetada em todas as amostras VB-positivas. A análise das comunidades de *Lactobacillus* revelou uma maior diversidade em amostras de mulheres VB-negativas comparativamente a amostras de mulheres VB-positivas, confirmando a associação de *Lactobacillus* à microflora vaginal saudável. O conhecimento mais aprofundado sobre a influência da VB na microflora vaginal, poderá ser obtido recorrendo à sequenciação dos genes que codificam para o 16S rRNA, permitindo assim a identificação dos microrganismos presentes em mulheres VB-negativas e VB-positivas.



## Abstract

Bacterial Vaginosis (BV) is a common disease in women of reproductive age and, from a microbiology perspective is characterized by the substitution of *Lactobacillus* species, which are predominant in the normal vaginal microbiota, by rapidly proliferating anaerobic bacteria, particularly *Gardnerella vaginalis*. Although not fatal, BV increases the risk factor for the acquisition of several sexually transmitted diseases and it is related to in abortions and premature births. The aim of this study was to study the structure of vaginal microbiota communities structure in the vaginal microbiota of healthy and BV-positive Portuguese women. For this propose, DNA obtained from vaginal samples of 21 BV-negative and 17 BV-positive women was submitted to PCR amplification followed by amplicons analysis DGGE. Total bacterial communities were amplified using general 16S rRNA gene primers. Group-specific primers were also used targeting *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *G. vaginalis*. DGGE profiles were compared and similarity between DGGE profiles was determined by calculating similarity indices. Different DGGE profiles could be obtained for BV-positive and BV-negative samples and this was verified for all primers sets utilized, suggesting that alteration of microbial community structure of BV-positive and -negative samples could be detected by PCR-DGGE. DGGE profiles obtained from samples of BV-positive women were more diverse that the ones from healthy women (as determined by a higher number of DGGE bands). The analysis of the standard electrophoretic bands for *Bacteria* reveals an intrinsic diversity even within the two groups studied: similarities in bacterial DGGE profiles vary between 9- 71% and 13-100% in BV-positive and BV-negative samples, respectively. *G. vaginalis* was not detected in any of the healthy women samples. The analysis of *Lactobacillus* communities revealed a higher diversity in BV-negative women than in BV-positive, which confirms the association of *Lactobacillus* to healthy vaginal microbial communities. A more thoroughly comparison between the microbiota of BV-positive and BV-negative women is necessary for getting more insights on the BV influence on vaginal microbiota, which can be done by 16S rRNA gene sequencing of microbial communities.





## Índice

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>III</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	<b>XI</b>
<b>PUBLICAÇÕES RESULTANTES DESTA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO</b> .....	<b>XIII</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>XV</b>
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	<b>XVII</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
HISTÓRICO DA VAGINOSE BACTERIANA .....	23
O PRIMEIRO DIAGNÓSTICO DA VAGINOSE BACTERIANA .....	24
CARACTERÍSTICAS GERAIS DA VAGINOSE BACTERIANA .....	25
IMPORTÂNCIA DOS <i>LACTOBACILLUS</i> NA MICROFLORA VAGINAL .....	25
FLORA VAGINAL EM MULHERES SAUDÁVEIS .....	26
FATORES ENVOLVIDOS NA COLONIZAÇÃO DO EPITÉLIO VAGINAL .....	26
OS SINTOMAS ASSOCIADOS À VAGINOSE BACTERIANA .....	27
COMPLICAÇÕES ASSOCIADAS À VAGINOSE BACTERIANA .....	28
EPIDEMIOLOGIA DA VB .....	29
O DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DA VAGINOSE BACTERIANA .....	30
TERAPIAS ATUAIS DE TRATAMENTO DA VB .....	31
CARACTERÍSTICAS DA <i>GARDNERELLA VAGINALIS</i> .....	32
FATORES DE VIRULÊNCIA DA <i>G. VAGINALIS</i> .....	34
<i>A formação de biofilme</i> .....	34
<i>Hemolisina</i> .....	34
<i>Vaginolisina</i> .....	34
MÉTODOS MOLECULARES UTILIZADOS NO ESTUDO DA VAGINOSE BACTERIANA .....	35
APLICAÇÃO DE TÉCNICAS MOLECULARES NO DIAGNÓSTICO DA VAGINOSE BACTERIANA .....	35
PNA-FISH .....	35
REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR) .....	36
PCR-DGGE .....	37
<i>Materiais e Métodos</i> .....	<i>i</i>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>41</b>
AMOSTRAS VAGINAIS .....	41

EXTRAÇÃO DE DNA.....	41
IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS .....	41
AMPLIFICAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS POR REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA (PCR).....	43
ELETROFORESE EM GEL COM GRADIENTE DESNATURANTE (DGGE) .....	46
ANÁLISE DOS GÉIS DE DGGE COM O SOFTWARE <i>BIONUMERICS</i> .....	47
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO DE RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
<b>CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO .....</b>	<b>69</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>73</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>91</b>

## Lista de abreviaturas e siglas

APS	<i>Ammonium persulfate</i> (Persulfato de amónio)
DGGE	<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> (Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
FISH	<i>Fluorescence in situ Hybridization</i> (Hibridização Fluorescente <i>in situ</i> )
GC	Guanina/Citosina
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i> (Vírus da Imunodeficiência Humana)
KOH	Hidróxido de potássio
HPV	<i>Human papillomavirus</i> (Vírus do papiloma humano)
pb	pares de base
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato salino)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação de Polimerização em Cadeia)
PNA	<i>Peptide nucleic acid</i> (Ácido Nucleico Peptídico)
qRT-PCR	<i>real time quantitative PCR</i> (PCR quantitativo em tempo real)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico ribossomal)
Ta	Temperatura de <i>annealing</i>
TAE	<i>Tris-Acetate EDTA</i> (tampão Tris-Acetato-EDTA)
TGF	Trato genital feminino
VB	Vaginose Bacteriana
UV	<i>Ultraviolet</i> (Ultra violeta)
w/v	<i>Weight/ volume</i> (peso/volume)



## **Publicações resultantes desta dissertação de mestrado**

Ferreira CS, Salvador AF, Cereija T, Cerca N, Sousa DZ (2013), Comparison of vaginal microbiota fingerprints from healthy and Bacterial Vaginosis-positive Portuguese women, in **MicroBiotec 13**, Aveiro, Portugal, 6-8 December 2013;



## Índice de figuras

<b>FIGURA 1.1</b> PROTEÇÃO NATURAL DA VAGINA.....	26
<b>FIGURA 1.2</b> A. CÉLULAS EPITELIAIS DA MICROFLORA VAGINAL SAUDÁVEL; B. <i>CLUE CELLS</i> COBERTAS POR BACTÉRIAS. ....	28
<b>FIGURA 1.3</b> CONCEITO DA TÉCNICA DE PCR-DGGE.....	38
<b>FIGURA 3.1</b> PERFIS DE DGGE OBTIDOS PARA O DOMÍNIO <i>BACTERIA</i> E ÍNDICES DE DIVERSIDADE RESPETIVOS A CADA AMOSTRA VB-NEGATIVA. ....	53
<b>FIGURA 3.2</b> PERFIS DE DGGE OBTIDOS PARA O DOMÍNIO <i>BACTERIA</i> E ÍNDICES DE DIVERSIDADE RESPETIVOS A CADA AMOSTRA VB-NEGATIVA (PRETO) E VB-POSITIVA (LARANJA). ....	54
<b>FIGURA 3.3</b> PERFIS DE DGGE OBTIDOS PARA O DOMÍNIO <i>BACTERIA</i> E ÍNDICES DE DIVERSIDADE RESPETIVOS A CADA AMOSTRA VB-POSITIVA. ....	54
<b>FIGURA 3.4</b> MATRIZ DE SIMILARIDADE. SIMILARIDADE (%) ENTRE OS PERFIS DE DGGE OBTIDOS PARA CADA AMOSTRA APÓS AMPLIFICAÇÃO COM <i>PRIMERS</i> ESPECÍFICOS PARA <i>BACTERIA</i> . ....	56
<b>FIGURA 3.5</b> ANÁLISE DE AGRUPAMENTO PELO COEFICIENTE DE UPGMA, USANDO A CORRELAÇÃO DE <i>DICE</i> , DOS PERFIS DE DGGE DE <i>BACTERIA</i> (A), <i>BIFIDOBACTERIUM</i> (B), <i>LACTOBACILLUS SPP.</i> (C) E <i>G. VAGINALIS</i> (D).....	58
<b>FIGURA 3.6</b> MATRIZ DE SIMILARIDADE. SIMILARIDADE (%) ENTRE OS PERFIS DE DGGE OBTIDOS PARA CADA AMOSTRA APÓS AMPLIFICAÇÃO COM <i>PRIMERS</i> ESPECÍFICOS PARA <i>G. VAGINALIS</i> . ....	59
<b>FIGURA 3.7</b> MATRIZ DE SIMILARIDADE. SIMILARIDADE (%) ENTRE OS PERFIS DE DGGE OBTIDOS PARA CADA AMOSTRA APÓS AMPLIFICAÇÃO COM <i>PRIMERS</i> ESPECÍFICOS PARA <i>BIFIDOBACTERIUM</i> . ....	61
<b>FIGURA 3.8</b> PERFIS DE DGGE OBTIDOS PARA <i>BIFIDOBACTERIUM</i> E ÍNDICES DE DIVERSIDADE RESPETIVOS A CADA AMOSTRA VB-POSITIVA. ....	62
<b>FIGURA 3.9</b> PERFIS DE DGGE OBTIDOS PARA <i>BIFIDOBACTERIUM</i> E ÍNDICES DE DIVERSIDADE RESPETIVOS A CADA AMOSTRA VB-POSITIVA (LARANJA) E VB-NEGATIVA (PRETO). ....	62
<b>FIGURA 3.10</b> MATRIZ DE SIMILARIDADE. SIMILARIDADE (%) ENTRE OS PERFIS DE DGGE OBTIDOS PARA CADA AMOSTRA APÓS AMPLIFICAÇÃO COM <i>PRIMERS</i> ESPECÍFICOS PARA <i>LACTOBACILLUS SPP.</i> .....	63
<b>FIGURA 3.11</b> PERFIS DE DGGE OBTIDOS PARA <i>LACTOBACILLUS SPP.</i> E ÍNDICES DE DIVERSIDADE RESPETIVOS A CADA AMOSTRA VB-NEGATIVA. ....	64
<b>FIGURA 3.12</b> PERFIS DE DGGE OBTIDOS PARA <i>LACTOBACILLUS SPP.</i> E ÍNDICES DE DIVERSIDADE RESPETIVOS A CADA AMOSTRA VB-POSITIVA (LARANJA) E VB-NEGATIVA (PRETO). ....	64



**FIGURA 3.13** PERFIS DE DGGE OBTIDOS PARA *LACTOBACILLUS* SPP. E ÍNDICES DE DIVERSIDADE  
RESPECTIVOS A CADA AMOSTRA VB-POSITIVA. ....65

## Índice de tabelas

<b>TABELA 1.1</b> CRITÉRIO DE CLASSIFICAÇÃO DE <i>NUGENT</i> PARA O DIAGNÓSTICO DE VAGINOSE BACTERIANA .....	31
<b>TABELA 2.1</b> IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS VAGINAIS.....	42
<b>TABELA 2.2</b> PARES DE <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE QUE CODIFICA PARA O 16S RRNA, RESPECTIVA SEQUÊNCIA (5'-3') E CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO. ....	44
<b>TABELA 2.3</b> COMPOSIÇÃO DAS SOLUÇÕES A USAR NUMA REVELAÇÃO COM NITRATO DE PRATA. ....	47
<b>TABELA 3.1</b> CONCENTRAÇÃO E PUREZA DO DNA EXTRAÍDO DAS AMOSTRAS VAGINAIS.....	52
<b>TABELA 3.2</b> RESULTADOS OBTIDOS POR PCR UTILIZANDO <i>PRIMERS</i> ESPECÍFICOS PARA <i>BACTERIA</i> , <i>BIFIDOBACTERIUM</i> , <i>LACTOBACILLUS SPP.</i> E <i>G. VAGINALIS</i> . ....	55
<b>TABELA 5.1</b> PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE DESNATURAÇÃO.....	92



*“Algo só é impossível até que alguém duvide e  
resolva provar ao contrário.”*

Albert Einstein



# **CAPÍTULO 1**

---

## **Introdução**



## Introdução

O trato genital feminino (TGF) é um nicho ecológico onde vários microrganismos aeróbios e anaeróbios coexistem em equilíbrio dinâmico (Vitali *et al.*, 2012). Em mulheres saudáveis, o ecossistema vaginal é maioritariamente habitado por *Lactobacillus* (cerca de 95% dos microrganismos no TGF pertencem a este género), especialmente *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri* e *Lactobacillus jensenii* (Larsen *et al.*, 2001; Pavlova *et al.*, 2002; Zaraté and Nader-Macias, 2006; Marrazzo, 2011). O TGF e os microrganismos que nele habitam formam um ecossistema equilibrado, importante para garantir a saúde e fornecer defesas contra infeções. Assim, grandes mudanças, tanto no tipo como na proporção relativa das espécies microbianas, poderão levar ao desenvolvimento de doenças (Ling *et al.*, 2011).

De entre as infeções do TGF, a Vaginose Bacteriana (VB) é uma das doenças mais comuns em mulheres sexualmente ativas e em idade reprodutiva (Morris *et al.*, 2001; Simões *et al.*, 2006; Turovskiy *et al.*, 2011) e afeta 30-50% das mulheres afro-americanas e 10-20% das mulheres caucasianas (Eschenbach, 1993; Sobel, 2000), causando várias complicações associadas à saúde reprodutiva das mulheres.

O objetivo principal deste trabalho foi estudar a diversidade microbiana da flora vaginal de mulheres Portuguesas com VB. Foram usadas técnicas moleculares para o estudo da diversidade microbiana, especificamente a Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (DGGE) utilizando *primers* específicos para o gene 16S rRNA de *Eubacteria*, bem como *primers* específicos para *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Gardnerella vaginalis*. O PCR-DGGE foi usado com sucesso no estudo da flora vaginal, nomeadamente na deteção de *Gardnerella vaginalis*, demonstrando a complexidade da microflora de uma mulher com VB.

## Histórico da vaginose bacteriana

A nomenclatura da VB foi sendo modificada ao longo do tempo, acompanhando o avanço dos conhecimentos microbiológicos. Já foram elaboradas por vários autores diversas denominações para descrever a VB, nomeadamente: vaginite inespecífica (Krönig, 1892), vaginite por *Haemophilus vaginalis* (Gardner e Dukes, 1955), vaginite por *Gardnerella vaginalis* (Greenwood e Pickett, 1980), vaginose anaeróbia (Blackwell e Barlow, 1982), vaginose bacteriana (Westrom *et al.*, 1984) (Giraldo *et al.*, 2008).



Até à década de 50, mulheres que apresentavam anormalidade no corrimento vaginal e a quem não eram detetados fungos ou *Trichomonas vaginalis*, recebiam diagnóstico de vaginite inespecífica, porém, em 1955, Gardner e Dukes publicaram um artigo onde descreviam as características desta vulvovaginite, as quais compõem a base do diagnóstico atual da VB. Além disso, esses autores descreveram também um novo microrganismo que denominaram de *Haemophilus vaginalis* e o qual acreditavam ser o agente etiológico da vaginite inespecífica, que passou então a ser chamada de vaginite por *Haemophilus vaginalis* (Gardner e Dukes, 1955). Posteriormente, em 1980, este microrganismo foi reclassificado taxonomicamente por Greenwood e Pickett, sendo denominado de *Gardnerella vaginalis*. Entretanto, a descoberta de uma multiplicidade microbiológica associada à VB, contendo bactérias anaeróbias, induziu à denominação generalizada de vaginose bacteriana (Greenwood e Pickett, 1980).

O termo vaginite deu lugar ao termo vaginose devido ao reduzido número ou até mesmo ausência de leucócitos polimorfonucleares nos conteúdos vaginais, e este termo reflete, mesmo na ausência de inflamação, uma patologia vaginal. Uma explicação para tal facto seria porque tanto a *G. vaginalis* quanto as outras bactérias verificadas na VB já se encontram na microbiota normal da vagina, não ocasionando, mesmo com aumento da quantidade, uma resposta inflamatória (Sobel *et al.*, 1999; Moodley *et al.*, 2002).

### **O primeiro diagnóstico da vaginose bacteriana**

Há 50 anos, Gardner e Dukes defenderam que o agente etiológico responsável por causar VB era *G. vaginalis*, argumentando que uma colónia pura de *G. vaginalis* inoculada na vagina pode causar VB (Gardner e Dukes, 1959). Na verdade, *G. vaginalis* é um exemplo de um microrganismo associado à VB e foi detetado também na microflora vaginal de mulheres saudáveis (Fredricks *et al.*, 2009; Turovskiy *et al.*, 2011).

*G. vaginalis* não é o único microrganismo causador de VB, embora tenha sido identificada em mais de 95% dos casos (Catlin, 1992).

## Caraterísticas gerais da vaginose bacteriana

A VB é três a quatro vezes mais comum do que infecções causadas por *Trichomonas vaginalis* e candidíase vulvovaginal (Cauci *et al.*, 1996; Eschenbach, 2007; Patterson *et al.*, 2010). A VB é caracterizada por uma substituição da microflora normal da vagina, onde predominam espécies de *Lactobacillus* spp., por uma proliferação exagerada de bactérias anaeróbias (Hillier *et al.*, 1999). Deste modo, pode ser classificada em dois tipos, I e II. A tipo I, ocorre quando há predominância de *G. vaginalis* e a tipo II, quando a VB está associada à presença de bactérias dos géneros *Mobiluncus*, *Prevotella* e *Bacteróides*. Nas infecções com flora mista (tipo II) verifica-se a presença de exsudato inflamatório nos esfregaços cervico-vaginais, já nas infecções do tipo I, o exsudato nem sempre é visível (Gompeal *et al.*, 1997).

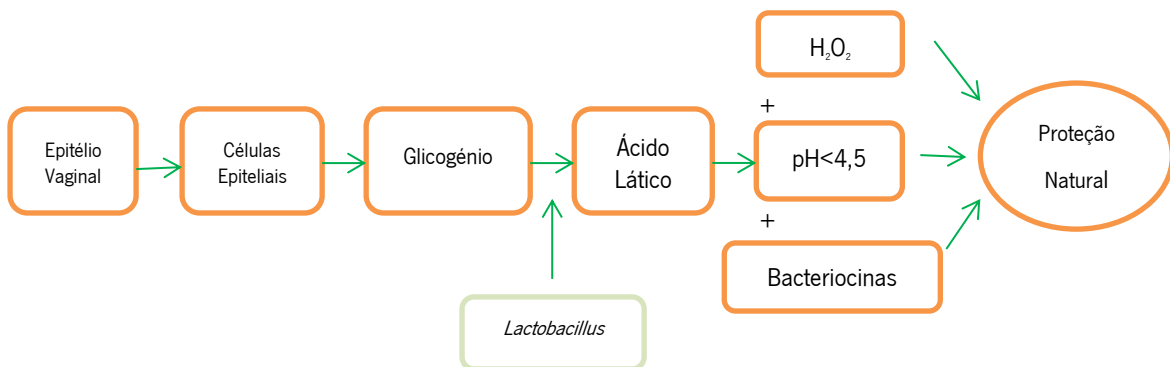
## Importância dos *Lactobacillus* na microflora vaginal

Os *Lactobacillus* spp., desempenham um papel fundamental na prevenção da colonização por organismos indesejáveis, assumindo a importante função de manter o ecossistema vaginal saudável (Aroutcheva *et al.*, 2001; Saunders *et al.*, 2007; Coudeyras *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2010). Cerca de 78% dos *Lactobacillus* presentes na flora vaginal protegem a vagina contra agentes patológicos através da produção de ácido láctico, bacteriocinas e peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que têm propriedades antimicrobianas mantendo o pH vaginal ácido e impedindo a proliferação de bactérias causadoras de VB (Falagas *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2007). Assim, qualquer variação que promova a diminuição de *Lactobacillus* e/ou alteração na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> propicia a proliferação das bactérias anaeróbias e, conseqüentemente, o desenvolvimento de VB.

Embora espécies de *Lactobacillus* sejam associadas à flora vaginal normal, estudos recentes revelaram que *Lactobacillus iners* também predominam na flora vaginal de mulheres com VB, refutando a primeira hipótese que defendia que estes pertenciam à flora vaginal normal (Menard *et al.*, 2010; Zozaya-Hinchliffe *et al.*, 2010).

## Flora Vaginal em mulheres saudáveis

A flora vaginal de mulheres saudáveis é dominada por *Lactobacillus* spp., que são capazes de produzir bacteriocinas,  $H_2O_2$  e ácidos orgânicos. Os *Lactobacillus*, produtores de  $H_2O_2$ , estão presentes em cerca de 96% de mulheres saudáveis e 6% das pacientes com VB, enquanto os não produtores de  $H_2O_2$  estão presentes em apenas 4% das mulheres saudáveis e 36% das pacientes com VB (Livengood, 2009).



**Figura 1.1** Proteção natural da vagina.

Alguns estudos demonstraram que *G. vaginalis* também faz parte do trato genital de mulheres saudáveis (Hyman *et al.*, 2005; Diao *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2014). No entanto, a quantidade de *G. vaginalis* isolada a partir do epitélio vaginal de mulheres saudáveis é mais baixa do que os números encontrados em mulheres com VB (Swidsinski *et al.*, 2005; Menard *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2014).

## Fatores envolvidos na colonização do epitélio vaginal

Vários fatores estão envolvidos na colonização do epitélio vaginal por *Lactobacillus*, nomeadamente as alterações hormonais, como o estrogénio, o conteúdo de glicogénio e também o pH da vagina que podem influenciar a adesão dos microrganismos às células epiteliais (Cribby *et al.*, 2008). O aumento específico de estrogénio, durante o ciclo menstrual, aumenta a colonização destes microrganismos. Em mulheres em fase reprodutiva, o estrogénio faz com que o epitélio vaginal se torne maduro e se diferencie em células superficiais ricas em

glicogénio (Murta *et al.*, 2005; Cribby *et al.*, 2008). Este glicogénio é metabolizado em ácido láctico, que, juntamente com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e bacteriocinas, conferem a proteção natural da vagina (Murta *et al.*, 2005; Cribby *et al.*, 2008).

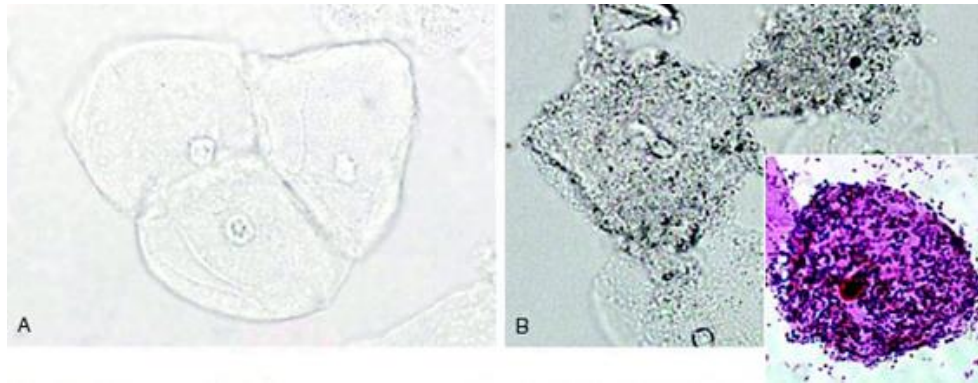
Durante a menopausa, ocorre a diminuição dos níveis de estrogénio, resultando numa menor quantidade de *Lactobacillus* presentes no trato vaginal (Cribby *et al.*, 2008). Mulheres pós-menopáusicas são mais suscetíveis a infeções vaginais sendo colonizadas por microrganismos, como *G. vaginalis* e *Atopobium vaginae*, podendo a colonização por *Lactobacillus* spp. restaurar a microflora normal (Burton *et al.*, 2002; Cribby *et al.*, 2008). No entanto, a flora vaginal de mulheres saudáveis na pré-menopausa também é suscetível à infeção mas, neste caso, é colonizada em particular por espécies de *Lactobacillus*, como *L. casei*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners*, *L. jenesennii*, *L. plantarum*, *L. Rhamnous*, *L. reuteri* e *L. salivarius* (Cribby *et al.*, 2008).

### **Os sintomas associados à vaginose bacteriana**

Vários sintomas e sinais clínicos relacionados com a alteração microbiana da microflora vaginal, podem ser associados e enumerados, tais como:

- 1) corrimento vaginal branco-acinzentado, fino e homogéneo, que reveste as paredes da vagina;
- 2) elevação do pH vaginal > 4.5;
- 3) odor intenso a peixe mediante a adição de hidróxido de potássio (KOH) a 10%;
- 4) presença de *clue cells* no exame microscópico a fresco (Morris *et al.*, 2001; Livengood, 2009)

Gardner e Dukes (1955) mostraram a importância das *clue cells* no diagnóstico da VB. Na verdade, estas células são células epiteliais escamosas cujas superfícies são fortemente cobertas com bactérias (**Figura 1.2**) (Swidsinski *et al.*, 2005). No entanto, cerca de 50% das pacientes não apresentam sintomas e, nesses casos, o diagnóstico não poderia ser feito com base neste perfil clínico (Verstraelen *et al.*, 2009).



**Figura 1.2** A. Células Epiteliais da microflora vaginal saudável; B. *Clue Cells* cobertas por bactérias.

(Shivadas, 2014)

### **Complicações associadas à vaginose bacteriana**

Ao longo dos últimos 50 anos, foram realizados vários estudos a fim de compreender a etiologia da VB. A doença apresenta-se muitas vezes na forma assintomática, contudo, vários estudos epidemiológicos têm determinado que as comunidades microbianas vaginais relacionadas com a VB estão significativamente associadas a um risco aumentado de complicações infecciosas, como parto prematuro, baixo peso ao nascer, aborto pós-endometrite, endometrite pós-parto, septicemia pós-cirúrgica, aquisição de doenças sexualmente transmissíveis, incluindo o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Sobel *et al.*, 2000; Wiesenfeld *et al.*, 2003; Srinivasan and Fredricks, 2008; Menard *et al.*, 2012), corioamnionite, doença inflamatória pélvica e cervicite (Sweet *et al.*, 2000; Ugwumadu, 2002) porém a sua correlação ainda é incerta devido à sua complexidade e à ausência de um modelo animal onde possa ser aplicada.

Na verdade, as mulheres que dão à luz prematuramente estão mais predispostos a ter uma infecção do trato superior, demonstrado pela análise do líquido amniótico, membranas fetais ou placenta (Gillet *et al.*, 2011). Alguns estudos também referem que a modificação do ecossistema vaginal pode também aumentar o risco para a aquisição do vírus do papiloma humano - a infecção por HPV, que pode ser explicado por uma redução dos níveis de leucócitos específicos envolvidos no HIV (Castellsague *et al.*, 2008; Koshiol *et al.*, 2008). Além disso, o fluido vaginal de mulheres com VB apresenta enzimas, como sialidases, associadas à degradação da camada do epitélio cervical, causando a alteração de células epiteliais e por

consequente maior predisposição para a aquisição de HPV. Contudo, esta relação ainda é foco de estudos (Gillet *et al.*, 2011).

A presença de VB também aumenta o risco de transmissão do HIV de mulheres para homens ou para outras mulheres (Koumans *et al.*, 2002; Eschenbach, 2007), bem como a susceptibilidade a outras doenças sexualmente transmissíveis (Larsson *et al.*, 2005; Srinivasan and Fredricks, 2008; Menard *et al.*, 2012).

### **Epidemiologia da VB**

Vários estudos mostraram que alguns fatores aumentam a predisposição para aquisição da VB, nomeadamente características étnicas (Cherpes *et al.*, 2008; Fethers *et al.*, 2011). Outros fatores de risco incluem baixa posição socioeconómica, múltiplos parceiros sexuais, idade precoce da primeira relação sexual, o uso de dispositivos intra-uterinos, tratamento com antibióticos de largo espectro, diminuição de *Lactobacillus* (Cherpes *et al.*, 2008; Fethers *et al.*, 2011; Ravel *et al.*, 2011; Turovskiy *et al.*, 2011). No entanto, relativamente aos aspetos socioeconómicos, um estudo recente identificou o mesmo perfil de microrganismos associados à flora vaginal em mulheres que viviam em países industrializados, bem como em mulheres que vivem em países pobres (Pepin *et al.*, 2011) O duche vaginal é um fator de risco frequentemente associado à VB (Cherpes *et al.*, 2008; Fethers *et al.*, 2011), contudo, ainda não foi possível concluir com certeza se se trata da causa ou se as mulheres o usam para aliviar os sintomas. A VB está também associada a mulheres que têm um novo parceiro sexual ou até mesmo múltiplos parceiros, no entanto, mulheres que nunca tiveram relações sexuais também são afetadas (Neto, 2011).

Um estudo de Burton *et al.* (2002) demonstrou que a microflora vaginal de mulheres na pós-menopausa é muitas vezes "anormal" por ser composta por organismos potencialmente patogénicos.

Larsson *et al.* (2007) relataram que o hábito de fumar aumenta a predisposição das mulheres para adquirir VB, por um declínio de *Lactobacillus*.

## O diagnóstico clínico e laboratorial da vaginose bacteriana

A VB é diagnosticada clinicamente de diversas formas, dependendo da disponibilidade de métodos, custo e experiência do clínico (Anukam *et al.*, 2007).

O teste de Papanicolau é um dos testes mais comuns. Neste procedimento, o médico insere um espéculo na vagina da paciente e, em seguida, retira uma amostra do colo do útero para análise citológica. O exame citológico melhora o diagnóstico de infecções do colo do útero, muito comum em mulheres em idade reprodutiva (Bukhari *et al.*, 2012). No entanto, alguns estudos revelaram que o Papanicolau não é um teste muito útil e robusto para o diagnóstico da VB, pois, normalmente, utiliza *clue cells* como único critério, excluindo outros aspetos clínicos associados à VB (Greene *et al.*, 2000). Além disso, a amostra é recolhida do colo do útero, em vez de ser removida da vagina.

De forma a obter uma maior homogeneidade nos diagnósticos, foram propostos alguns critérios que incluem dados clínicos e laboratoriais ou apenas dados microbiológicos.

Os critérios de Amsel (Amsel *et al.*, 1983) e de Nugent (Nugent *et al.*, 1991), continuam a ser os testes mais utilizados para diagnosticar a VB. No entanto, estes são limitados pois não identificam os microrganismos patogénicos (Cook *et al.*, 1992; Smayevsky *et al.*, 2001).

Nos critérios descritos por Amsel *et al.*, (1983), a VB é diagnosticada quando pelo menos três dos testes descritos a seguir são positivos: o pH vaginal, realizado com fita reagente específica, se encontrar maior que 4,5 após cerca de um minuto em contato com o conteúdo vaginal; se o aspeto do corrimento for homogéneo, podendo apresentar cor variada (branca, cinzenta ou amarela); positividade do teste das aminas (*whiff test*) com odor intenso a peixe após a adição de duas gotas de KOH a 10% ao conteúdo vaginal; a presença de 20% ou mais de células epiteliais superficiais recobertas por cocobacilos (*clue cells*) no exame bacterioscópico a fresco ou esfregaço do corrimento vaginal, corado pelo método de Gram.

O critério desenvolvido por Nugent, Krohn e Hillier em 1991 consiste na coloração pelo método de Gram do esfregaço do corrimento vaginal, com contagem dos morfotipos de *Lactobacillus* (bacilos longos Gram positivos), *G. vaginalis* e Bacteróides (cocobacilos Gram negativos ou Gram variáveis) e de *Mobiluncus* spp. (bacilos curvos Gram negativos) existentes. Cada morfotipo é pontuado de 0 a 4 de acordo com o número/campo e somados. Considera-se a VB com uma pontuação 7 ou acima de 7. Uma pontuação de 4 a 6 é considerada intermédia, e uma pontuação de 0 a 3 é considerada normal (**Tabela 1.1**).

**Tabela 1.1** Critério de classificação de *Nugent* para o diagnóstico de vaginose bacteriana(Adaptado de: Chaijareenont *et al.*, 2004)

Pontuação	Número de morfotipos por campo		
	<i>Lactobacillus</i>	<i>Gardnerella/ Bacteróides</i>	<i>Mobiluncus</i>
<b>0</b>	>30	0	0
<b>1</b>	5-30	<1	1-5
<b>2</b>	1-4	1-4	>5
<b>3</b>	<1	5-30	
<b>4</b>	0	>30	

### Terapias atuais de tratamento da VB

O tratamento e controlo da VB têm como finalidade restaurar o equilíbrio da microflora vaginal, através da diminuição do número de bactérias anaeróbias e um possível aumento dos *Lactobacillus* (Giraldo *et al.*, 2007).

Os derivados imidazólicos, como o metronidazol, são agentes antimicrobianos geralmente considerados como a primeira opção terapêutica para tratar VB. Descoberto em 1957, o metronidazol não é muito ativo contra *G. vaginalis*, mas é bastante eficaz contra as bactérias anaeróbias que atuam sinergicamente com a VB. Além disso, tem sido considerado o medicamento de escolha para pacientes não grávidas, na dose de 500 mg - 2x ao dia ou 250 - 3x ao dia, durante 7 dias (Camargo, 2004).

O metronidazol pode ser administrado por via oral, intravenosa, intravaginal e formulação tópica (Lofmark *et al.*, 2010). Turovskiy *et al.* (2011) defendem que, após a administração de metronidazol, a concentração de DNA de *G. vaginalis* diminuirá e a concentração de DNA de *L. crispatus* irá aumentar. No entanto, pacientes recorrentes de VB mostraram níveis de DNA de *G. vaginalis* aumentados, mesmo após o tratamento com metronidazol (Turovskiy *et al.*, 2011).

O metronidazol atravessa a barreira placentária e é excretado no leite materno, sendo por isso contra-indicado para mulheres grávidas (Silva *et al.*, 2000). Uma alternativa seria a ampicilina, que é considerada eficaz na dose de 500 mg 4x ao dia, durante 7 dias e pode ser uma opção para mulheres grávidas até ao primeiro trimestre da gravidez.

A administração de clindamicina é uma alternativa segura para o controlo da VB, pois apresenta boa atividade contra bactérias anaeróbias, apresentando resultados semelhantes ao do metronidazol (Koumans *et al.*, 2002).



De facto, a resistência ao metronidazol foi observada em algumas estirpes de *G. vaginalis* e pode ser explicada pela deleção ou inativação de genes com atividade de nitro-reductase, que faz com que a resistência ao metronidazol aumente (Kharsany *et al.*, 1993). A associação de *A. vaginae* e *G. vaginalis* em casos de VB aumenta a taxa de recorrência da doença após o tratamento com metronidazol (De Backer *et al.*, 2010). No entanto, *Lactobacillus* spp. são resistentes ao metronidazol e foi demonstrado que o tratamento com metronidazol melhora a recolonização da flora vaginal com *Lactobacillus* (De Backer *et al.*, 2006). Por outro lado, a clindamicina tem uma atividade mais elevada contra *G. vaginalis* e *A. vaginae*, no entanto, pode causar a extinção de *Lactobacillus* da flora bacteriana normal (De Backer *et al.*, 2006).

Os probióticos são uma alternativa para o uso de antibióticos na reposição da flora vaginal (Zaraté and Nader-Macias, 2006; Cribby *et al.*, 2008). A Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas classifica os probióticos como "microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro, quando administrados em quantidades adequadas" (Jones and Versalovic, 2009).

Vários estudos *in vitro* mostraram que determinadas estirpes de *Lactobacillus* podem atuar como probióticos, estabelecendo-se como uma alternativa viável para restaurar a flora normal, inibindo o crescimento de bactérias causadoras de VB (Burton *et al.*, 2002). Estudos clínicos sugerem que a administração oral de *L. acidophilus*, ou a administração intravaginal de *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* GR-1, *L. fermentum* RC-14, é capaz de aumentar o número de *Lactobacillus* vaginais, restaurar a microflora vaginal e levar a uma melhoria nas mulheres tratadas com probióticos, defendendo, alguns estudos, que estes inibem a colonização por microrganismos tais como *Escherichia coli*, *G. vaginalis*, *Candida albicans* e *Pseudomonas aeruginosa* (Reid, 2001; Zaraté and Nader-Macias, 2006; Cribby *et al.*, 2008; Dover *et al.*, 2008).

### **Caraterísticas da *Gardnerella vaginalis***

*G. vaginalis* pertence à família *Bifidobacteriaceae* e é o organismo mais relevante associado à VB (Aroutcheva *et al.*, 2001).

*G. vaginalis*, é uma bactéria anaeróbia facultativa, imóvel, observada sob a forma de cocobacilos Gram-variáveis, que quando corada pela técnica de Papanicolau apresenta cor azul.

Esta bactéria pode estar aderida à superfície das células escamosas de forma parcial ou total (*clue cells*) e apresenta como principal sinal clínico a secreção vaginal abundante, de cor acinzentada, odor fétido, especialmente a pH superior a 4,5 (elevado) (Conrado *et al.*, 2010)

A VB é a doença mais comum causada por *G. vaginalis*, no entanto, pode causar doenças mais graves como bacteriemias e meningites (Smith *et al.*, 1992). Trata-se de uma bactéria fastidiosa, que necessita de meios ricos para o isolamento, como o ágar Columbia, que contém biotina, ácido fólico, niacina e tiamina, ou ainda o ágar Chocolate, com incubação de 48 horas a 37°C e em atmosfera rica em CO<sub>2</sub>. As suas colónias são pequenas (cerca de 0,5 mm), opacas e β-hemolíticas. Hemolisam o sangue humano, mas não o de carneiro (Silva *et al.*, 2006). Entre as principais características bioquímicas, destacam-se oxidase (-), catalase (-), hidrólise do hipurato (+), produção de ácido a partir de glicose, inositol (-), manitol (-) e rhamnose (-).

*G. vaginalis* coloniza preferencialmente o trato genital feminino. O facto deve-se a duas razões: o líquido seminal contém altas concentrações de zinco, que pode inibir a bactéria, e o epitélio prostático contém células colunares, que dificultam a adesão da *G. vaginalis* (Smith *et al.*, 1992).

Uma característica relevante da *G. vaginalis* é apresentar reação ao Gram-variável. O facto ocorre devido à fina camada de peptidoglicano que apresenta, constituindo apenas 20% do peso da parede celular, semelhante aos 23% encontrados em *Escherichia coli* e muito menor que a percentagem observada em estafilococos, estreptococos e lactobacilos. Consequentemente, vários isolados da *G. vaginalis* podem aparecer como Gram-positivos, Gram-negativos ou Gram-variáveis. Apesar da delgada camada de peptidoglicano, a parede celular das bactérias não contém compostos normalmente encontrados nas bactérias Gram-negativas, como ácidos micólicos e galactanas (Winn *et al.*, 2006).

## Fatores de virulência da *G. vaginalis*

### A formação de biofilme

*G. vaginalis* tem a capacidade de formar um biofilme aderente à mucosa vaginal de mulheres com VB (Alves *et al.*, 2014). A sua capacidade de agregação é considerada um fator de virulência que aumenta a aderência bacteriana às superfícies epiteliais. A agregação de bactérias em monocamada impede o acesso dos agentes antimicrobianos contra os mesmos, e confere resistência às defesas imunológicas do hospedeiro (Patterson *et al.*, 2007; Swidsinski *et al.*, 2008; Patterson *et al.*, 2010). A formação de biofilme aumenta a resistência aos derivados de bactérias, tais como o ácido láctico e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e suprimem o crescimento de anaeróbios tais como *G. vaginalis* (Patterson *et al.*, 2007). Como as bactérias de biofilme não são eficazmente eliminadas pelo sistema imune do hospedeiro, ou por antibióticos, as infecções relacionadas com biofilme tendem a ser crônicas e/ou recorrentes.

### Hemolisina

*G. vaginalis* é capaz de produzir hemolisina como fator de virulência. Trata-se de uma toxina que provoca a lise dos eritrócitos *in vitro* (Cauci *et al.*, 1996). A produção de hemolisina por *G. vaginalis* poderá estar associada à alteração de células epiteliais, formando as chamadas *clue cells* (Cauci *et al.*, 1996). A elevação dos níveis de imunoglobulina no fluido vaginal de muitos pacientes com VB pode estar associada à produção de uma proteína semelhante à perforina (Cauci *et al.*, 1996).

### Vaginolisina

*G. vaginalis* também produz a toxina vaginolisina, pertencente à família de toxinas colesterol-dependente que aumenta a disponibilidade dos conteúdos celulares, como substrato para o crescimento bacteriano (Nugent *et al.*, 1991; Gelber *et al.*, 2008). Esta toxina é uma proteína formadora de poros, que lisa os glóbulos vermelhos humanos e células epiteliais vaginais.

Alves *et al.* (2014) testaram diversos microrganismos anaeróbios associados à VB e apenas *G. vaginalis* apresentou uma forte aderência às células epiteliais vaginais, elevada citotoxicidade, e mostrou-se propensa para a formação de um biofilme denso, sendo que estes resultados sugerem que *G. vaginalis* assume um papel fundamental na patogenia da VB. A sialidase e prolidase são fatores de virulência adicionais produzidos por *G. vaginalis*, duas enzimas hidrolíticas que podem assumir um papel importante na degradação de diversos fatores de proteção de mucosas, tais como mucinas, para além de contribuírem para a esfoliação e descolamento de células epiteliais vaginais (Patterson *et al.*, 2010).

### **Métodos moleculares utilizados no estudo da vaginose bacteriana**

Ao longo das últimas décadas, várias técnicas de biologia molecular têm vindo a ganhar importância como métodos de diagnóstico moderno em microbiologia, sendo utilizadas para determinar a diversidade filogenética dos microrganismos encontrados no ecossistema vaginal (Fredricks *et al.*, 2005; Hyman *et al.*, 2005; Fredricks *et al.*, 2007; Oakley *et al.*, 2008), demonstrando ser uma forma rápida e fiável para identificação de microrganismos, ultrapassando a caracterização convencional com base em testes de cultura.

### **Aplicação de técnicas moleculares no diagnóstico da vaginose bacteriana**

Nos últimos anos têm vindo a ser desenvolvidas técnicas moleculares com o objetivo de melhorar o diagnóstico da VB, tais como a reação de polimerização em cadeia (PCR) ou Hibridização Fluorescente *in situ* utilizando sondas de Ácido Nucleico Peptídico (PNA-FISH). Estes métodos, além de serem altamente sensíveis, oferecem resultados específicos em apenas algumas horas (Swidsinski *et al.*, 2011), permitindo a utilização de tipos de amostras menos invasivas, nomeadamente os esfregaços vaginais, que são menos sensíveis aos métodos de cultura (McKechnie *et al.*, 2009).

### **PNA-FISH**

O método de FISH é utilizado para identificar e quantificar microrganismos numa ampla variedade de amostras. Esta técnica combina a simplicidade da observação microscópica e a

especificidade de hibridização do DNA / rRNA, permitindo a detecção de espécies bacterianas selecionadas e visualização morfológica (Nath *et al.*, 2000; Justé *et al.*, 2008). Hoje em dia, utilizam-se muitas vezes sondas de PNA em vez de DNA, com o intuito de melhorar a eficiência do FISH, pois permitem a hibridação mais rápida e mais específica (Isacsson *et al.*, 2000; Rigby *et al.*, 2002; Stender *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2002; Demidov, 2003; Wilson *et al.*, 2005; Lefmann *et al.*, 2006; Peleg *et al.*, 2009).

Machado *et al.* (2013) avaliaram o desempenho PNA-FISH em diferentes amostras usando uma abordagem multiplex para detetar *Lactobacillus* spp. e *G. vaginalis*. Este método detetou com precisão em amostras mistas, *Lactobacillus* spp. e *G. vaginalis*, permitindo desta forma uma avaliação eficiente dos dois grupos de bactérias mais frequentemente encontradas na microflora vaginal.

### **Reação de polimerização em cadeia (PCR)**

A PCR é considerada um teste direto que consiste na amplificação de ácidos nucleicos e é comumente usado em laboratórios de pesquisa médica e biológica para muitas aplicações.

Qualquer teste de diagnóstico que envolva um método molecular de amplificação, como a PCR, inclui uma etapa de extração de material genético de amostras biológicas, seguido de amplificação de um segmento selecionado e posterior detecção dos fragmentos amplificados durante o processo.

A PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) é a última inovação tecnológica resultante da PCR, que combina a metodologia de PCR e um sistema de detecção e quantificação de fluorescência produzida durante os ciclos de amplificação. A metodologia permite a amplificação, detecção e quantificação de material genético numa única etapa, apresentando os resultados de forma mais precisa e rápida e minimizando o risco recorrente de possíveis contaminações (Mackay *et al.*, 2004). A possibilidade de monitorizar, ao longo da reação, a quantidade de produto formada em cada ciclo de amplificação e de quantificar este produto durante a sua fase ótima de formação, confere maior precisão e reprodutibilidade à qRT-PCR quando comparada com a PCR convencional, que apresenta somente resultados qualitativos.

Lambert *et al.* (2013) recorreram ao qRT-PCR, com o intuito de caracterizar de forma aprofundada a microflora vaginal de mulheres saudáveis ou mulheres que já tiveram VB e que foram sujeitas a tratamento. Neste estudo, o qRT-PCR foi usado com o objetivo de bloquear a

amplificação de *Lactobacillus*, por forma a detetar mais facilmente outros microrganismos presentes na microflora vaginal de mulheres saudáveis.

### PCR-DGGE

A combinação de PCR e eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE), permite a deteção de um grande número de espécies bacterianas nos ecossistemas complexos do corpo humano (Burton *et al.*, 2002; Diao *et al.*, 2011).

A técnica de PCR-DGGE é frequentemente utilizada para o estudo das variações da diversidade genética de comunidades microbianas. A análise envolve um passo de amplificação de uma secção de um determinado gene (filogenético ou funcional) utilizando *primers* que são fragmentos de DNA complementares a regiões conservativas e também variáveis desses genes, de forma a permitir a amplificação dos genes alvo totais presentes na comunidade mas também a distinção entre fragmentos amplificados provenientes de diferentes organismos. Os fragmentos assim obtidos são posteriormente separados por DGGE (**Figura 1.3**)

DGGE é um método eletroforético utilizado para separar cadeias duplas de DNA do mesmo tamanho mas com diferentes conteúdos de guanina (G)+ citosina (C) (%). O método explora a diferença de estabilidade das ligações G-C, constituídas por três ligações hidrogénio, relativamente às ligações adenina (A) - timina (T), estabelecidas por duas ligações hidrogénio, e, como tal, mais fracas. A eletroforese é efetuada em gel de acrilamida que apresenta um gradiente linear crescente de ureia e formamida capaz de desnaturar a dupla hélice do DNA. Os fragmentos com maior conteúdo de GC serão mais estáveis e permanecerão em cadeia dupla até concentrações mais elevadas de desnaturante. As cadeias duplas vão migrar melhor no gel do que as moléculas de DNA desnaturadas, que, ao abrirem, se tornam maiores, abrandam e acabam por parar no gel. A separação completa da cadeia de DNA é impedida pela presença de um domínio de fusão elevado criado artificialmente numa extremidade da molécula pela incorporação de um gancho composto por nucleótidos GC (*GC-clamp*), que nunca desnatura nas condições escolhidas para a eletroforese. Esta incorporação é efetuada durante a amplificação de PCR através da utilização de um *primer* com uma extremidade 5' que consiste numa sequência de nucleótidos GC.

A imagem final do gel corresponderá a um padrão de códigos de barra, em que cada barra representa um fragmento com uma determinada sequência de nucleótidos, referente a um indivíduo da comunidade em estudo.

Anukam *et al.* (2007) identificaram quais os microrganismos presentes na vagina de mulheres nigerianas HIV-negativo diagnosticadas com VB, recorrendo à técnica de PCR-DGGE, com posterior sequenciação dos genes que codificam para o 16S rRNA. O estudo revelou que mais de 90% das amostras foram colonizados por mais do que um organismo, por análise dos perfis de DGGE. *Mycoplasma hominis* foi o microrganismo mais comum, sugerindo ser mais predominante na flora vaginal de mulheres nigerianas do que caucasianas.

Diao *et al.* (2011) caracterizaram as diferentes estruturas observadas em comunidades microbianas, quer de mulheres saudáveis quer de mulheres com VB, em idade reprodutiva, recorrendo ao DGGE. Os resultados evidenciaram a diversidade microbiana da flora vaginal de mulheres com VB, e demonstraram que a presença de *G. vaginalis* não é indicativa de doença, por ter sido detetada também em amostras de mulheres saudáveis.

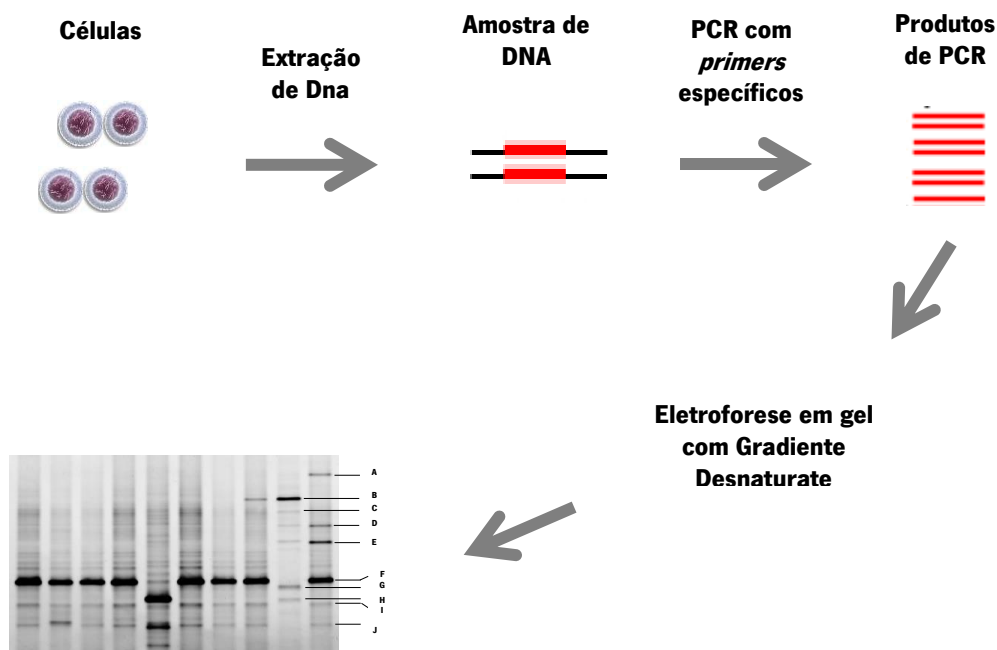


Figura 1.3 Conceito da técnica de PCR-DGGE.

# **CAPÍTULO 2**

---

## **Materiais e Métodos**





## **Materiais e Métodos**

### **Amostras vaginais**

Foram utilizadas 38 amostras vaginais de mulheres VB-positivas (17) e VB-negativas (21), previamente caracterizadas para a presença de *G. vaginalis* (Silva *et al.*, 2014). Todas as amostras de exsudado vaginal foram recolhidas com uma zaragatoa com consentimento informado das participantes. A diversidade da comunidade bacteriana presente nestas amostras foi estudada com base no gene que codifica para a subunidade pequena do ribossoma (16S rRNA). Para tal, procedeu-se à extração de DNA genómico de cada uma das amostras e posterior amplificação do gene que codifica para o 16S rRNA usando *primers* específicos. A diversidade foi estimada pela combinação das técnicas de PCR e DGGE.

### **Extração de DNA**

O DNA das amostras microbianas foi extraído recorrendo ao *GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit* (Vivantis *Technologies Sdn Bhd*) e seguindo as recomendações do fabricante.

Brevemente, as amostras foram centrifugadas e o *pellet* foi ressuspedido em tampão, de seguida foram tratadas com lisozima e incubadas. A proteinase K foi adicionada após centrifugação, as amostras foram incubadas novamente e foram adicionados 2 volumes de *buffer* BG. O DNA foi precipitado pela adição de etanol absoluto e as amostras foram transferidas para novos tubos com colunas; após centrifugação as colunas foram lavadas com *wash buffer*, centrifugadas novamente e transferidas para novos tubos; o DNA das diferentes amostras foi eluído pela adição do *elution buffer* e guardadas a 4°C. A concentração e a pureza do DNA das amostras foram determinadas espectrofotometricamente usando o nanodrop (*NanoDrop Technologies, USA*).

### **Identificação das amostras biológicas**

Na **Tabela 2.1** encontram-se identificadas as amostras vaginais utilizadas neste trabalho.

**Tabela 2.1** Identificação das amostras vaginais.  
(Informação detalhada em Salgueiro, 2012)

<b>Amostra</b>	<b>Vaginose Bacteriana</b>
<i>MM9</i>	+
<i>MM10</i>	+
<i>MM12</i>	+
<i>MM18</i>	+
<i>MM19</i>	+
<i>SH7</i>	+
<i>SH10</i>	+
<i>SH22</i>	-
<i>SH30</i>	+
<i>SH33</i>	-
<i>SH41</i>	-
<i>SH51</i>	+
<i>SH52</i>	-
SH53	-
SH54	-
SH58	-
SH60	-
SH62	-
SH63	-
SH71	+
SH79	+
SH80	+
SH90	-
SH92	+
SH110	-
SH120	-
SH133	-
SH141	-
SH160	-
SH180	-
SH192	-
SH200R	-
SH203	+
SH210	-
SH222	+
SH248	-
SH254	+
TR1	+

**Legenda:** Positivo (+); Negativo (-).

## Amplificação de ácidos nucleicos por Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

A mistura para PCR foi preparada para n+1 reações, sendo n o número total de reações necessárias.

Para cada reação de PCR, com um volume total de 50µl, foram adicionados 19.3 µl de água ultrapura autoclavada, 27.7µl de Mix 2x concentrada (Dyennzyme II PCR Mix, Finnenzymes), 1µl de iniciador *forward* e 1µl de iniciador *reverse* numa concentração de 10µM, e 1µl de DNA da amostra. O controlo negativo consistiu na mistura de PCR sem DNA adicionado, enquanto que no controlo positivo se adicionou DNA amplificável com os *primers* utilizados. Foram utilizados *primers* específicos para amplificação de diferentes grupos de microrganismos. As condições de amplificação para cada par de *primers*, bem como a sequência de cada *primer*, estão descritas na **Tabela 2.2**.

Para amplificação do fragmento de DNA de *Bacteria*, foi seguido o procedimento descrito por Vitali *et al.* (2012) que consiste numa reação de PCR com os *primers* HDA1 e HDA2. As amostras foram amplificadas num termociclador (MINI MJ, Biorad) programado com o seguinte protocolo de PCR: fase de desnaturação inicial a 95 ° C durante 5 min.; 30 ciclos de desnaturação a 95 ° C durante 30 s., seguido de hibridização (*annealing*) a 56°C durante 30 s. e extensão a 72 ° C durante 1 min.. A extensão final ocorreu a 72 ° C durante 8 min., seguida de um arrefecimento a 4 ° C.

Por sua vez, o fragmento de DNA de *G. vaginalis*, foi amplificado seguindo o procedimento descrito por Henriques *et al.* (2012) que consiste numa reação de PCR com os *primers* Gard-FwDGGE e GvDGGE-Rv. As amostras foram amplificadas com o seguinte protocolo de PCR: fase de desnaturação inicial a 94 ° C durante 2 min.; 40 ciclos de desnaturação a 94 ° C durante 30 s., seguido de *annealing* a 64°C durante 30 s. e extensão a 72 ° C durante 1 min.. A extensão final ocorreu a 72 ° C durante 5 min., seguida de um arrefecimento a 4 ° C. A Ta para *G. vaginalis* usada por Henriques *et al.* (2012) foi 62°C, contudo foi necessário otimizar essa temperatura devido à adição de uma cauda de 40 pb composta unicamente por nucleótidos GC na extremidade 5' da sequência (GC-*clamp*). Para isso, foi utilizado um gradiente de temperaturas, que consistiu na variação da Ta entre 60 e 65°C, tendo sido verificada uma melhor amplificação a 64°C.

**Tabela 2.2** Pares de *primers* utilizados para amplificação do gene que codifica para o 16S rRNA, respetiva sequência (5'-3') e condições de amplificação.

Grupo Alvo	Forward primer	Sequência (5'-3')	Reverse primer	Sequência (5'-3')	Temperatura de annealing (Ta)(°C)	Referência
<b>Bacteria</b>	HDA1	GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C	HDA2	( <sup>3'</sup> )AC TCC TAC GGG AGG CAG CAG T	56	Vitali <i>et al.</i> (2012)
<b>Bifidobacterium</b>	Im26-f	GAT TCT GGC TCA GGA TGA ACG	Im3-r	CGG GTG CTX CCC ACT TTC ATG	55	Lamendella <i>et al.</i> (2008)
	Bif164-f	GGG TGG TAA TGC CGG ATG	Bif662-GCr	( <sup>3'</sup> )CCA CCG TTA CAC CGG GAA	62	
<b>Lactobacillus spp.</b>	Bact27-f	GTT TGA TCC TGG CTC AG	Lab677-r	CAC CGC TAC ACA TGG AG	66	Martín <i>et al.</i> (2007)
	Lab159-f	GGA AAC AGR TGC TAA TAC CG	Univ515-GCr	( <sup>3'</sup> )ATC GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA C	56	
<b>Gardnerella vaginalis</b>	Gard-FwDGGE	CT CTT GGA AAC GGG TGG TAA	GvDGGE-Rv	( <sup>3'</sup> )TTG CTC CCA ATC AAA AGC GGT	64	Henriques <i>et al.</i> (2012)
	GC-clamp	CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G ( <sup>3'</sup> )				

Com o objetivo de aumentar a quantidade de produto amplificado final e, simultaneamente, aumentar a sensibilidade da técnica de PCR, recorreu-se ao *Nested* PCR para amplificação do fragmento de DNA de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium*. Esta variação da técnica básica de PCR requer dois pares de *primers*, um par mais externo para a primeira reação e outro interno ao produto da primeira reação. A primeira reação necessita de um maior tempo de extensão devido ao maior tamanho do produto a ser amplificado, em seguida adiciona-se uma alíquota da primeira reação, que servirá de DNA molde para a segunda reação. O produto da primeira reação normalmente não é detectado em corrida em gel de agarose, por outro lado o produto da segunda reação é gerado em grande quantidade e, por isso, pode ser visualizado na corrida eletroforética e utilizado para sequenciação.

Assim, para *Lactobacillus* spp., foi seguido o procedimento descrito por Martín *et al.* (2007), que envolveu uma primeira reação de PCR com os *primers* Bact27f e Lab-677r, seguida de uma segunda reação com os *primers* Lab159f e Univ515-GCr. As amostras foram amplificadas com o seguinte protocolo de PCR: fase de desnaturação inicial a 95 ° C durante 2 min.; 40 ciclos de desnaturação a 95 ° C durante 30 s., seguido de *annealing* durante 40 s. e extensão a 72 ° C durante 1 min.. A extensão final ocorreu a 72 ° C durante 5 min., seguida de um arrefecimento a 4 ° C. A Ta foi de 66°C e 56°C para os pares de *primers* Bact27f e Lab-677r e Lab159f e Univ515-GCr, respetivamente. Da mesma forma, a amplificação do fragmento de DNA de *Bifidobacterium* envolveu uma primeira reação de PCR com os *primers* Im26-f e Im3-r, seguida de uma segunda reação com os *primers* Bif164-f e Bif662-GCr, seguindo o seguinte protocolo de PCR: fase de desnaturação inicial a 94 ° C durante 5 min.; 35 ciclos de desnaturação a 94 ° C durante 20 s., seguido de *annealing* durante 20 s. e extensão a 72 ° C durante 30 s.. A extensão final ocorreu a 72 ° C durante 5 min., seguida de um arrefecimento a 4 ° C. A Ta foi de 55°C para os *primers* Im26-f e Im3-r e 62°C para os *primers* Bif164-f e Bif662-GCr. No final da reação o sucesso da amplificação foi verificado, correndo os produtos de PCR em gel de agarose, na concentração de 1,0% (w/v) e em tampão TAE 1x. A agarose foi pesada diretamente para um frasco *Schott* e adicionado o volume adequado de TAE 1x. A solução foi aquecida no micro-ondas até se tornar clara e, de seguida, foi deixada a arrefecer. Depois disso, foi adicionado um corante (MIDORI GREEN) para permitir a visualização dos fragmentos de DNA sobre luz UV. A agarose foi vertida para a forma, colocado o pente e arrefecida até polimerizar. Por fim, o pente foi removido e foi adicionado 1 µl de tampão de carga a 5µl de cada produto de reação de PCR. A eletroforese foi efetuada a 100 Volts durante 20 min. e a visualização dos

resultados foi efetuada usando o sistema *ChemiDoc*. O tamanho do fragmento esperado foi confirmado por comparação com um marcador de peso molecular (NZYDNA Ladder V, nzytech, Lisboa, Portugal).

Todos os *primers* usados foram sintetizados comercialmente pela Invitrogen™ (*Life Technologies*).

### **Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)**

A análise em DGGE foi realizada com o equipamento Dcode™ *Universal Mutation Detection System* (BIO-Rad, EUA). A preparação dos géis de DGGE bem como a eletroforese foram realizadas como descrito em Sousa *et al.* (2007). O gradiente do gel desnaturante foi ajustado de acordo com os fragmentos de DNA amplificados por PCR. Desta forma, para *Lactobacillus* spp. foi preparado um gel de poliacrilamida com um gradiente linear de desnaturantes de 30 a 50% (Martín *et al.*, 2007). Para *Bifidobacterium* foi usado um gradiente linear de desnaturantes de 45 a 55%, previamente testado por Martín *et al.* (2009) e para *Bacteria* (comunidades bacterianas totais) de 30 a 50%, (Vitali *et al.*, 2012), bem como para *G. vaginalis* (Burton *et al.*, 2003). A eletroforese foi realizada a uma temperatura de 60°C durante 16 horas, a 85 V em tampão TAE a 0,5 X. Os produtos de PCR com o mesmo peso molecular foram separados em DGGE conforme a sua composição em bases azotadas, sendo que fragmentos com composições diferentes aparecem como bandas diferentes no gel de DGGE.

Os géis foram revelados usando uma coloração de nitrato de prata de acordo com o procedimento previamente descrito por Sanguinetti *et al.* (1994). Todos os passos foram efetuados sobre agitação. Brevemente, os géis foram fixados usando 200 ml da solução de fixação 1X (**Tabela 2.3**) durante 3 min. e corados com solução de coloração durante 10 min.. De seguida, foram lavados com água destilada, transferidos para novos tabuleiros e foi adicionada a solução de revelação (**Tabela 2.3**); uma vez removida a solução de revelação, foi adicionada solução de fixação durante 5 min.. Por fim, os géis foram lavados com água destilada durante 2 min., colocados na solução de preservação durante 7 min. e posteriormente secados durante a noite a 60°C.

**Tabela 2.3** Composição das soluções a usar numa revelação com nitrato de prata.

Solução de fixação de Cairn 8X	200 ml de etanol a 96% 10 ml de ácido acético 40 ml de água destilada Adicionar 50 ml desta solução a 350 ml de água destilada para obter uma solução de fixação de Cairn 1X
Solução de coloração	Adicionar 0,4 g $\text{AgNO}_3$ a 200 ml de solução de fixação de Cairn 1X
Solução de revelação	1 espátula ( $\approx 10$ mg) de $\text{NaBH}_4$ 200 ml de 1,5 % de NaOH 600 $\mu\text{l}$ de formaldeído
Solução de preservação de Cairn	50 ml de etanol a 96% 20 ml de glicerol Perfazer 130 ml de água destilada

### **Análise dos géis de DGGE com o *software* Bionumerics**

Os géis de DGGE foram digitalizados e guardados em formato TIFF, com uma resolução de 400 dpi. Os géis foram normalizados utilizando o *software* BioNumerics™ (versão 5.0; Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Bélgica) e as amostras comparadas usando o coeficiente de similaridade de *Dice*.

Após efetuada a normalização, as bandas foram definidas para cada amostra usando o algoritmo de busca de bandas do programa, e os dendogramas foram gerados com base na densidade das bandas. A semelhança entre os perfis de DGGE foi determinada através do cálculo dos índices de similaridade das curvas densitométricas dos perfis, comparados usando a correlação de Dice.



Para determinar os índices de diversidade com base no índice de Shannon Wiener foram usadas as alturas de pico das curvas densitométricas, calculado como se segue:

$$H = - \sum (P_i \ln(P_i))$$

onde H é o índice de diversidade e  $P_i$  é a probabilidade da existência de banda ( $P_i = n_i / n$ , em que  $n_i$  é a altura de um pico individual e  $n$  é a soma de todas as alturas de pico das curvas densitométricas). Por fim, foram obtidos dendogramas e matrizes de similaridade que permitiram inferir sobre a similaridade entre as diferentes amostras.

# **CAPÍTULO 3**

---

## **Resultados e Discussão de resultados**



### **Resultados e discussão de resultados**

A diversidade bacteriana de 38 amostras vaginais de mulheres VB-positivas e VB-negativas foi comparada por PCR-DGGE. A presença de *G. vaginalis* nestas amostras foi previamente determinada por Silva *et al.* (2014), recorrendo ao método de FISH, utilizando uma sonda específica para *G. vaginalis*, previamente validada (Machado *et al.*, 2013). O DNA genómico foi submetido a amplificação, por PCR, do gene que codifica para o 16S rRNA, usando *primers* específicos para a identificação de microrganismos pertencentes aos seguintes grupos: *Bacteria*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* spp. e *G. vaginalis*, que são microrganismos normalmente presentes nas amostras clínicas, sendo que *Lactobacillus* spp. e *G. vaginalis* são frequentemente associados à microflora vaginal de mulheres VB-negativas e VB-positivas, respetivamente. No entanto, mesmo na situação reversa, quer *Lactobacillus* spp. e *G. vaginalis* também podem estar presentes, mas normalmente em quantidades muito inferiores (Hyman *et al.*, 2005; Swidsinski *et al.*, 2005; Menard *et al.*, 2008; Menard *et al.*, 2010; Zozaya-Hinchliffe *et al.*, 2010).

A **Tabela 3.1** mostra os resultados da concentração e pureza do DNA extraído das amostras vaginais.

De acordo com os resultados da amplificação por PCR, e tal como esperado, todas as amostras amplificaram com os *primers* específicos para *Bacteria*. Por sua vez, *Lactobacillus* spp. foram detetados em 33 amostras, sendo que 20 delas correspondem a amostras de mulheres VB-negativas e 13 a amostras de mulheres VB-positivas. Por outro lado, *G. vaginalis* foi detetada apenas em amostras de mulheres VB-positivas. Alguns estudos demonstraram que *G. vaginalis* também faz parte do trato genital de mulheres saudáveis (Hyman *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2014). No entanto, a quantidade de *G. vaginalis* isolada a partir do epitélio vaginal de mulheres saudáveis é mais baixa do que os números encontrados em mulheres com VB (Swidsinski *et al.*, 2005; Menard *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2014).

**Tabela 3.1** Concentração e pureza do DNA extraído das amostras vaginais.

Amostra clínica	ng/ $\mu$ l	260/280	260/230
MM9	23,4	1,9	0,07
MM10	10,1	2,23	0,04
MM12	6,2	2,63	0,02
MM18	12,7	2,38	0,02
MM19	20,8	2,35	0,04
SH7	9,8	1,82	0,04
SH10	15,5	1,99	0,04
SH30	9,8	1,73	0,03
SH51	8,8	1,62	0,01
SH71	8,9	1,70	0,02
SH79	10,5	1,66	0,06
SH80	9,9	2,30	0,01
SH92	14,8	1,62	0,03
SH203	10,9	3,03	0,02
SH222	13,0	2,43	0,02
SH254	5,9	1,68	0,01
TR1	4,2	2,16	0,02
SH22	14,9	1,59	0,15
SH33	12,6	1,68	0,14
SH41	11,8	2,16	0,13
SH52	14,2	2,28	0,13
SH53	50,2	1,85	0,34
SH54	29,3	2,03	0,10
SH58	18,4	1,74	0,24
SH60	30,3	1,64	0,14
SH62	19,5	1,37	0,14
SH63	13,7	2,30	0,02
SH90	37,6	1,62	0,14
SH110	45,1	2,16	0,15
SH120	9,6	1,57	0,11
SH133	19,6	1,8	0,06
SH141	61,2	1,52	0,16
SH160	29,5	1,58	0,14
SH180	8,6	1,89	0,05
SH192	32,9	1,57	0,07
SH200R	33,6	1,66	0,08
SH210	54,0	1,62	0,21
SH248	22,2	1,57	0,07

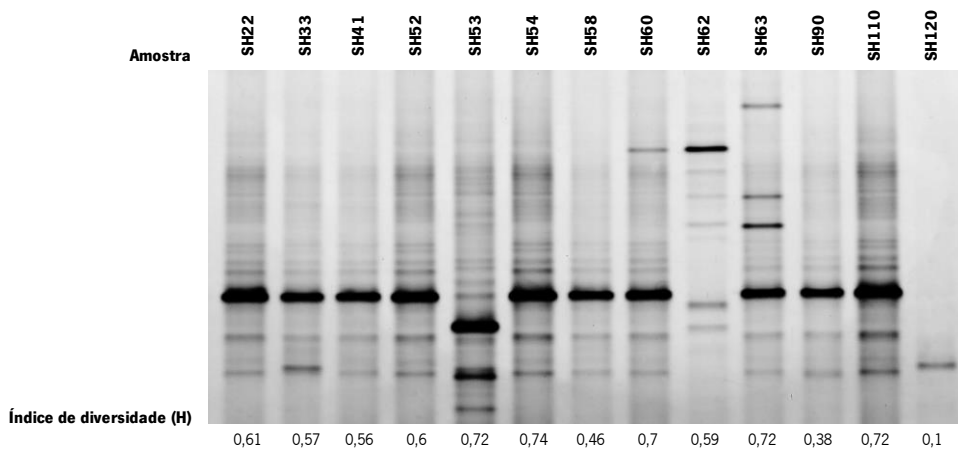
**Legenda:**Amostras VB+ ; Amostras VB- 

Devido a esta dualidade da presença de *G. vaginalis* quer em mulheres saudáveis quer em mulheres com VB, para uma primeira comparação das comunidades microbianas vaginais, decidiu-se excluir as amostras VB-negativas colonizadas com baixo número de *G. vaginalis*. Sendo que *G. vaginalis* está indicado como o agente com potencial de despoletar o desenvolvimento de VB (Aroutcheva *et al.*, 2001), foi possível, desta forma, caracterizar amostras

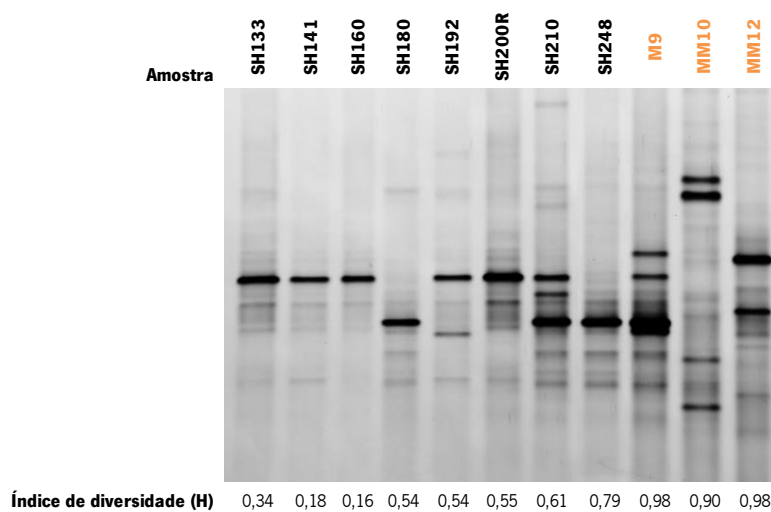
vaginais de mulheres saudáveis e sem risco de desenvolver VB, uma vez que não estavam colonizadas por *G. vaginalis*.

Relativamente aos microrganismos pertencentes ao género *Bifidobacterium*, foram detetados em todas as amostras de mulheres VB-positivas e apenas em 6 amostras de mulheres VB-negativas (**Tabela 3.2**).

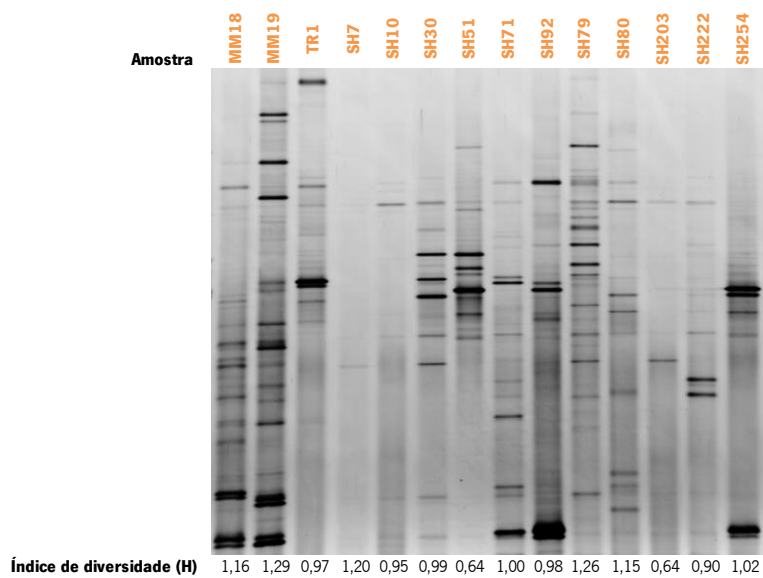
Nos perfis de DGGE obtidos para o domínio *Bacteria* (**Figuras 3.1, 3.2 e 3.3**) é possível visualizar bandas de intensidade mais elevada e outras menos elevada o que sugere que alguns dos microrganismos presentes serão mais dominantes que outros. Alterações na intensidade das bandas sugerem variações na abundância relativa das diferentes populações definidas pelo 16S rDNA (Lebaron *et al.*, 1999).



**Figura 3.1** Perfis de DGGE obtidos para o domínio *Bacteria* e índices de diversidade respetivos a cada amostra VB-negativa.



**Figura 3.2** Perfis de DGGE obtidos para o domínio *Bacteria* e índices de diversidade respetivos a cada amostra VB-negativa (preto) e VB-positiva (laranja).



**Figura 3.3** Perfis de DGGE obtidos para o domínio *Bacteria* e índices de diversidade respetivos a cada amostra VB-positiva.

**Tabela 3.2** Resultados obtidos por PCR utilizando *primers* específicos para *Bacteria*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* spp. e *G. vaginalis*.

<b>Amostra clínica</b>	<b>Primers específicos <i>Bacteria</i></b>	<b>Primers específicos <i>Bifidobacterium</i></b>	<b>Primers específicos <i>Lactobacillus</i> spp.</b>	<b>Primers específicos <i>G. vaginalis</i></b>
MM9	+	+	+	+
MM10	+	+	+	+
MM12	+	+	+	+
MM18	+	+	+	+
MM19	+	+	+	+
SH7	+	+	-	+
SH10	+	+	-	+
SH30	+	+	+	+
SH51	+	+	+	+
SH71	+	+	-	+
SH79	+	+	+	+
SH80	+	+	+	+
SH92	+	+	+	+
SH203	+	+	-	+
SH222	+	+	-	+
SH254	+	+	+	+
TR1	+	+	+	+
SH22	+	-	+	-
SH33	+	-	+	-
SH41	+	-	+	-
SH52	+	+	+	-
SH53	+	+	+	-
SH54	+	-	+	-
SH58	+	-	+	-
SH60	+	-	+	-
SH62	+	-	+	-
SH63	+	-	+	-
SH90	+	-	+	-
SH110	+	+	+	-
SH120	+	-	+	-
SH133	+	+	+	-
SH141	+	-	+	-
SH160	+	-	+	-
SH180	+	-	+	-
SH192	+	+	+	-
SH200R	+	+	+	-
SH210	+	-	+	-
SH248	+	-	+	-

**Legenda:**

Resultado negativo: -.

Resultado positivo: +.

Amostras VB+ ; Amostras VB-



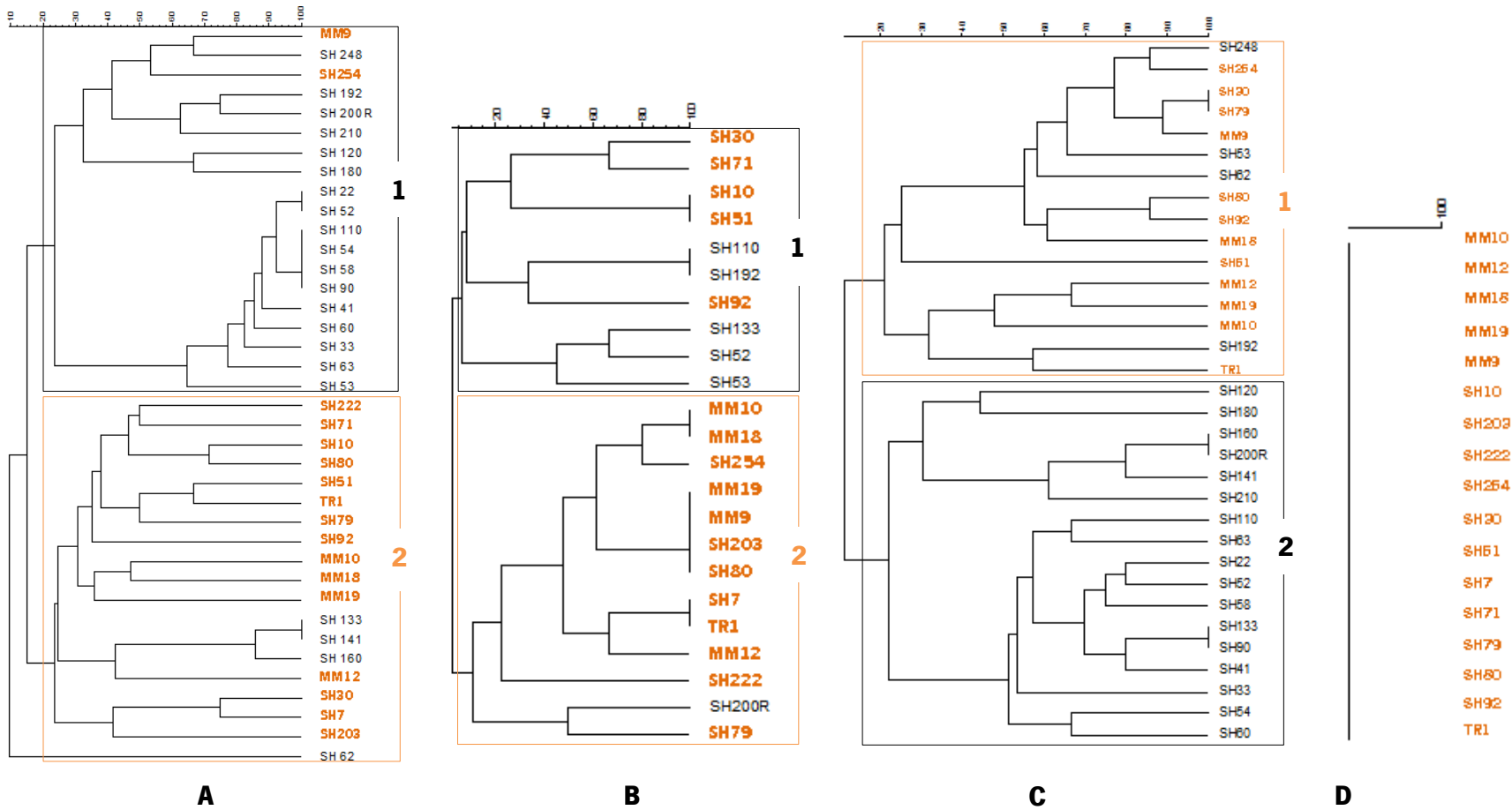


Este estudo revelou que todas as amostras VB-positivas foram colonizadas por mais do que um microrganismo, uma vez que o perfil de DGGE de *Bacteria* apresenta várias bandas, indicativo de que as comunidades bacterianas são diversas (**Figura 3.2 e 3.3**). Estes resultados apoiam estudos anteriores sobre a natureza polimicrobiana da VB (Anukam *et al.*, 2007; Diao *et al.*, 2011; Fredricks, 2011).

Curiosamente, todas as *G. vaginalis* detetadas apresentam uma similaridade de 100% entre elas (**Figuras 3.5 (D) e 3.6**), sugerindo que as mesmas estirpes de *G. vaginalis* estarão presentes nas diferentes amostras VB-positivas estudadas.

A análise do dendograma obtido para os perfis de DGGE de *Bacteria* (**Figura 3.5 (A)**) mostra que algumas das amostras VB-positivas e VB-negativas apresentam percentagens de similaridade inferiores a 20%. É possível distinguir dois blocos principais, em que um deles corresponde ao agrupamento de cerca de 88% das amostras VB-positivas amplificadas com *primers* específicos para *Bacteria* (*cluster A2*), o que sugere que cerca de 88% das amostras VB-positivas possuem comunidades microbianas semelhantes entre si (**Figura 3.5 (A)**). Segundo os resultados obtidos por DGGE, as amostras de mulheres VB-positivas apresentam maior diversidade de *Bacteria* ( $0,64 < H < 1,26$ ), comparativamente às amostras de mulheres VB-negativas ( $0,10 < H < 0,74$ ), sugerindo que microfloras de mulheres com VB têm tendência a ser mais diversas em termos das comunidades bacterianas (**Figuras 3.1, 3.2 e 3.3**). Conclusões semelhantes já tinham sido observadas noutros estudos (Diao *et al.*, 2011; Fredricks, 2011).

*Bifidobacterium* foram reportados como existindo em diferentes abundâncias em indivíduos com flora vaginal normal ou com VB (Swidsinski *et al.*, 2010). Na verdade, microfloras vaginais normais apresentam baixos níveis de *Bifidobacterium*, sendo que a abundância destes microrganismos vai aumentando gradualmente na microflora intermédia e na microflora de mulheres com VB. Deste modo, as microfloras de mulheres com VB apresentam já uma quantidade bastante significativa de *Bifidobacterium* mas também de outras espécies como *G. vaginalis* (Swidsinski *et al.*, 2010). Embora as espécies de *Bifidobacterium* tenham sido associadas a amostras VB-positivas (Michuki, 2011), podem ocasionalmente, ser encontradas na vagina de mulheres saudáveis (Redondo-Lopez *et al.*, 1990). Neste estudo, todas as amostras VB-positivas foram amplificadas utilizando *primers* específicos para *Bifidobacterium*, enquanto apenas 29% das amostras VB-negativas obtiveram uma amplificação positiva com estes *primers* (**Tabela 3.2**).



**Figura 3.5** Análise de agrupamento pelo coeficiente de UPGMA, usando a correlação de *Dice*, dos perfis de DGGE de *Bacteria* (A), *Bifidobacterium* (B), *Lactobacillus* spp. (C) e *G. vaginalis* (D).

**Legenda:** Amostras VB+ ; Amostras VB- .

MM10	100																	
MM12	100	100																
MM18	100	100	100															
MM19	100	100	100	100														
MM9	100	100	100	100	100													
SH10	100	100	100	100	100	100												
SH203	100	100	100	100	100	100	100											
SH222	100	100	100	100	100	100	100	100										
SH254	100	100	100	100	100	100	100	100	100									
SH30	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100								
SH51	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100							
SH7	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100						
SH71	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100					
SH79	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100				
SH80	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100			
SH92	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
TR1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	MM10	MM12	MM18	MM19	MM9	SH10	SH203	SH222	SH254	SH30	SH51	SH7	SH71	SH79	SH80	SH92	TR1	

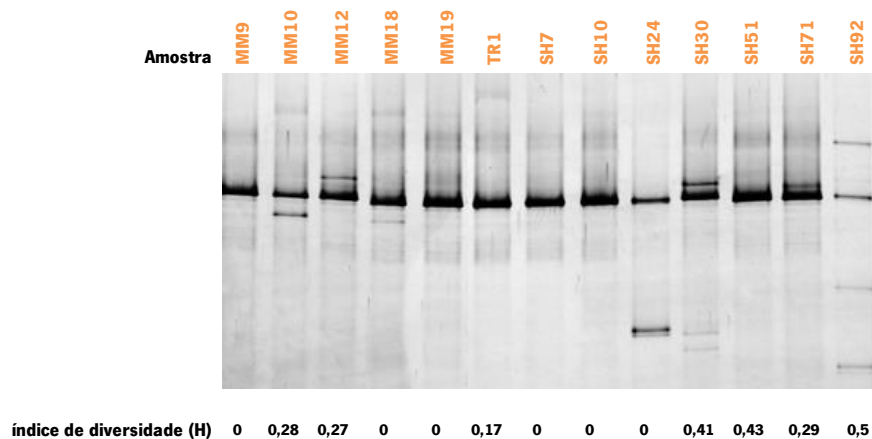
Figura 3.6 Matriz de similaridade. Similaridade (%) entre os perfis de DGGE obtidos para cada amostra após amplificação com primers específicos para *G. vaginalis*.

Segundo o dendograma obtido para *Bifidobacterium* (**Figura 3.5 (B)**), todas as amostras VB-negativas formam um *cluster*, com exceção da amostra SH200R. Ainda assim, a similaridade entre as amostras é quase sempre inferior a 40%, apesar de duas das amostras apresentarem uma similaridade superior a 60% (amostras SH133 e SH52) e outras duas amostras apresentarem uma similaridade de 100% (amostras SH110 e SH192) (**Figura 3.7**). No mesmo dendograma, é possível distinguir dois blocos principais, em que um deles corresponde ao agrupamento de mais de 70% das amostras VB-positivas amplificadas com *primers* específicos para *Bifidobacterium* (*cluster* B2), sugerindo que mais de 70% das amostras VB-positivas possuem comunidades de *Bifidobacterium* semelhantes entre si e, grande parte, nomeadamente as amostras MM19, MM9, SH203 e SH80, apresentam uma percentagem de similaridade de 100% (**Figura 3.7**).

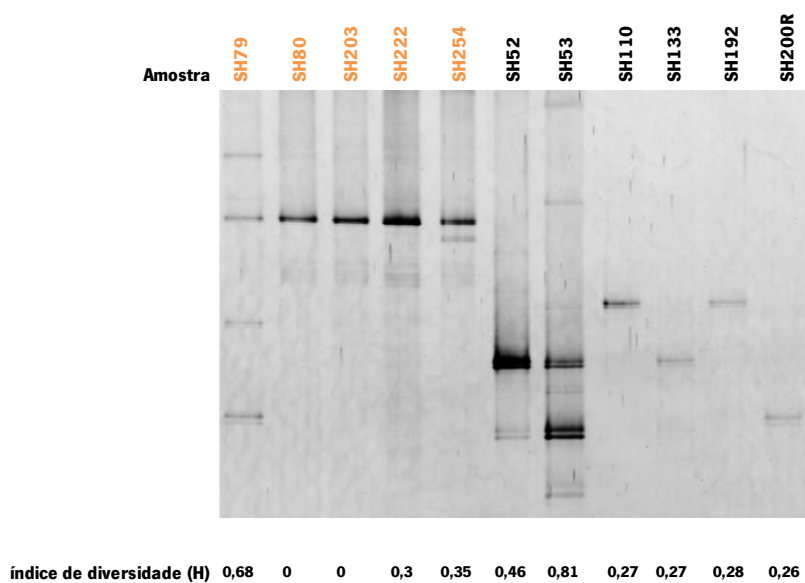
Analisando os resultados obtidos, é possível verificar que as espécies de *Bifidobacterium* coexistem com espécies de *G. vaginalis* em amostras VB-positivas, contudo, também se encontram presentes em amostras VB- negativas. Assim, tal como acontece com *G. vaginalis*, a sua deteção por PCR não é indicativa de doença.

Cerca de 30% das amostras VB-positivas não foram amplificadas com *primers* específicos para *Lactobacillus* spp. (**Figura 3.5 (C)**, *cluster* C1). Por outro lado, todas as amostras VB-negativas foram amplificadas com *primers* específicos para *Lactobacillus* spp. e a maioria ficou agrupada no *cluster* C2 (**Figura 3.5 (C)**), sendo que a maioria das amostras apresenta uma similaridade entre si superior a 50% (**Figura 3.10**). Embora estes microrganismos nem sempre possam ser identificados com base na observação microscópica (dado provavelmente ao facto de estarem presentes em número reduzido), isso poderá não significar que estejam efetivamente ausentes da flora vaginal. Segundo os resultados obtidos por DGGE, as amostras de mulheres VB-positivas apresentam maior diversidade de *Lactobacillus* spp. ( $0,41 < H < 0,89$ ), comparativamente às amostras de mulheres VB-negativas ( $0,29 < H < 0,8$ ) (**Figuras 3.11, 3.12 e 3.13**).





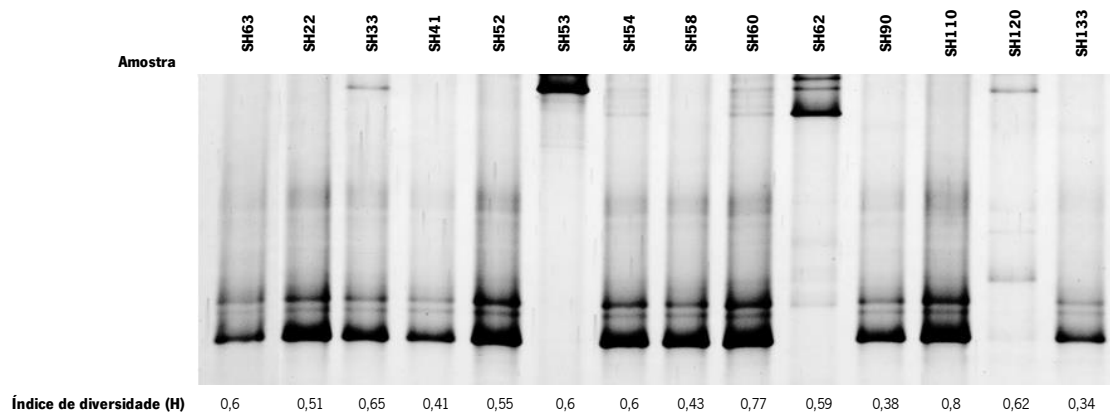
**Figura 3.8** Perfis de DGGE obtidos para *Bifidobacterium* e índices de diversidade respetivos a cada amostra VB-positiva.



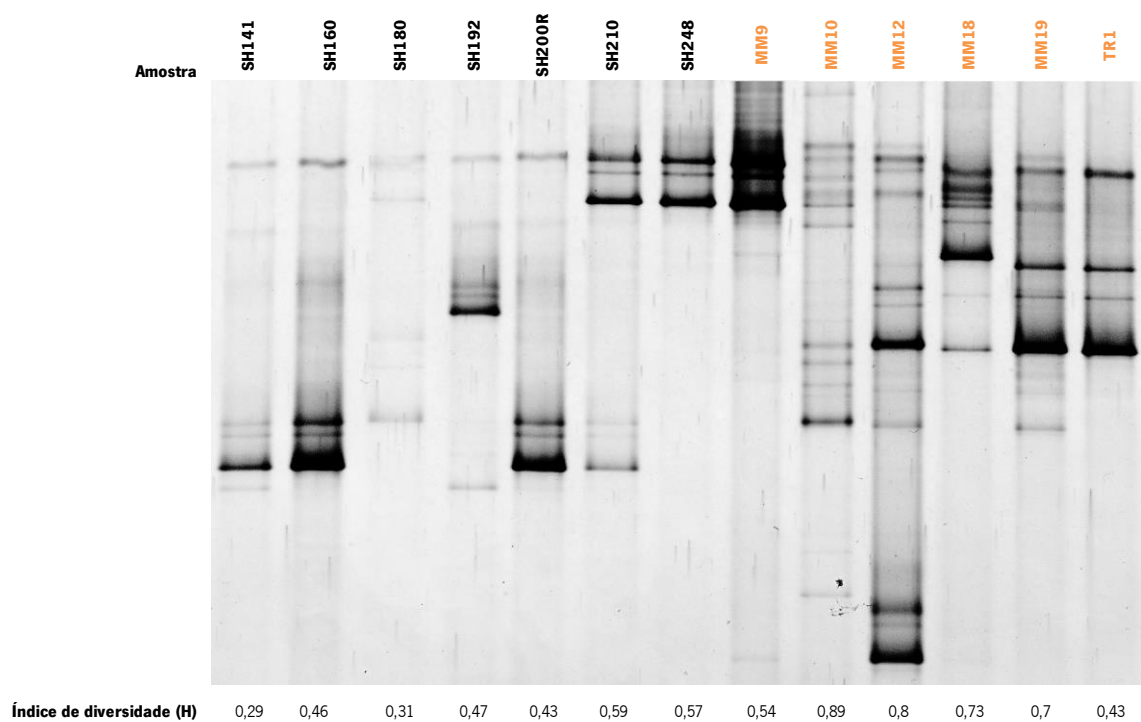
**Figura 3.9** Perfis de DGGE obtidos para *Bifidobacterium* e índices de diversidade respetivos a cada amostra VB-positiva (laranja) e VB-negativa (preto).



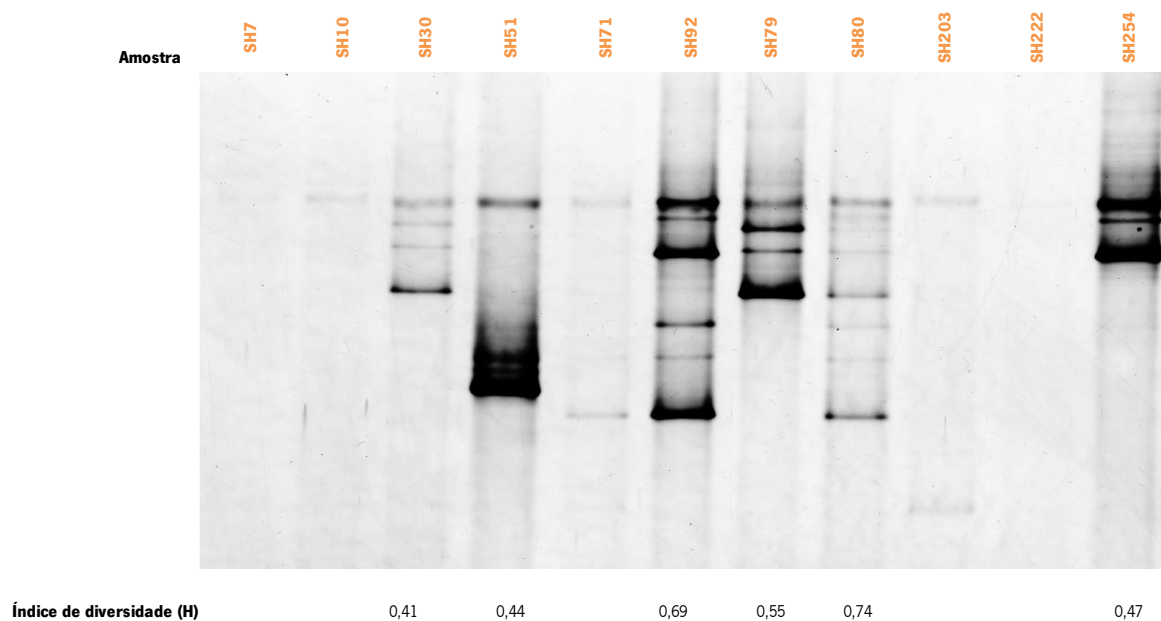




**Figura 3.11** Perfis de DGGE obtidos para *Lactobacillus* spp. e índices de diversidade respetivos a cada amostra VB-negativa.



**Figura 3.12** Perfis de DGGE obtidos para *Lactobacillus* spp. e índices de diversidade respetivos a cada amostra VB-positiva (laranja) e VB-negativa (preto).



**Figura 3.13** Perfis de DGGE obtidos para *Lactobacillus* spp. e índices de diversidade respectivos a cada amostra VB-positiva.

Estes resultados são consistentes com os dados de estudos anteriores (Vitali *et al.*, 2007; Lamont *et al.*, 2011), que mostram que a flora vaginal de mulheres saudáveis é, na sua maioria, dominada por uma única espécie de *Lactobacillus*. A coexistência de várias espécies de *Lactobacillus* é rara devido à exclusão competitiva de uma espécie por outra (Zhou *et al.*, 2004).



## **CAPÍTULO 4**

---

### **Conclusões e trabalho futuro**



## **Conclusões e trabalho futuro**

É amplamente reconhecido que as técnicas habituais de cultura de microrganismos nem sempre permitem detetar a presença de certas espécies *em amostras clínicas* (Burton *et al.*, 2002). Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que as técnicas de PCR e de DGGE, em conjunto, representam uma ferramenta alternativa para detetar microrganismos envolvidos na VB. Ao contrário das técnicas de cultura, o PCR-DGGE não requer conhecimento exato do tipo de microrganismos e, por conseguinte, das condições de incubação a serem usadas para o cultivo desses microrganismos. Para além disso, o crescimento dos microrganismos em meio de cultura pressupõe um tempo de espera para a obtenção dos resultados correspondente ao tempo de crescimento do microrganismo. A estratégia usada neste trabalho, recorrendo à técnica de PCR-DGGE, permitiu a obtenção de resultados independentes do cultivo seletivo de microrganismos.

Este estudo revelou que todas as amostras VB-positivas foram colonizadas por mais do que um microrganismo, comprovando a natureza polimicrobiana da VB.

A análise dos dendogramas obtidos para *Bacteria*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus spp.*, permitiu identificar facilmente dois blocos principais, onde amostras VB-positivas e amostras VB-negativas ficaram agrupadas em *clusters* diferentes, demonstrando que os biótipos presentes na microflora de mulheres saudáveis diferem daqueles presentes na microflora de mulheres com VB. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram ainda que as espécies de *Bifidobacterium* coexistem com espécies de *G. vaginalis* em amostras VB-positivas, contudo, também se encontram presentes em amostras VB-negativas e, tal como acontece com *G. vaginalis*, a sua deteção por PCR não é indicativa de doença.

Todas as amostras VB-positivas amplificaram utilizando *primers* específicos para *G.vaginalis* e as comunidades presentes em cada uma das amostras apresentaram uma similaridade de 100% entre elas, sugerindo que as mesmas estirpes de *G.vaginalis* estarão presentes em todas as amostras VB-positivas estudadas. Este foi o primeiro estudo em Portugal e demonstrou que as técnicas moleculares representam uma excelente ferramenta para detetar microrganismos envolvidos na BV.

Contudo, e apesar de representar uma forma eficiente de avaliar a presença/ausência de certos grupos presentes em determinada amostra, bem como avaliar a diversidade da comunidade microbiana, seria interessante efetuar trabalho adicional de forma a identificar os

microrganismos presentes nestas amostras ao nível da espécie. Para tal, e como sugestão de trabalho futuro, poder-se-iam utilizar *primers* com elevada especificidade para as espécies de interesse (como é o caso do par de *primers* usado neste estudo para a deteção de *G. vaginalis*) seguido da sequenciação dos produtos de PCR assim obtidos, ou em alternativa utilizar técnicas que envolvam a sequenciação direta de todos os genes de 16S rRNA presentes nessas amostras. Além disso, seria interessante incluir um terceiro grupo de amostras na análise, que englobasse amostras VB-negativas onde estivesse presente *G. vaginalis*, com o intuito de comparar os perfis de DGGE obtidos para amostras VB-negativas com e sem *G. vaginalis*.

# **CAPÍTULO 5**

---

## **Bibliografía**





## Bibliografia

Alves P, Castro J, Sousa C, Cereija TB, Cerca N: ***Gardnerella vaginalis* outcompetes 29 other bacterial species isolated from patients with bacterial vaginosis, using in an *in vitro* biofilm formation model.** *J Infect Dis* 2014, 15; **210**(4):593-6.

Amsel R, Totten PA, Spiegel CA, Chen KC, Eschenbach D, Holmes, KK: **Nonspecific vaginitis. Diagnostic criteria and microbial and epidemiologic associations.** *American Journal of Medicine* 1983, **74**:14-22.

Anukam KC, Reid G: **Organisms associated with bacterial vaginosis in Nigerian women as determined by PCR-DGGE and 16S rRNA gene sequence.** *Afr Health Sci* 2007,**7**(2):68-72.

Aroutcheva AA, Simoes JA, Faro S: **Antimicrobial protein produced by vaginal *Lactobacillus acidophilus* that inhibits *Gardnerella vaginalis*.** *Infectious Diseases Obstetrics and Gynecology* 2001, **9**: 33-39.

Bukhari MH, Majeed M, Qamar S, Niazi S, Syed SZ, Yusuf AW, Yusuf NW: **Clinicopathological study of Papanicolaou (Pap) smears for diagnosing of cervical infections.** *Diagnostic Cytopathology* 2012, **40**: 35-41.

Burton JP, Cadieux PA, Reid G, Burton JP, Cadieux PA, Reid G: **Improved Understanding of the Bacterial Vaginal Microbiota of Women before and after Probiotic Instillation.** *Appl. Environ. Microbiol* 2003, **69**(1): 97.

Burton JP, Reid G: **Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nugent Score) and molecular (*Polymerase Chain Reaction* and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques.** *The Journal of Infectious Diseases* 2002, **186**: 1770-80.

Camargo OS: **Comparação entre acidform gel e metronidazol gel para o tratamento da vaginose bacteriana: ensaio clínico piloto fase II.** [M.Sci dissertation]. Universidade Estadual de Campinas: Campinas; 2004. Available from: Universidade Estadual de Campinas

Castellsague X: **Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer.** *Gynecol Oncol* 2008, **110**:S4-7.

Catlin BW: ***Gardnerella vaginalis*: characteristics, clinical considerations, and controversies.** *Clinical Microbiology Reviews* 1992, **5**: 213-237.

Cauci S, Scrimin F, Driussi S, Ceccone S, Monte R, Fant L, Quadrifoglio F: **Specific immune response against *Gardnerella vaginalis* hemolysin in patients with bacterial vaginosis.** *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1996, **175**: 1601-1605.

Chaijareenont K, Sirimai K, Boriboonhirunsarn D, Kiriwat O: **Accuracy of Nugent's score and each Amsel's criteria in the diagnosis of bacterial vaginosis.** *Journal of the Medical Association of Thailand* 2004, **87**: 1270-1274.

Cherpes TL, Hillier SL, Meyn LA, et al: **A delicate balance: risk factors for acquisition of bacterial vaginosis include sexual activity, absence of hydrogen peroxide-producing lactobacilli, black race, and positive herpes simplex virus type 2 serology.** *Sex Transm Dis* 2008, **35**:78-83.

Conrado A, Silveira DO, Albini CA: **A *Gardnerella vaginalis* e as infecções do trato urinário.** *J Bras Patol Med Lab* 2010, **46** (4): 295-300.

Cook RL, Redondo-Lopez V, Schmitt C, et al: **Clinical, microbiological, and biochemical factors in recurrent bacterial vaginosis.** *J Clin Microbiol* 1992, **30**(4):870-7.

Coudeyras S, Jugie G, Vermerie M, Forestier C: **Adhesion of human probiotic *Lactobacillus rhamnosus* to cervical and vaginal cells and interaction with vaginosis-associated pathogens.** *Infectious Diseases Obstetrics & Gynecology* 2008, **2008**:1-5.

Cribby S, Taylor M, Reid G: **Vaginal microbiota and the use of probiotics.** *Interdisciplinary Perspectives in Infectious Diseases* 2008, 1-9.

De Backer E, Dubreuil L, Brauman M, Acar J, Vaneechoutte M: ***In vitro* activity of secnidazole against *Atopobium vaginae*, an anaerobic pathogen involved in bacterial vaginosis.** *Clinical Microbiology and Infection* 2010, **16**: 470-472.

De Backer E, Verhelst R, Verstraelen H, Claeys G, Verschraegen G, Temmerman M, Vaneechoutte M: **Antibiotic susceptibility of *Atopobium vaginae*.** *Biomed central Infectious Diseases* 2006, **6**: 1-6.

Demidov VV: **PNA and LNA throw light on DNA.** *Trends Biotechnol* 2003, **21**:4-7.

Diao Y, Fang X, Xia Q, et al: **Organism diversity between women with and without bacterial vaginosis as determined by polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rRNA gene sequence.** *J Obstet Gynaecol Res* 2011, **37**(10):1438-46.

Dover SE, Aroutcheva AA, Faro S, Chikindas ML: **Natural antimicrobials and their role in vaginal health.** *International Journal of Probiotics and Prebiotics* 2008, **3**: 219-230.

Eschenbach DA: **Bacterial vaginosis: resistance, recurrence, and/or reinfection?** *Clinical Infectious Diseases* 2007, **44**: 220-221.

Eschenbach DA: **History and review of bacterial vaginosis.** *Am J Obstet Gynecol* 1993, **169**:441-445.

Falagas ME, Betsi GI, Athanasiou S: **Probiotics for the treatment of women with bacterial vaginosis**. *Clin Microbiol Infect* 2007, **13**: 657–664.

Fethers KA, Fairley CK, Hocking JS, et al: **Sexual risk factors and bacterial vaginosis: a systematic review and meta-analysis**. *Clin Infect Dis* 2008, **47**:1426-1435.

Fredricks DN, Fiedler TL, Marrazzo JM: **Molecular identification of bacteria associated with bacterial vaginosis**. *The new England Journal of Medicine* 2005, **353**: 1899-1911.

Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Mitchell CM, Marrazzo JM: **Changes in vaginal bacterial concentrations with intravaginal metronidazole therapy for bacterial vaginosis as assessed by quantitative PCR**. *Journal of Clinical Microbiology* 2009, **47**: 721-726.

Fredricks DN, Fiedler TL, Thomas KK, Oakley BB, Marrazzo JM: **Targeted PCR for detection of vaginal bacteria associated with bacterial vaginosis**. *J Clin Microbiol* 2007, **45**: 3270–3276.

Fredricks DN: **Molecular methods to describe the spectrum and dynamics of the vaginal microbiota**. *Anaerobe*. 2011, **17**(4):191-5.

Gardner HL, Dukes CD: ***Haemophilus vaginalis* vaginitis: a newly defined specific infection previously classified non-specific vaginitis**. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1955, **69**: 962-976.

Gardner HL, Dukes CD: ***Hemophilus vaginalis* vaginitis**. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1959, **83**: 280-289.

Gelber SE, Aguilar JL, Lewis KL, Ratner AJ: **Functional and phylogenetic characterization of vaginolysin, the human-specific cytolysin from *Gardnerella vaginalis***. *Journal of Bacteriology* 2008, **190**: 3896-3903.

Gillet E, Meys JF, Verstraelen H, Bosire C, De Sutter P, Temmerman M, Broeck DV: **Bacterial vaginosis is associated with uterine cervical human papillomavirus infection: a meta-analysis.** *Biomed Central Infectious Diseases* 2011, **11**: 1-9.

Giraldo PC, Passos MRL, Bravo R, Varella RQ, Campos WNA, Amaral RL, et al: **O Frequente Desafio do Entendimento e do Manuseio da Vaginose Bacteriana.** *DST - J Brás Doenças Sex Transm* 2007, **19**(2): 84-91.

Gompeal C, Koss LG: **Citologia ginecológica e suas bases anatomoclínicas.** São Paulo: Manole, 1997.

Greene JF, Kuehl TJ, Allen SR: **The papanicolaou smear: inadequate screening test for bacterial vaginosis during pregnancy.** *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2000, **182**: 1048-1049.

Greenwood JR, Pickett MJ: **Transfer of *Haemophilus vaginalis* Gardner and Dukes to a New Genus, *Gardnerella*: *G. vaginalis* (Gardner and Dukes) comb. Nov..** *International Journal of Systematic Bacteriology* 1980, **30** (1): 170–178.

Henriques A, Cereija T, Machado A, Cerca N: ***In silico* vs *in vitro* analysis of primer specificity for the detection of *Gardnerella vaginalis*, *Atopobium vaginae* and *Lactobacillus* spp.** *BMC Res Notes* 2012, **5**:637.

Hillier SL, Holmes KK: **Bacterial vaginosis.** In: Holmes KK, Sparling PF, Mardh PA, Lemon, SM, Stamm WA, Piot P, Wasserheit JN, editors. *Sexually Transmitted Diseases*. 3rd. New York, McGraw-Hill, 1999, pp. 563–586.

Hyman RW, Fukushima M, Diamond L, Kumm J, Giudice LC, Davis RW: **Microbes on the human vaginal epithelium.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:7952–7957

Isacsson J, Cao H, Nordgren S, Svanvik N, Westman G, Kubista M, Sjöback R, Sehlstedt U: **Rapid and specific detection of PCR products using light-up probes.** *Mol Cell Probes* 2000, **14**:321–328.

Jones SE, Versalovic J: **Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors.** *Biomed Microbiology* 2009, **9**: 35-44.

Justé A, Thommad B, Lievens B: **Recent advances in molecular techniques to study microbial communities in food-associated matrices and processes.** *Food Microbiol* 2008, **25**:745–761.

Kharsany AB, Hoosen AA, Van den Ende J: **Antimicrobial susceptibilities of *Gardnerella vaginalis*.** *Antimicrob Agents Chemother* 1993, **37**(12):2733-2735.

Koshiol J, Lindsay L, Pimenta JM, et al: **Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia: a systematic review and meta-analysis.** *Am J Epidemiol* 2008, **168**:123-137.

Koumans EH, Markowitz LE, Hogan V: **Indications for therapy and treatment recommendations for bacterial vaginosis in nonpregnant and pregnant women: a synthesis of data.** *Clinical Infectious Diseases* 2002, **35**: 152-172.

Lambert J a, Kalra A, Dodge CT, John S, Sobel JD, Akins R a: **Novel PCR-based methods enhance characterization of vaginal microbiota in a bacterial vaginosis patient before and after treatment.** *Appl Environ Microbiol* 2013, **79**(13):4181-5.

Lamendella R, Santo Domingo JW, Kelty C, Oerther DB: **Bifidobacteria in feces and environmental waters.** *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**(3):575-84.

Lamont RF, Sobel JD, Akins RA, et al: **The vaginal microbiome: New information about genital tract flora using molecular based techniques.** *NIH* 2011, **118**(5):533-549.

Larsen B, Monif GR: **Understanding the bacterial flora of the female genital tract.** *Clin Infect Dis* 2001, **32**(4):e69-77.

Larsson PG, Bergstrom M, Forsum U, Jacobsson B, Strand A, Wolner-Hanssen P: **Bacterial vaginosis transmission, role in genital tract infection and pregnancy outcome: an enigma.** *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 2005, **113**: 233-245

Larsson PG, Fahraeus L, Carlsson B, Jakobsson T, Forsum U: **Predisposing factors for bacterial vaginosis, treatment efficacy and pregnancy outcome among term deliveries; results from a preterm delivery study.** *Biomed Womens Health* 2007, **7**: 20-26.

Lebaron P, Servais P, Troussellier M, Courties C, Vives-Rego J, Muyzer G, Bernard L, Guindulain T, Schäfer H, Stackebrandt E: **Changes in bacterial community structure in seawater mesocosms differing in their nutrient status.** *Aquat. Microb. Ecol* 1999, **19**: 255-267.

Lefmann M, Schweickert B, Buchholz P, Göbel B, Ulrichs T, Seiler P, Theegarten D, Moter A: **Evaluation of peptide nucleic acid-fluorescence in situ hybridization for identification of clinically relevant mycobacteria in clinical specimens and tissue sections.** *J Clin Microbiol* 2006, **44**:3760–3767.

Ling Z, Liu X, Chen X, et al: **Diversity of cervicovaginal microbiota associated with female lower genital tract infections.** *Microb Ecol* 2011, **61**(3):704-14.

Livengood CH: **Bacterial vaginosis: an overview.** *Expert Review of Obstetrics & Gynecology* 2009, **2**: 28-37.

Lofmark S, Edlund C, Nord CE: **Metronidazole is still the drug of choice for treatment of anaerobic infections.** *Clinical Infectious Diseases* 2010, **50**: 16-23.



Machado A, Almeida C, Salgueiro D, Henriques A, Vaneechoutte M: **Fluorescence in situ Hybridization method using Peptide Nucleic Acid probes for rapid detection of *Lactobacillus* and *Gardnerella* spp.** *BMC Microbiology* 2013, **13**:82.

Mackay IM, et al: **Real-time PCR in virology.** *Nucleic Acids Research* 2002, **30** (6): 1292-1305.

Marrazzo J: **Interpreting the epidemiology and natural history of bacterial vaginosis: are we still confused?** *Anaerobe* 2011, **17**: 186-190.

Martin R, Heilig GHJ, Zoetendal EG, Smidt H, Rodríguez JM: **Diversity of the *Lactobacillus* group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut.** *J Appl Microbiol* 2007, **103**(6):2638-44.

Martin R, Jiménez E, Heilig H, et al: **Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR.** *Appl Environ Microbiol* 2009, **75**(4):965-9.

McKechnie ML, Hillman R, Couldwell D, Kong F, Freedman E, Wang H, Gilbert GL: **Simultaneous identification of 14 genital microorganisms in urine by use of a multiplex PCR-based reverse line blot assay.** *Journal of Clinical Microbiology* 2009, **47**: 1871-1877.

Menard JP, Fenollar F, Henry M, Bretelle F, Raoult D: **Molecular quantification of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* loads to predict bacterial vaginosis.** *Clin Infect Dis* 2008, **47**(1):33-43.

Menard JP, Fenollar F, Raoult D, Boubli L, Bretelle F: **Self-collected vaginal swabs for the quantitative real-time *Polymerase Chain Reaction* assay of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* and the diagnosis of bacterial vaginosis.** *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Disease* 2012, **31**: 513-518.

Menard JP, Mazouni C, Salem-Cherif I, Fenollar F, Raoult D, Boubli L, Gannerre M, Bretelle F: **High vaginal concentrations of *Atopobium vaginae* and *Gardnerella vaginalis* in women undergoing preterm labor.** *Obstetrics & Gynecology* 2010, **115**: 134-140.

Michuki GN: **Metagenomic Characterisation of Vaginal Flora and the Relationship of Bacteriophage, *Bifidobacterium* and *Oenococcus* with Bacterial Vaginosis in HIV Infected Women.** Jomo Kenyatta University of Agriculture and Technology, 2011.

Moodley P, Connolly C, Sturm AW: **Interrelationships among Human Immunodeficiency Virus type 1 Infection, Bacterial Vaginosis, Trichomoniasis, and the presence of yeasts.** *J Infec Dis* 2002, **185**: 69-73.

Morris M, Nicoll A, Simms I, et al: **Bacterial vaginosis: a public health review.** *BJOG* 2001, **108**:439-450.

Murta EF, Silva AO, Silva EA, Adad SJ: **Frequency of infectious agents for vaginitis in non- and hysterectomized women.** *Arch Gynecol Obstet* 2005, **273**: 152-6.

Nath J, Johnson KL: **A review of fluorescence in situ hybridization (FISH): current status and future prospects.** *Biotech Histochem* 2000, **75**:54–78.

Neto P: **Vaginose Bacteriana por *Gardnerella vaginalis*** [M.Sci dissertation], Universidade Paulista: Recife. 2011, 35 pp. Available from: Universidade Paulista

Nugent RP, Krohn MA, Hillie SL: **Reliability of diagnosing bacterial vaginosis is improved by a standardized method of gram stain interpretation.** *Journal of Clinical Microbiology* 1991, **29**: 297-301.

Oakley BB, Fiedler TL, Marrazzo JM, Fredricks DN: **Diversity of human vaginal bacterial communities and associations with clinically defined bacterial vaginosis.** *Appl Environ Microbiol* 2008, **15**:4898–4909

Oliveira K, Procop GW, Wilson D, Coull J, Stender H: **Rapid identification of *Staphylococcus aureus* directly from blood cultures by fluorescence *in situ* hybridization with peptide nucleic acid probes.** *J Clin Microbiol* 2002, **40**:247–251.

Patterson JL, Girerd PH, Karjane NW, Jefferson KK: **Effect of biofilm phenotype on resistance of *Gardnerella vaginalis* to hydrogen peroxide and lactic acid.** *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2007, **197**: 170-177.

Patterson JL, Stull-Lane A, Girerd PH, Jefferson KK: **Analysis of adherence, biofilm formation and cytotoxicity suggests a greater virulence potential of *Gardnerella vaginalis* relative to other bacterial-vaginosis-associated anaerobes.** *Microbiology* 2010, **156**: 392-399.

Pavlova SI, Kilic AO, Kilic SS, So JS, Nader-Macias ME, Simões JA, Tao L: **Genetic diversity of vaginal lactobacilli from women in different countries based on 16S rRNA gene sequences.** *Journal of Applied Microbiology* 2002, **92**: 451-459.

Peleg AY, Tilahun Y, Fiandaca MJ, D'Agata EMC, Venkataraman L, Moellering RC, Eliopoulos GM: **Utility of peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization for rapid detection of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*.** *J Clin Microbiol* 2009, **47**:830–832.

Pepin J, Deslandes S, Giroux G, Sobela F, Khonde N, Diakite S, Demeule S, Labbe AC, Carrier N, Frost E: **The complex vaginal flora of West African women with bacterial vaginosis.** *Public Library of Science* 2011, **6**: 1-8.

Ravel J, Gajer P, Abdo Z, Schneider GM, Koenig SS, McCulle SL, Karlebach S, Gorle R, Russell J, Tacket CO, Brotman RM, Davis CC, Ault K, Peralta L, Forney LJ: **Vaginal microbiome of reproductive-age women**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011, **108**: 4680-4687.

Redondo-Lopez V, Cook RL, Sobel JD: **Emerging role of Lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora**. *Rev Infect Dis* 1990, **12**:856/72.

Reid G: **Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection**. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2001, **73**: 437-443.

Rigby S, Procop GW, Haase G, Wilson D, Hall G, Kurtzman C, Oliveira K, Von Oy S, Hyldig-Nielsen JJ, Coull J, Stender H: **Fluorescence in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for rapid identification of *Candida albicans* directly from blood culture bottles**. *J Clin Microbiol* 2002, **40**:2182–2186.

Salgueiro D: **Bacterial Vaginosis in Portugal: Diagnosis of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* in healthy or symptomatic women** [M.Sci dissertation], Universidade Católica Portuguesa: Porto. 2012, 79 pp. Available from: Universidade Católica Portuguesa

Sanguinetti C J, Dias Neto E, Simpson AJG: **Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels**. *Biotechniques* 1994, **17**: 915-919.

Saunders S, Bocking A, Challis J, Reid G: **Effect of *Lactobacillus* challenge on *Gardnerella vaginalis* biofilms**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2007, **55**: 138-142.

Shivadas A: **Vaginitis**. Available: <http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/womens-health/vaginitis/> [date visited: 25/10/14].

Silva CHPM, Neufeld PM: **Bacteriologia e micologia**. *Revinter* 2006.

Silva D, Henriques A, Cereija T, Martinez-de-Oliveira J, Miranda M, Cerca N: **Prevalence of *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* in Portuguese women and association with risk factors for bacterial vaginosis.** *Int J Gynaecol Obstet* 2014, **124**(2):178-9.

Silva MA, Longatto A: **Colo Uterino & Vagina: Processos Inflamatórios.** *Revinter* 2000.

Simões J, Ocaña V, Aroutcheva A, Camargo R, Nader-Macías ME, Faro S: **Bacteriocinas Produzidas por Lactobacilos e sua importância para o Trato Genital Feminino.** *Femina* 2001, **29**(10): 705-710. 14

Smayevsky J, Canigia LF, Lanza A, Bianchini H: **Vaginal microflora associated with bacterial vaginosis in nonpregnant women: reliability of sialidase detection.** *Infect Dis Obstet Gynecol* 2001, **9**(1):17–22.

Smith SM, Ogbara T, Eng RH: **Involvement of *Gardnerella vaginalis* in urinary tract infections in men.** *Journal of Clinical Microbiology* 1992, **30**(6): 1575-7.

Sobel JD: **Bacterial vaginosis.** *Annu Rev Med* 2000, **51**: 349–56.

Sobel JD: **Vulvovaginitis in healthy women.** *Compr Ther* 1999; **25**: 335-46. Tanaka VA, Gotlieb SD, Soreano R, Fagundes LJ, Belda WJ, Moraes FR, et al.

Sousa DZ, Pereira MA, Stams AJM, Alves MM, Smidt H: **Microbial communities involved in anaerobic degradation of unsaturated or saturated long-chain fatty acids.** *Appl Environ Microbiol* 2007, **73**(4):1054-64.

Srinivasan S, Fredricks DN: **The human vaginal bacterial biota and bacterial vaginosis.** *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases* 2008, **2008**: 1-22.

Stender H, Fiandaca M, Hyldig-Nielsen JJ, Coull J: **PNA for rapid microbiology**. *J Microbiol Methods* 2002, **48**:1-17

Sweet RL: **Gynecologic conditions and bacterial vaginosis: implications for the non-pregnant patient**. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2000, **8**:184-190.

Swidsinski A, Dorffel Y, Loening-Baucke V, et al: **Dissimilarity in the occurrence of *Bifidobacteriaceae* in vaginal and perianal microbiota in women with bacterial vaginosis**. *Anaerobe* 2010, **16**(5):478-82.

Swidsinski A, Dorffel Y, Loening-Baucke V, Schilling J, Mendling W: **Response of *Gardnerella vaginalis* biofilm to 5 days of moxifloxacin treatment**. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 2011, **61**: 41-46.

Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, Ladhoff A, Swidsinski S, Hale LP, Lochs H: **Adherent biofilms in bacterial vaginosis**. *Obstetrics & Gynecology* 2005, **106**: 1013-1023.

Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, Swidsinski S, Dorffel Y, Scholze J, Lochs H, Verstraelen H: **An adherent *Gardnerella vaginalis* biofilm persists on the vaginal epithelium after standard therapy with oral metronidazole**. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 2008, **198**: 97-103.

Teixeira GS, Soares-Brandao KL, Branco KM, Sampaio JL, Nardi RM, Mendonca M, Almeida RB, Farias LM, Carvalho MA, Nicoli JR: **Antagonism and synergism in *Gardnerella vaginalis* strains isolated from women with bacterial vaginosis**. *Journal of Medical Microbiology* 2010, **59**: 891-897.

Turovskiy Y, Sutyak NK, Chikindas ML: **The aetiology of bacterial vaginosis**. *Journal of Applied Microbiology* 2011, **110**: 1105-1128.

Ugwumadu AH: **Bacterial vaginosis in pregnancy**. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2002, **14**:115-118.

Verstraelen H, Verhelst R: **Bacterial vaginosis: an update on diagnosis and treatment.** *Expert Rev Anti Infect Ther* 2009, **7**:1109-1124.

Vitali B, Biagi E, Brigidi P: **Diagnosis of Sexually Transmitted Diseases.** MacKenzie CR, Henrich B, eds. 2012, **903**:177-193.

Vitali B, Pugliese C, Biagi E, et al: **Dynamics of vaginal bacterial communities in women developing bacterial vaginosis, candidiasis, or no infection, analyzed by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and real-time PCR.** *Appl Environ Microbiol.* 2007, **73**(18):5731-41.

Wiesenfeld HC, Hillier SL, Krohn MA, et al: **Bacterial vaginosis is a strong predictor of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infection.** *Clin Infect Dis* 2003, **36**: 663–8.

Wilson DA, Joyce MJ, Hall LS, Reller LB, Roberts GD, Hall GS, Alexander BD, Procop GW: **Multicenter evaluation of a *Candida albicans* peptide nucleic acid fluorescent *in situ* hybridization probe for characterization of yeast isolates from blood cultures.** *J Clin Microbiol* 2005, **43**:2909–2912.

Winn WJ, et al.: **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology.** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006.

Zaraté G, Nader-Macias ME: **Influence of probiotic vaginal lactobacilli on *in vitro* adhesion of urogenital pathogens to vaginal epithelial cells.** *Letters in Applied Microbiology* 2006, **43**: 174-180.

Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ: **Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods.** *Microbiology* 2004, **150**: 2565–2573.

Zhou X, Brown CJ, Abdo Z: **Differences in the composition of vaginal microbial communities found in healthy Caucasian and black women.** *ISME J* 2007, **1**: 121–133.

Zozaya-Hinchliffe M, Lillis R, Martin DH, Ferris MJ: **Quantitative PCR assessments of bacterial species in women with and without bacterial vaginosis.** *Journal of Clinical Microbiology* 2010, **48**: 1812-1819.





# **CAPÍTULO 6**

---

## **Anexos**



**Anexos****Análise molecular- Extração de DNA, PCR e DGGE****Tampão fosfato salino (PBS)**

- 0.8 g NaCl
- 0.02 g KCl
- 0.144 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O
- 0.024 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

Perfazer até 100 ml com água Milli-Q e ajustar o pH a 7,4. Filtrar com um filtro estéril (0,2 µm). Autoclavar durante 15 min. a 121°C.

**Água para PCR**

Filtrar água Milli-Q utilizando filtros estéreis (0,2 µm) e autoclavar (121°C, 15 min.). Distribuir alíquotas de 1 ml em *ependorfs* estéreis numa câmara PCR/UV. Guardar a -20°C.

**Gel de agarose a 1% (w / v)**

Adicionar 0,25g de agarose por cada 25 ml de tampão 1x TAE. Aquecer no micro-ondas (sem ferver) até a solução clarear. Arrefecer a agarose a 55-65 °C e adicionar 1µl de corante (*syber safe*) por cada 25 ml de gel;

**Tampão TAE 50x (pH 8,3)**

- 242 g de Tris base
- 57,1 ml de ácido acético, glacial
- 100 ml de EDTA 0,5 M (pH 8,0)

Perfazer até 1 litro com dH<sub>2</sub>O. Autoclavar durante 20 min. Guardar à temperatura ambiente.

**Tampão de carga (*Loading Dye*)**

- 46,8 ml de glicerol 80%
- 76,7 ml de dH<sub>2</sub>O
- 1,5 ml de EDTA 0,5 M
- 0,15 g de azul de bromofenol
- 0,15 g de xileno cianol FF

**Persulfato de amónio a 10% (APS)**

- 1 g de persulfato de amónio
- 10 ml de dH<sub>2</sub>O

Distribuir alíquotas de 500 µl e armazenar a -20°C.

**Tabela 5.1** Preparação das soluções de desnaturação.

<b>Reagentes</b>	<b>Solução de desnaturaçãO 0%</b>	<b>Solução de desnaturaçãO 100%</b>
<b>40% acrilamida/bis 37.5:1</b>	200 ml	200 ml
<b>TAE 50x</b>	10 ml	10 ml
<b>Glicerol</b>	20 ml	20 ml
<b>Formamida</b>	-	400 ml
<b>Ureia</b>	-	421.6 g
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	até 1000 ml	até 1000 ml

**Persulfato de amônio a 10% (APS)**

- 1 g de persulfato de amônio

- 10 ml de dH<sub>2</sub>O

Distribuir alíquotas de 500 µl e armazenar a -20°C.