



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA**

**ANA RAQUEL COLARES DE ANDRADE**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE BIOFILME MICROCOSMOS**  
**PARA O ESTUDO DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

**FORTALEZA-CE**

**2018**

**ANA RAQUEL COLARES DE ANDRADE**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE BIOFILME MICROCOSMOS  
PARA O ESTUDO DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rossana de Aguiar Cordeiro

**FORTALEZA-CE**

**2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- A565d Andrade, Ana Raquel Colares de Andrade.  
DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE BIOFILME MICROCOSMOS PARA O ESTUDO  
DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL / Ana Raquel Colares de Andrade Andrade. – 2018.  
94 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2018.  
Orientação: Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro.
1. Candidíase vulvovaginal. 2. Biofilmes. 3. microcosmos. 4. Candida spp.. I. Título.
- CDD 616.9
-

**ANA RAQUEL COLARES DE ANDRADE**

**DESENVOLVIMENTO DE UM MODELO DE BIOFILME MICROCOSMOS  
PARA O ESTUDO DA CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rossana de Aguiar Cordeiro

Aprovada em: 21/12/2018.

BANCA EXAMINADORA:

---

Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Débora Castelo Branco de Souza Collares Maia  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Ana Karina Bezerra Pinheiro  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Rejane Pereira Neves  
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, minha esperança, minha alegria, minha fortaleza, de onde me provém tudo! Ele é bom o tempo todo!

A minha família, fonte de todo amor.

Aos meus pais, João Andrade e Maria Colares, por todo o esforço e dedicação em fazerem de mim quem sou hoje.

Aos meus irmãos, João Paulo e Ana Paula, por serem exemplos para mim.

Ao meu esposo, Natan Pinheiro, pela dedicação, amor, paciência, companheirismo, compreensão e suporte em todos os momentos.

Aos poucos e bons amigos que permitem partilhar de suas vidas comigo, para sermos e crescermos juntos.

A esta universidade, direção e administração que proporciona infinitas oportunidades de crescimento profissional e humano.

Aos professores do PPGMM pela oportunidade de aprender e crescer com seus ensinamentos.

Ao Centro Especializado de Micologia Médica e seu corpo docente, professores Júlio Sidrim, Marcos Fábio, Sâmia Brilhante, Débora Castelo-Branco e Rossana Cordeiro que tanto se esforçam no desenvolvimento deste Centro, em fornecer toda estrutura necessária para a realização dos trabalhos e para a nossa formação enquanto profissionais.

A minha orientadora professora Rossana Cordeiro, pela confiança, suporte, incentivo, exemplo de pessoa e profissional. Obrigada por sua orientação, por sua escuta, por estar sempre disponível e enxergar em nós o que muitas vezes nós mesmos não enxergamos.

A Gláucia Guedes e Terezinha de Jesus, pelo auxílio, acompanhamento e carinho.

A Silviane Praciano e professora Débora Castelo-Branco, por todo suporte, disponibilidade e incentivo no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do CEMM, em especial Rosana Serpa e Antônio de Jesus (Tony), que desde quando cheguei foram meu suporte, meu alívio, a quem eu sempre pude recorrer. Não hesitaram em partilhar de seus conhecimentos comigo, obrigada! Lívia Galdino e Fernando Monteiro, que são meus braços e minhas pernas. Sem o auxílio e a companhia de vocês, essa jornada seria muito mais difícil. Jonathas Sales, obrigada pelo seu suporte e paciência (às vezes), em nos ajudar, esclarecer e desenvolver nossos trabalhos.

Aos demais colegas do laboratório, pela partilha do tempo, das conversas, das angústias e alegrias.

Agradeço especialmente aos amigos que a Biologia me trouxe, Patrícia Bruna, Jonatas Franco e Luciana Furtado. Como é bom acompanhar o crescimento de cada um, celebrar as alegrias e partilhar das tristezas. Obrigada pelo imenso amparo que tenho em vocês!

À Dra. Estefânia Mota Araripe, pela sua paciência e ajuda na busca pelas amostras, por abrir espaço para que eu tivesse êxito neste trabalho.

À Mônica Sampaio e Simone Vasconcelos pelo enorme auxílio na colheita das amostras.

À todas as voluntárias que se dispuseram em auxiliar neste trabalho, doando suas amostras para análise.

Ao professor Reginaldo Lima, pelo auxílio com a identificação das cepas.

À Central Analítica da UFC, pela oportunidade de as análises microscópicas terem sido realizadas.

Aos órgãos de fomento, CNPQ, Capes, FUNCAP, pelo auxílio financeiro.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

“Não basta a pesquisa sem maravilhar-se,  
a ciência sem a caridade, a inteligência  
sem a humildade, o estudo sem a graça”

São Boaventura de Bagnoreggio

## RESUMO

Espécies do gênero *Candida* são organismos comensais da microbiota humana que, em situações de disbiose, expressam diversos fatores de virulência, tais como os biofilmes – comunidades microbianas como elevada resistência aos antimicrobianos e à imunidade do hospedeiro. Em mucosas, os biofilmes de *Candida* spp. se relacionam a infecções de grande relevância clínica-epidemiológica, como a candidíase vulvovaginal (CVV). O presente estudo objetivou estabelecer um modelo de biofilme microcosmos (BMi) *in vitro* para o estudo da CVV. No total, 11 amostras de secreção vaginal de pacientes com suspeita clínica de CVV foram empregadas nos testes. De 11, seis amostras clínicas foram utilizadas para determinar as condições ideais de formação do biofilme quanto à composição química do meio, temperatura, tempo de crescimento e atmosfera gasosa. Os resultados foram avaliados quanto ao número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL), atividade metabólica e biomassa. Em seguida, outras cinco amostras clínicas foram testadas na condição experimental elencada como a mais favorável ao crescimento microbiano para formação do BMi; as espécies de *Candida* spp. também foram isoladas para formação de biofilme monoespécie (BMo). Os modelos foram avaliados quanto ao número de UFC/mL, atividade metabólica e proteolítica, biomassa e sensibilidade ao fluconazol (FLC). Analisou-se ainda a morfologia dos BMi por microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal. O diagnóstico baseado em métodos fenotípicos, PCR e MALDI-TOF revelou que *C. albicans* (10/11) e *C. glabrata* (1/11) foram os agentes etiológicos dos casos de CVV investigados. Em ambos os modelos (BMi e BMo), as amostras clínicas e as culturas isoladas foram cultivadas em Meio Simulador de Fluido Vaginal a 35 °C por 48 a 72h, em microaerofilia. Os resultados mostraram menor concordância entre os valores de UFC/mL e atividade metabólica em BMi (1/5) que em BMo (5/5). A atividade proteolítica mostrou-se constante nos dois modelos de biofilme em todas as amostras (n=5). A quantificação da biomassa revelou valores maiores em BMi que em BMo em todas as amostras avaliadas (n=5). Os cultivos de BMi mostraram tolerância ao FLC até 128 µg/mL, com redução da viabilidade celular apenas na concentração 256 µg/mL. No modelo BMo a viabilidade foi reduzida em até 50% nas concentrações 256 e 512 µg/mL de FLC. As imagens revelaram o predomínio de *Candida* sp. no BMi – mesmo nas amostras que possuíam microbiota mista. O modelo proposto para o estudo de comunidades sésseis em microcosmos pode servir como plataforma para estudos *in vitro* a fim de melhor explicar a fisiopatologia da CVV.

**Palavras-chave:** Candidíase vulvovaginal, *Candida* spp., microcosmos, biofilme.



## ABSTRACT

*Candida* species are commensal of the human microbiota. When in dysbiosis, they express several virulence factors, such as biofilms. Biofilms are complex communities resistant to the host immunity and antibiotics. In human mucosa, *Candida* spp. biofilms are related to a large number of clinical and epidemiological relevance infections, such as vulvovaginal candidiasis (CVV). The present study aimed to establish a microcosm biofilm model (BMi) *in vitro* for the study of CVV. Overall, eleven vaginal secretion from patients CVV suspected were used for testes. Of 11, six samples were used to preliminary test aiming to determine the ideal chemical composition of the medium, temperature, growth time and atmospheric gases for biofilm formation. The results were evaluated for the number of colony forming units (CFU / mL), metabolic activity and biomass. Then, others five clinical samples were tested in a previously listed as the most favorable to microbial growth for BMi formation condition; the species of *Candida* spp. were also isolated for monospecies biofilm (BMo) formation. The models were evaluated for the number of CFU / mL, metabolic and proteolytic activity, biomass and susceptibility to fluconazole (FLC). The BMi morphology was also analyzed by scanning electron microscopy and confocal microscopy. The diagnosis based on phenotypic methods, PCR and MALDI-TOF revealed that *C. albicans* (10/11) and *C. glabrata* (1/11) were the etiological agents of the CVV cases investigated. In both models (BMi and BMo), clinical samples and isolated cultures were grown in Vaginal Fluid Simulator Medium at 35 °C for 48 to 72 hours in microaerophilic cells. The results showed lower concordance between the values of CFU / mL and metabolic activity in BMi (1/5) than BMo (5/5). The proteolytic activity was constant in both biofilm models in all samples (n = 5). Biomass quantification revealed higher value in BMi than in BMo in all the samples analyzed (n = 5). BMi cultures showed tolerance to FLC up to 128 µg / mL, with reduction of cell viability only at the concentration of 256 µg / mL. In the BMo model the viability was reduced by up to 50% in the concentrations 256 and 512 µg / mL of FLC. The images revealed the predominance of *Candida* sp. in BMi - even in the samples that had mixed microbiota. The proposed model for the study of sessile communities in microcosms can be useful as a platform for *in vitro* studies to improve the pathophysiology explanation and understanding of CVV.

**Keywords:** vulvovaginal candidiasis, *Candida* spp., microcosm, biofilm.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Abundância de taxons dos grupos de microbiota vaginal encontrados em mulheres em idade reprodutiva nos EUA.....	19
<b>Figura 2</b> – O micobioma humano. Genomas fúngicos encontrados em diversos sítios anatômicos do corpo humano.....	20
<b>Figura 3</b> – Aspectos clínicos da candidíase vulvovaginal.....	22
<b>Figura 4</b> – Prevalência global da candidíase vulvovaginal de recorrência por 100.000 mulheres (15-54 anos) em 2013.....	25
<b>Figura 5</b> – Visualização de esfregaço de amostra vaginal com quadro característico de CVV.....	26
<b>Figura 6</b> – Blastocónídios de <i>C. albicans</i> observados por microscopia eletrônica de varredura.....	29
<b>Figura 7</b> – Diferenciação dos morfotipos apresentados pelo gênero <i>Candida</i> .....	30
<b>Figura 8</b> – Aspecto micromorfológico de <i>C. albicans</i> em ágar <i>Corn Meal</i> com Tween 80.....	31
<b>Figura 9</b> – Provas bioquímicas para identificação de espécies do gênero <i>Candida</i> .....	32
<b>Figura 10</b> – Estágios de maturação dos biofilmes em espécies de <i>Candida</i> .....	37
<b>Figura 11</b> – Mecanismos de resistência nos biofilmes fúngicos.....	38
<b>Figura 12</b> - Desenho experimental do desenvolvimento do modelo de biofilme em microcosmos e monoespécie de <i>Candida</i> spp. isoladas de pacientes com CVV.....	43
<b>Figura 13</b> – Amostras clínicas de pacientes com CVV visualizadas em lâmina corada pelo método de Gram. Aumento 1.000x.....	52

- Figura 14 –** Corrida eletroforética dos isolados de *Candida* spp. provenientes de pacientes com CVV..... 56
- Figura 15 -** Imagem de microscopia eletrônica de varredura obtida a partir de biofilme microcosmos..... 72
- Figura 16-** Imagem de microscopia confocal obtida a partir de biofilme microcosmos. Magnitude 600x..... 74

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Capacidade de formação de biofilme em meios VFS e MSFV em cepas clínicas *C. albicans* provenientes de amostras vaginais..... 58
- Gráfico 2** – Número de unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) obtidas nos biofilmes microcosmos crescidos em Sabouraud com cloranfenicol e biofilmes monoespécie cultivados em Ágar Batata..... 64
- Gráfico 3** – Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) obtidas em zero hora, 48 e 72 horas em biofilme microcosmos e monoespécie crescidos em Sabouraud com cloranfenicol e Ágar Batata..... 64
- Gráfico 4** – Atividade metabólica do biofilme microcosmos e monoespécie em 48 e 72 horas. Leitura feita em comprimento de onda de 492 nm..... 65
- Gráfico 5** – Atividade metabólica no período de 48 a 72 horas de biofilme microcosmos e monoespécie. Leitura feita em comprimento de onda de 492 nm..... 66
- Gráfico 6** – Biomassa do biofilme microcosmos e monoespécie em 48 e 72 horas. Leitura realizada em comprimento de onda de 590 nm..... 67
- Gráfico 7** – Biomassa no intervalo de 48 para 72 horas dos biofilmes microcosmos e monoespécie. Leitura feita em comprimento de onda de 590 nm..... 67
- Gráfico 8** – Atividade proteolítica dos biofilmes microcosmos e monoespécie em 48 e 72 horas. Leitura feita em comprimento de onda de 440 nm..... 68

<b>Gráfico 9</b> – Atividade proteolítica de 48 para 72 horas nos biofilmes microcosmos e monoespécie. Leitura feita em comprimento de onda de 440 nm.....	68
<b>Gráfico 10</b> – Perfil de sensibilidade ao FLC de biofilmes microcosmos e monoespécie formados em 48 horas de cultivo.....	70

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Média do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e seus desvios-padrões ( $\pm$ SD) em amostras de secreção vaginal de pacientes com CVV.....	54
<b>Tabela 2</b> – Identificação por MALDI-TOF das espécies de <i>Candida</i> nas amostras clínicas de pacientes com CVV.....	56
<b>Tabela 3</b> – Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de FLC e AMB frente aos isolados de <i>Candida</i> spp. oriundos de pacientes com CVV.....	57
<b>Tabela 4</b> - Amostras de secreção vaginal de pacientes com CVV (n=11), em quais testes foram empregadas e identificação de <i>Candida</i> sp. presente na amostra.....	57
<b>Tabela 5</b> – Número de unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL) e morfotipos predominantes obtidos partir do cultivo da amostra 2401 por 24 horas em aerobiose a 35 °C nos meios BHI ( <i>Brain Heart Infusion Agar</i> ), CHR ( <i>Chromagar Candida</i> ) e MAC ( <i>MacConkey</i> ).....	59
<b>Tabela 6</b> – Número de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) nas amostras clínicas 2401 e 282 e em biofilmes microcosmos originados dessas amostras após 24 e 48h de cultivo em microaerofilia a 35°C no meio MSFV.....	61
<b>Tabela 7</b> – Número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) nas amostras clínicas 272 e 063 e em biofilmes microcosmos originados dessas amostras após 48 e 72h de cultivo em microaerofilia 35°C no meio MSFV.....	62

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	17
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	18
<b>2.1</b>	<b>Microbiota e o gênero <i>Candida</i></b>	18
<b>2.2</b>	<b>Candidíase vulvovaginal</b>	22
<b>2.2.1</b>	<b><i>Fatores predisponentes</i></b>	23
<b>2.2.2</b>	<b><i>Aspectos clínico-epidemiológicos</i></b>	24
<b>2.2.3</b>	<b><i>Diagnóstico</i></b>	26
<b>2.2.4</b>	<b><i>Tratamento</i></b>	26
<b>2.3</b>	<b><i>Candida spp</i></b>	27
<b>2.3.1</b>	<b><i>Aspectos morfológicos e diagnóstico laboratorial</i></b>	28
<b>2.3.2</b>	<b><i>Patogenia e Fatores de virulência</i></b>	32
<b>2.3.2.1</b>	<b><i>Biofilmes</i></b>	35
<b>2.3.2.2</b>	<b><i>Biofilmes de <i>Candida spp.</i> em mucosas</i></b>	39
<b>2.3.2.3</b>	<b><i>Biofilmes microcosmos</i></b>	39
<b>3</b>	<b>HIPÓTESES</b>	42
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b>	42
<b>4.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	42
<b>4.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	42
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	43
<b>5.1</b>	<b>Desenho experimental</b>	43
<b>5.2</b>	<b>População de estudo</b>	44
<b>5.3</b>	<b>Caracterização das amostras</b>	44
<b>5.4</b>	<b>Processamento e isolamento de <i>Candida spp</i></b>	44
<b>5.5</b>	<b>Identificação de <i>candida spp</i></b>	45
<b>5.6</b>	<b>Sensibilidade planctônica de <i>Candida spp.</i> Isoladas de secreções vaginais frente ao fluconazol e anfotericina B</b>	46
<b>5.7</b>	<b>Biofilme microcosmos</b>	47
<b>5.7.1</b>	<b><i>Formação do biofilme microcosmos</i></b>	47
<b>5.7.2</b>	<b><i>Caracterização do biofilme microcosmos</i></b>	47
<b>5.8</b>	<b>Biofilme <i>in vitro</i> de <i>Candida spp.</i> isoladas das secreções vaginais</b>	49

5.9	Análise estatística.....	50
6	RESULTADOS.....	51
6.1	População de estudo.....	51
6.2	Caracterização da amostra clínica.....	51
6.2.1	<i>Visualização da lâmina corada pelo método de Gram.....</i>	51
6.2.2	<i>Unidades formadoras de colônia da amostra (UFC/mL).....</i>	53
6.3	Identificação de <i>Candida spp.</i> .....	54
6.3.1	<i>Crescimento em meio cromogênico.....</i>	55
6.3.2	<i>Prova do microcultivo.....</i>	55
6.3.3	<i>Assimilação de carboidrato.....</i>	55
6.3.4	<i>Identificação de <u>Candida spp.</u> por PCR.....</i>	55
6.3.5	<i>Identificação de <u>Candida spp.</u> por MALDI-TOF.....</i>	56
6.4	Sensibilidade planctônica dos isolados de <i>Candida spp.</i> .....	56
6.5	Biofilme microcosmos.....	57
6.5.1	<i>Testes para estabelecimento do modelo in vitro.....</i>	57
6.5.2	<i>Caracterização do biofilme microcosmos e monoespécie de <u>Candida spp.</u>.....</i>	63
7	DISCUSSÃO.....	77
8	CONCLUSÕES.....	83
	REFERÊNCIAS.....	84
	APÊNDICES.....	90
	APÊNDICE A–Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	90
	APÊNDICE B – Questionário aplicado com as voluntárias.....	92
	ANEXOS.....	93
	ANEXO A – Composição dos meios de cultivo.....	93
	ANEXO B – Artigo submetido.....	94



## 1. INTRODUÇÃO

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma condição patogênica na qual espécies de *Candida* estabelecem-se como patógenos na mucosa vaginal ocasionando sintomas de vaginite. A CVV é a segunda infecção vaginal mais relatada entre as mulheres e acomete aproximadamente 75% delas ao menos uma vez na vida (BRADFORD e RAVEL, 2017). As leveduras do gênero *Candida* compõem a microbiota humana e são encontradas nas mucosas dos tratos gastrointestinal e geniturinário, cavidade oral e pele (GONÇALVES et. al, 2015). A disbiose que se origina de um desequilíbrio entre a microbiota residente e a resposta imune do hospedeiro contribui para o estabelecimento de *Candida* spp. como patógenos (CAUCHIE et. al, 2017).

*Candida* spp. expressam fatores de virulência que são determinantes para o desenvolvimento da CVV. Dentre eles, estão a adesão às células epiteliais, por meio da interação entre mananoproteínas da parede celular e receptores específicos no hospedeiro; o pleomorfismo; a liberação de enzimas proteolíticas e capacidade de formação de biofilmes, os quais protegem as células sésseis de fatores externos como a resposta imune do hospedeiro e ação dos antimicrobianos (MEDEIROS et. al, 2017; MAJUMDAR et. al, 2018; CAVALHEIRO e TEIXEIRA, 2018). A formação de biofilme por *C. albicans* no epitélio vaginal foi demonstrada pela primeira vez por Harriot e colaboradores (2010); segundo os autores, este é um fator crucial no estabelecimento da CVV.

Os biofilmes podem ser analisados em estudos *in vitro* e *in vivo*. As pesquisas *in vitro* envolvem fatores bem regulados, que os distanciam das situações reais que ocorrem no hospedeiro (STEPANOVIC et. al, 2007). Os estudos *in vivo*, por sua vez, exigem modelos experimentais bem definidos, que levam em conta o microambiente e a fisiologia do hospedeiro (LEBEAUX et. al, 2013). Biofilme microcosmos é definido como um modelo experimental apresentado alternativamente para suprir as limitações do estudo *in vitro* quanto à mimetização do cenário da infecção. Esse tipo de análise envolve comunidades multiespécies, com suas interações, a partir da utilização do material biológico do sítio de infecção para a formação do biofilme (LEBEAUX et. al, 2013).

Diante do exposto o presente estudo objetivou estabelecer e caracterizar um modelo de biofilme microcosmo para o estudo da candidíase vulvovaginal, a fim de contribuir para o melhor entendimento dos aspectos microbiológicos da CVV e novas estratégias de controle da doença.

## REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Microbiota e o gênero *Candida*

O termo microbiota é empregado para definir o conjunto de grupos microbianos que colonizam um indivíduo. Nas últimas décadas, os cientistas têm se voltado atenciosamente para o estudo da microbiota e sua relação com o hospedeiro. Sabe-se que a microbiota é cada vez mais apreciada como um componente fundamental na fisiologia humana, visto que está intrinsecamente relacionada com os processos digestivos, fatores comportamentais e com algumas condições patológicas, como a obesidade e depressão. (UNDERHILL e ILIEV, 2014).

A microbiota vaginal, por sua vez, contribui fortemente para a manutenção da homeostase deste ambiente, impedindo a proliferação de micro-organismos patogênicos (LINHARES et al., 2010). A composição da microbiota vaginal não é constante, ela é influenciada por fatores exógenos e endógenos como a idade, período menstrual, gravidez, uso de antibióticos, aspectos ambientais e comportamentais do hospedeiro (GODHA et al., 2018; CAUCHIE et al., 2017).

Os primeiros estudos relacionados à microbiota vaginal foram realizados por *Albert Döderlein*, em 1892. *Döderlein* foi um ginecologista e obstetra alemão que primeiro descreveu e identificou a presença de bacilos Gram positivos, posteriormente identificados como bactérias do gênero *Lactobacillus*, em amostras vaginais, caracterizando esse gênero com a capacidade de produzir ácido lático através da fermentação do glicogênio (GODHA et al., 2018).

Os lactobacilos são os componentes predominantes na microbiota saudável de mulheres em idade reprodutiva, compreendendo cerca de 70% dos micro-organismos comensais na vagina (GODHA et al., 2018; WIJGERT et al., 2014). Esse grupo desenvolvem um papel protetor importante, além de produzir ácido lático, que mantém o pH vaginal ácido, também possui espécies que podem produzir peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, que impedem a proliferação de outros patógenos bacterianos (RAVEL et al., 2011; LINHARES et al., 2010).

As principais espécies de lactobacilos identificadas no ecossistema vaginal são *Lactobacillus crispatus*, *L. inners* e *L. gasseri*. *L. jensinii*, *L. gallinarum* e *L. vaginalis*. No entanto, a microbiota vaginal de mulheres assintomáticas pode ser constituída por outras espécies também produtoras da ácido lático, como *Atopobium* spp., *Megasphaera* spp. ou *Leptotrochia* spp. (WIJGERT et al., 2014; LINHARES et al., 2010).

Um estudo de Ravel et al. (2011) demonstrou as flutuações da microbiota vaginal entre mulheres em idade reprodutiva no EUA. A composição de espécies foi caracterizada por pirosequenciamento dos genes 16S rRNA. As comunidades agruparam-se em cinco grupos, quatro foram dominadas por *Lactobacillus iners*, *L. crispatus*, *L. gasseri* ou *L. jensenii*, e o quinto apresentou menores proporções de lactobacilos e maiores proporções de organismos estritamente anaeróbicos, indicando uma potencial função ecológica chave: a produção de ácido láctico, que parece ser conservada em todas as comunidades (figura 1).

**Figura 1** – Abundância de taxons dos grupos de microbiota vaginal encontrados em mulheres em idade reprodutiva nos EUA.

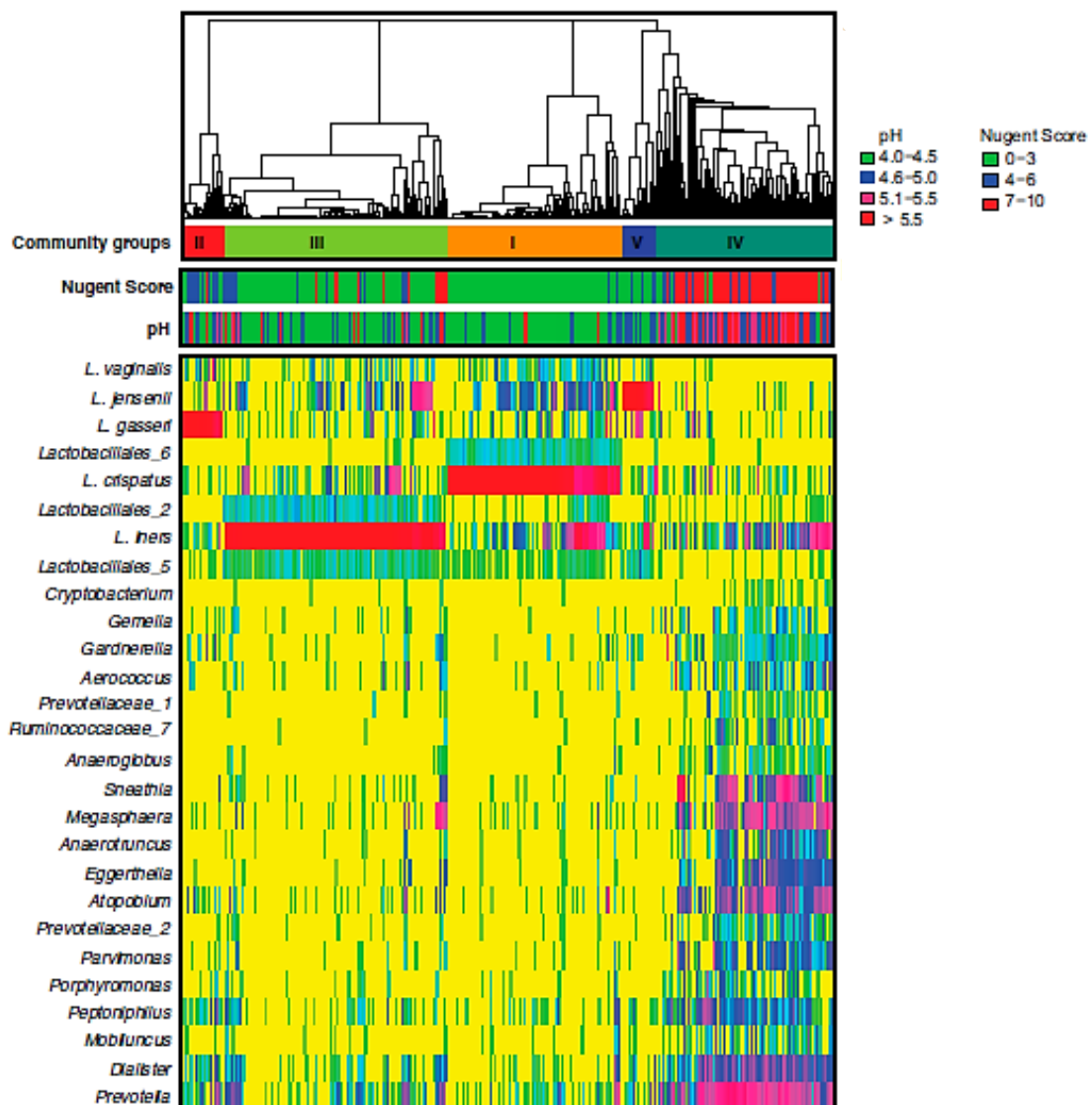


Figura 1: I-*Lactobacillus crispatus*, II-*L. gasseri*, III-*L. iners*, V-*L. jensenii* e IV- outros grupos microbianos (*Atopobium* spp., *Megasphaera* spp, *Mobiluncus* spp., *Prevotella* spp.). Fonte: Ravel et al. (2011)

Os fungos são considerados integrantes menos abundantes da microbiota vaginal. Apesar de superado em número pelos componentes bacterianos da microbiota, os fungos são elementos importantes do ecossistema vaginal (BRADFORD e RAVEL, 2017). Underhill e Iliev (2014) apresentaram a constituição de genomas fúngicos encontrados em diversas partes do corpo humano (figura 2) usando alvos como as regiões 28S e 18S (rDNA) do DNA ribossomal e as regiões de *internal transcribed spacers* (ITS). Os fragmentos de DNA achados na microbiota vaginal são, majoritariamente, dos gêneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Aspergillus*, *Alternaria* e *Cladosporium* (UNDERHILL e ILIEV, 2014). *Candida* spp. possui predominância de isolamento, presente em cerca de 64% dos indivíduos (CAUCHIE et al., 2017).

**Figura 2** – O microbioma humano. Genomas fúngicos encontrados em diversos sítios anatômicos do corpo humano.

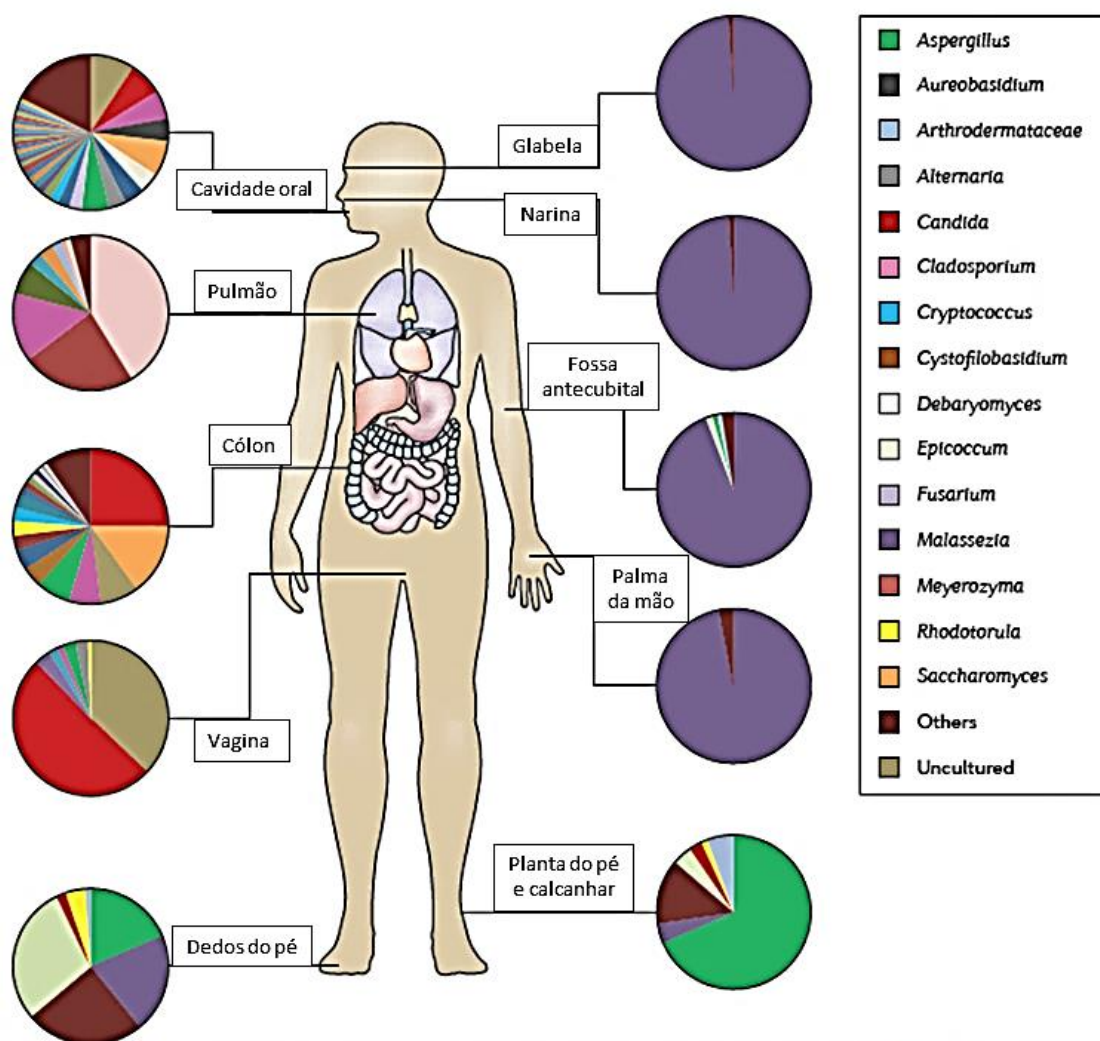


Figura 2: Os gráficos indicam as proporções relativas de gêneros de fungos relatados em estudos de sequenciamento. “Others” na legenda refere-se a sequências representando menos de 1% do total de

sequências recuperadas em cada local. “*Uncultured*” na legenda refere-se a sequências identificadas no GenBank como fungo, mas de origem não caracterizada. No sítio vaginal, o gênero de prevalência é *Candida* spp., que também é encontrada em outros sítios como a cavidade oral, cólon e superfície do pé. Fonte: Traduzido de Underhill e Iliev, 2014.

Micro-organismos do gênero *Candida* fazem parte da microbiota de até 70% dos indivíduos, sendo encontrados principalmente nas mucosas dos trato gastrointestinal e genito-urinário, cavidade oral e pele (figura 2) (CAUCHIE et al., 2017; UNDERHILL e ILIEV, 2014). Fatores como a regulação pelo sistema imune (produção de citocinas); presença de produtos metabólicos (lactato); o ambiente vaginal (altas taxas de ácido láctico e pH baixo); microbiota predominante de lactobacilos; presença de substâncias químicas (bacteriocinas e interações físicas) influenciam para que *Candida* spp. mantenha-se em baixos níveis no trato vaginal, atuando como um organismo comensal (BRADFORD e RAVEL, 2017; CAUCHIE et al., 2017). Porém, quando um desses fatores, ou o conjunto deles, é alterado, propiciam *Candida* spp. a emergirem como patógenos em potencial, causando a candidíase vulvovaginal (CAUCHIE et al., 2017).

A disbiose, expressão usada pela primeira vez por *Eli Metchnikoff* em 1908, foi um termo associado a alterações de composição e função da microbiota intestinal que podem levar à alguma condição patogênica. No entanto, o uso desse conceito se expandiu para referir-se a um desequilíbrio na composição e função da microbiota no hospedeiro em sítios anatômicos, que não só o trato gastrointestinal, que podem favorecer o surgimento de infecções. A microbiota em disbiose pode influenciar ativamente seu nicho de localização, alterando funções na imunidade inata e adaptativa. Esse fenômeno está associado a muitas doenças, no entanto, não se sabe ainda se a disbiose é causa ou consequência das doenças (LEVY et al., 2017; UNDERHILL e ILIEV, 2014).

Wijgert e Jaspers (2017) definem a disbiose no ecossistema vaginal como uma microbiota não dominada por lactobacilos. A disbiose mais comumente encontrada no ambiente vaginal é a vaginose bacteriana (VB), uma disbiose anaeróbica e polibacteriana, que ocasionalmente, causa condições sintomáticas. Outros estados disbióticos são exemplificados com a presença abundante de estreptococos, estafilococos ou enterobactérias, como *E. coli*, além de doenças como a candidíase vaginal e tricomoníase. Ainda, a disbiose vaginal é associada ao aumento de doença inflamatória pélvica, partos prematuros e infecções neonatais (WIJGERT e JESPERS, 2017).

## 2.2 Candidíase vulvovaginal

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma condição patogênica na qual a levedura do gênero *Candida*, oportunisticamente, estabelece-se na mucosa do trato vaginal ocasionando sintomas clínicos que causam desconforto e irritação locais. Os sintomas mais comuns da candidíase são prurido, leucorreia, irritação vulvar, dispareunia e disúria, sendo o prurido o sintoma mais comum (figura 3) (BRADFORD e RAVEL, 2017; CASSONE, 2014).

A CVV é a segunda infecção vaginal mais relatada entre o público feminino, sendo diagnosticada em até 40% das mulheres com queixas vaginais, superada apenas pela VB (BRADFORD e RAVEL, 2017; CAUCHIE et al., 2017). Cerca de 75% das mulheres experimentam pelo menos um episódio de CVV durante o menacma e 5 a 10% destas sofrem de candidíase na sua forma recorrente - definida quando há quatro ou mais episódios da doença no período de um ano (CASSONE, 2014; SOBEL, 2014).

**Figura 3** - Aspectos clínicos da candidíase vulvovaginal.

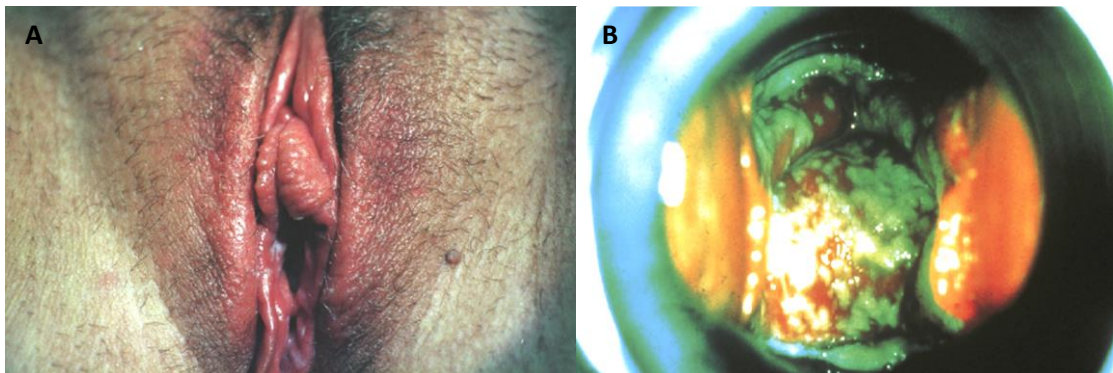


Figura 3: Em A, observa-se uma vulvite típica da CVV, com eritema e inchaço dos lábios e vulva. Em B, observa-se eritema da mucosa vaginal com placas esbranquiçadas e presença de corrimento.  
Fonte: Sobel (2014).

Estudos prévios associavam o aumento da colonização por *Candida* spp. e a ocorrência de vaginite a mudanças na microbiota vaginal, com declínio do domínio de lactobacilos e aumento da colonização por outras bactérias e/ou fungos. Todavia, alguns estudos relatam que a colonização vaginal com *Candida* spp. é mais comum em mulheres com microbiota vaginal dominada por lactobacilos do que em mulheres com microbiota composta por outros grupos bacterianos, que não os micro-organismos fermentadores de ácido láctico (WIJGERT et al., 2014).

### 2.2.1 Fatores predisponentes

Diversos fatores estão associados com o aumento da colonização e vaginite por *Candida* spp., tais como idade, gravidez, diabetes mellitus não controlada, uso de contraceptivos orais, corticoides, antimicrobianos, dispositivos intrauterinos, uso de roupas íntimas de tecido sintético, alta frequência de relações sexuais, ingestão de açúcares em grandes quantidades e infecção por HIV. Fatores endógenos também são determinantes, como a elevada concentração de glicogênio do meio vaginal, diminuindo o pH local, e altos níveis de produção hormonal (MTIBAA et al., 2017; SOBEL, 2014; ÁLVARES et al., 2007). A seguir, são descritos com maiores detalhes alguns desses fatores.

A idade é um fator importante na incidência da doença. Mulheres entre 25 e 34 anos são as mais afetadas (SOBEL e SOBEL, 2018), pois o período reprodutivo, com a ação dos hormônios esteroides, favorecem a infecção por *Candida* spp. De fato, vários estudos relatam a influência da presença de estrogênio e progesterona na adesão, crescimento e formação de tubo germinativo em *C. albicans* (ALVES et al., 2014). A CVV é rara antes da menarca e no período da menopausa, a menos que a mulher faça terapia de reposição hormonal, aumentando, assim, o risco de infecção por *Candida* spp. A CVV também é comum durante a gravidez, principalmente no último trimestre da gestação (MTIBAA et al., 2017).

A CVV não é considerada uma infecção sexualmente transmissível (IST) clássica, pois ela acomete mulheres que não têm relações sexuais e também porque espécies de *Candida* são constituintes da microbiota vaginal. No entanto, a doença é evidentemente relacionada com o início da atividade sexual (SOBEL, 2014).

O uso de contraceptivos, como contraceptivos orais ou dispositivos intrauterinos também aumenta o risco de infecção por *Candida* spp. O primeiro devido à ação hormonal e o segundo devido à possibilidade de adesão e formação de biofilmes de *Candida* spp. no dispositivo (ÁLVARES et al., 2007).

O uso de antimicrobianos também é relatado no aumento da possibilidade de acometimento da CVV. O uso de antibióticos de amplo espectro, principalmente beta-lactâmicos reduz a microbiota bacteriana, que na vagina, possui papel protetor muito importante, facilitando o aumento da colonização por *Candida* spp. Além disso, estudos recentes evidenciam que os antibióticos beta-lactâmicos aumentam o crescimento e patogênese de *C. albicans* (CORDEIRO, 2018).

### 2.2.2 Aspectos clínico-epidemiológicos

A CVV pode ser classificada em não complicada (em 90% dos casos) e complicada/ recorrente. A CVV não complicada possui uma severidade branda a moderada, com frequência esporádica, sendo *C. albicans* o agente etiológico mais isolado, típica em hospedeiros imunocompetentes. Já a CVV complicada ou de recorrência é severa, recorrente (quatro ou mais episódios/ano) e outras espécies de *Candida* podem emergir como agentes etiológicos, geralmente acometendo hospedeiros com alguma debilidade no estado imune (SOBEL, 2014). Além do sofrimento clínico e da alta morbidade, tanto a CVV descomplicada como a CVVR trazem enormes custos para os pacientes e para a saúde. Nos EUA, o ônus econômico da perda de produtividade chega a US\$ 14 bilhões anuais (SOBEL e SOBEL, 2018).

*Candida albicans* é a espécie com maior taxa de isolamento das vaginites ocasionadas por *Candida* spp., aproximadamente 90%. Contudo, episódios causados por espécies não-*C. albicans* vem crescendo, tanto em pacientes imunocompetentes, quanto em imunodeficientes. As espécies não-*C. albicans* mais comumente isoladas são *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis* (MTIBAA et.al, 2017). Uma das razões para esse fato é devido ao aumento do uso de antifúngicos de forma inadequada, com terapia incompleta, eliminando *C. albicans* mais sensíveis e selecionando espécies não -*albicans* mais resistentes aos azólicos (SOBEL, 2014).

Estudo publicado no ano de 2018 por Bitew e Abebaw retrata a distribuição de espécies de *Candida* associada aos fatores de risco e perfil de sensibilidade dos isolados em uma população da Etiópia. Foram isoladas 87 espécies de *Candida*, 58,6% foram identificadas como *C. albicans* e 41,4% como espécies não-*C. albicans*, como *C. krusei*, *C. dubliniensis* e *C. glabrata*.

Outro estudo epidemiológico realizado em uma população tunisiana por Mtibaa e colaboradores (2018) evidenciou alta frequência de isolamento de *C. albicans* (76,61%) das amostras positivas, seguida por *C. glabrata* (17,18%). Nesse estudo, foram coletados 2160 swabs, tendo 710 deles (32,87%) cultura positiva para *Candida* sp.

No Brasil, estudo epidemiológico conduzido por Brandolt et al. (2018) avaliou vários parâmetros em 263 pacientes do estado do Rio Grande do Sul e, dentre estes, foi observado idade média de 28,5 anos, para a ocorrência de CVV e o uso de contracepção hormonal em 54,7 % das pacientes. Do total de 263 pacientes, em 71 delas foi possível isolar *Candida* spp., sendo diagnosticada a CVV em 35. Das pacientes com CVV, *C. albicans* foi identificada em 74% dos casos, seguido de *C. glabrata* (8,6%).

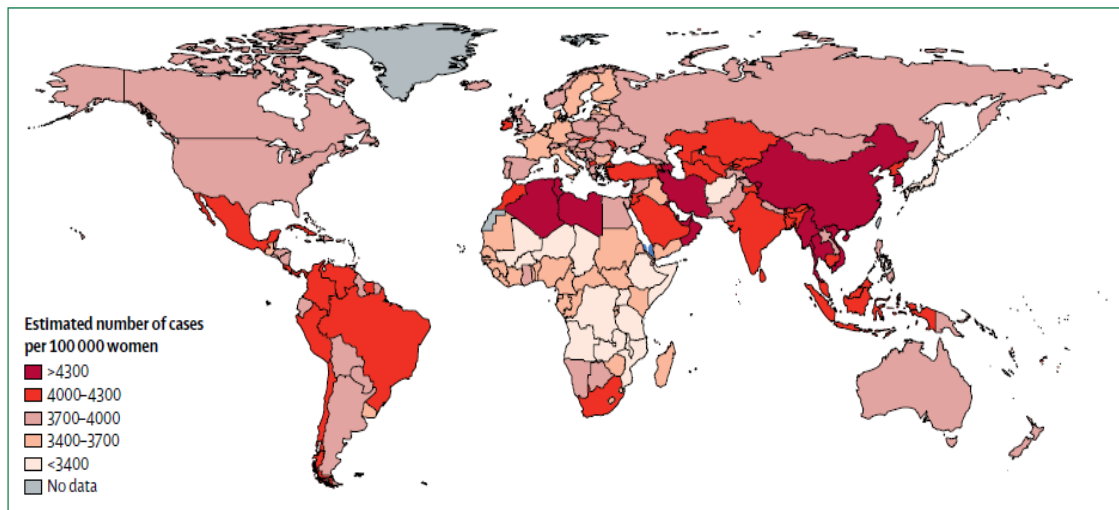


Fornari, et al. (2016), em estudo realizado no Paraná, fizeram uma caracterização molecular de isolados de pacientes com idade entre 18 e 55 anos, 20 colonizadas por *Candida* spp. e 20 com CVV, e constataram entre os isolados avaliados, a prevalência de *C. albicans* em 82,5 % dos isolados, seguido por *C. glabrata*, em 7,5 % do isolados.

Em outro estudo, Boatto et al. (2016) isolaram 40 cepas de *Candida* spp. em 168 pacientes com suspeita clínica de CVV, onde *C. albicans*, foi a espécie prevalente (70% dos isolados), seguida por *C. glabrata* (20%). *C. albicans* aparece como a espécie prevalente em casos moderados, e nos casos severos foram isoladas espécies não – *albicans*.

A candidíase vulvovaginal de recorrência (CVVR) acomete até 10% da população que já teve CVV. Denning et al. (2018) fizeram um estudo sistemático que avaliou a distribuição da CVVR em todo o mundo. Eles estimam que mais de 1 milhão de mulheres em todo o mundo sofram de CVVR, com uma prevalência de 3.871/100.000 mulheres entre 15-54 anos. Países com maior densidade demográfica feminina foram os prevalentes nas ocorrências de CVVR. No Brasil a taxa de prevalência é de 3.589/100.000 mulheres (figura 4).

**Figura 4** - Prevalência global da candidíase vulvovaginal de recorrência por 100.000 mulheres entre 15 – 54 anos em 2013.



Fonte: Denning et al. (2018).

### 2.2.3 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da CVV ocorre pela visualização em lâmina à fresco, com KOH (10%) ou esfregado da secreção vaginal corada pelo método de Gram, observando-se a presença de blastoconídios e pseudo-hifas livres ou aderidos às células epiteliais (figura 5). Esse método possui uma sensibilidade de diagnóstico de 40-60%. Em paralelo ao exame microscópico, recomenda-se fazer o cultivo da secreção vaginal para identificação da espécie de *Candida* presente na amostra. Esse fato é importante principalmente se a etiologia for de *Candida* não-*C. albicans* (WIJGERT et al., 2014; SOBEL, 2014).

**Figura 5** - Visualização de esfregado de amostra vaginal com quadro característico de CVV.

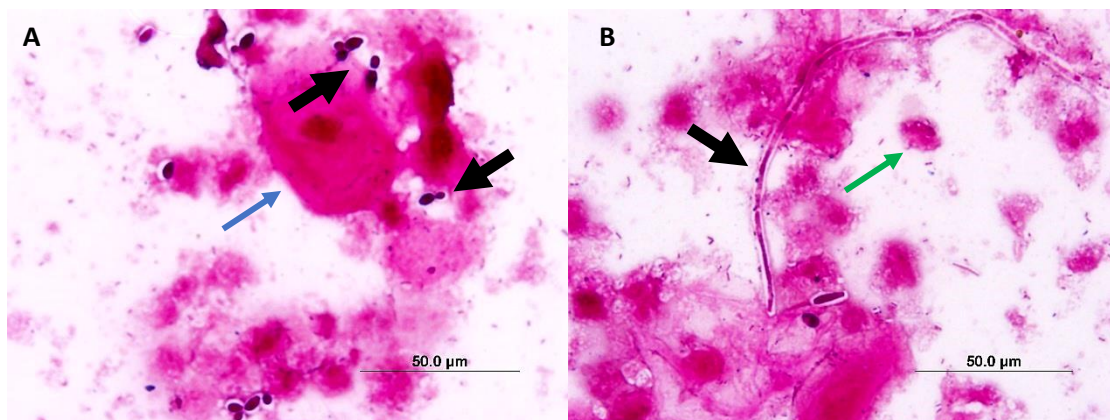


Figura 5: As imagens mostram esfregado de conteúdo vaginal corado por coloração de Gram e visualizado ao microscópio óptico com aumento de 1000x. Em A (seta) observa-se a presença de microbiota mista e blastoconídios. Em B, a presença de pseudo-hifas (seta) característicos de *Candida* sp. Observa-se também a presença de células epiteliais (seta azul) e núcleos desnudos de células polimorfonucleares (seta verde).

Fonte: CEMM, 2018 (foto tirada pela autora)

### 2.2.4 Tratamento

O regime de tratamento para a CVV e CVVR é realizado principalmente com antifúngicos azólicos, como o clotrimazol, miconazol, fluconazol, itraconazol e poliênicos, como a nistatina (SOBEL, 2014).

Os azóis são um grupo de compostos sintéticos que possuem estrutura química semelhante. São divididos em imidazóis (clotrimazol e miconazol) e triazóis (fluconazol e itraconazol). Esses dois grupos possuem o mesmo mecanismo de ação, intereferem na síntese do ergosterol, bloqueando a enzima 14- $\alpha$ -demetilase, no citocromo P450 da célula fúngica e, conseqüentemente, impedindo a conversão do lanosterol em ergosterol. Os

dois grupos diferem pelo fato de os triazóis serem metabolizados mais lentamente no organismo e terem um efeito menor sob a síntese dos ergosteróis humanos. Na CVV os azólicos podem ser usados em terapias orais ou tópicas, com até 90% de cura clínica (SOBEL, 2014; BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012; SIDRIM e ROCHA, 2004).

A nistatina faz parte do grupo dos macrolídeos poliênicos, em que se inclui também a anfotericina B. A ação primária desse antifúngico é alterar a permeabilidade celular da membrana fúngica. Eles ligam-se ao ergosterol presente na membrana plasmática, formando poros, que resultam no aumento da sua permeabilidade e na perda de íons importantes, que prejudica sua homeostase. O tratamento da vaginite causada por *Candida spp.*, é feito com a terapia tópica. O uso da nistatina em creme, atinge uma taxa de cura clínica de até 80%, levemente inferior ao tratamento com os azólicos (SOBEL, 2014; SIDRIM E ROCHA, 2004).

O Guia de Prática Clínica no manejo da candidíase, emitido pelo *Infections Diseases Society of America* (2016) preconiza o uso de antifúngicos de uso tópico para o tratamento da candidíase não complicada (clotrimazol, miconazol, entre outros). Alternativamente, a ingestão oral de fluconazol (150mg/ dose única) ou itraconazol (200mg/dia por três dias ou 400mg/dose única) também é relatada como eficaz na cura clínica da CVV. Para o tratamento de espécies de *Candida não-albicans*, como *C. glabrata*, o tratamento é realizado com ácido bórico intravaginal tópico ou nistatina em supositórios intravaginais, com período de tratamento de 14 dias (PAPPAS et al., 2016; SOBEL, 2014). Sobel (2014) relata o efeito satisfatório no uso de curta duração ou em dose única, igualmente, os resultados da terapia oral demonstram ser melhores à terapia tópica.

A CVVR necessita de um tempo maior de tratamento e profilaxia, objetivando o controle da infecção, ao invés da cura (SOBEL, 2014). A terapia oral é a mais indicada, com o uso diário de fluconazol, de 10 a 14 dias, e posteriormente, a ingestão semanal (150 mg/dose) do referido azólico durante seis meses (PAPPAS et al., 2016; SOBEL, 2014).

### **2.3 *Candida spp.***

Doenças ocasionadas por organismos do gênero *Candida* são descritas desde o ano 400 A.C, quando o médico grego Hipócrates relatou, pela primeira vez, a presença de placas esbranquiçadas na cavidade oral de um recém-nascido. O primeiro registro

documentado de isolamento de *Candida* sp. foi em 1839, quando *Langenbeck* isolou e descreveu o gênero *Candida* (ODDS,1988)

No século XIX, os estudos foram direcionados a identificação de espécies do gênero e sua relação com a candidíase oral e outras doenças, como a CVV. Já nas décadas de 1970 e 1980 várias espécies começaram a ser descritas como agentes patogênicos humanos, encontrados no sangue, urina e trato respiratório (ODDS,1988). Na década de 1990 iniciou-se o sequenciamento do genoma de *C. albicans*, que foi terminado em 2004. Os estudos das últimas décadas são marcados pelos esforços na compreensão da patogenicidade, genoma, expressões gênicas, resistência aos antimicrobianos, biofilme e interações parasita-hospedeiro das espécies de *Candida* mais relevantes clinicamente (KABIR et al., 2012).

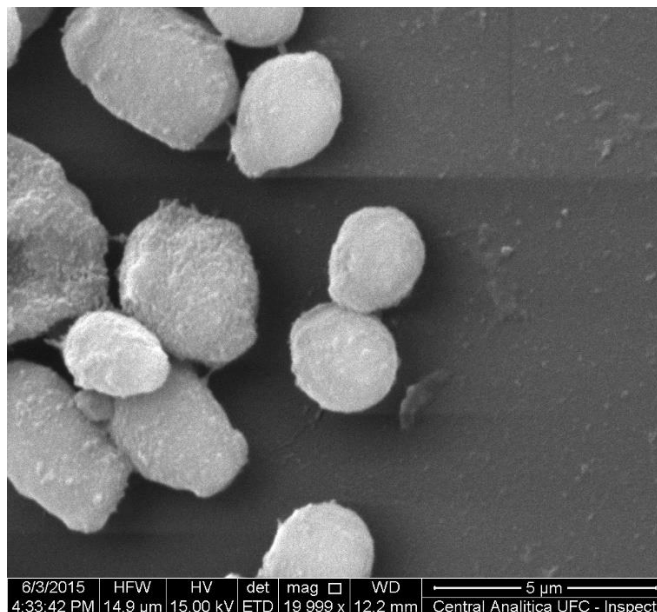
O gênero *Candida* pertence ao filo Ascomycota, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales e família Saccharomycetacea (CHAY et al., 2010).

Os fungos são organismos heterotróficos, aeróbios e fermentadores, desenvolvendo-se também em condições de microaerofilia (SCHULZE e SONNENBORN, 2009). Mais de 200 espécies são catalogadas como pertencentes ao gênero *Candida*, e cerca de 30 delas apresentaram potencial patogênico sendo isoladas de infecções em humanos (MERSEGUÉL et al., 2015).

### ***2.3.1 Aspectos morfológicos e identificação laboratorial***

As espécies do gênero *Candida* caracterizam-se por serem organismos pleomórficos. *Candida* spp. podem apresentar-se de três maneiras diferentes: blastoconídio, pseudo-hifa e hifa verdadeira. Os blastoconídios são estruturas unicelulares, arredondadas ou ovaladas, com aproximadamente 2-4 µm de diâmetro (figura 6). As leveduras podem ser dividir por brotamento simples, brotamento-fissão ou divisão binária (SIDRIM e ROCHA, 2004).

**Figura 6** – Blastoconídios de *C. albicans* observados por microscopia eletrônica de varredura. Magnitude: 19.999x

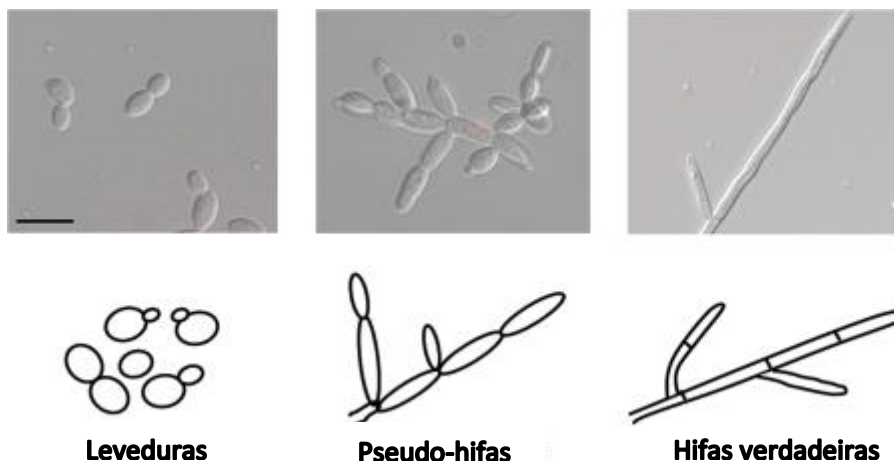


Fonte: CEMM, 2016.

As pseudo-hifas e hifas são estruturas tubulares, ligadas ponta a ponta e crescem de forma polarizada. As pseudo-hifas geralmente são formadas a partir de um brotamento simples que, diante de modificações dos polissacarídios estruturais da parede celular, deulhes características alongadas às células, com o aspecto de “charuto”. Esse fenômeno pode estar relacionado à virulência da espécie fúngica. Quando as pseudo-hifas são contíguas, assemelham-se bastante às hifas, podendo ser diferenciadas pela presença de constrições formadas antes de cada novo brotamento (figura 7) (SIDRIM e ROCHA, 2004).

As hifas são estruturas filamentosas que não apresentam paredes transversais ou septos como estruturas de separação entre as células, pois os septos das hifas possuem poros que permitem a passagem de material citoplasmático e até mesmo de núcleos entres as células fúngicas. O crescimento das hifas ocorre de formas apical, sem alongamento das células intercalares (SIDRIM e ROCHA, 2004).

**Figura 7** - Diferenciação dos morfotipos apresentados pelo gênero *Candida*.



Fonte: Traduzido de Thompson, Carlisle e Kadosh, 2011.

A identificação laboratorial das leveduras baseia-se em testes que avaliam aspectos macroscópicos e microscópicos da cultura, bem como as características fisiológicas e bioquímicas das células. O cultivo pode ser realizado em meios cultivo convencionais da rotina micrológica como o Agar Sabouraud, ágar Sabouraud com cloranfenicol e ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol e cicloheximida – Mycosel. Após crescimento em até 4 dias, a 28-37°C, as colônias de *Candida* spp. apresentar-se-ão como colônias glabras, de coloração creme ou branca, úmidas e sem pigmentos difusíveis (SIRIM e ROCHA, 2004; FAROOGI et al., 2012).

A prova do tubo germinativo é um método de triagem que permite a diferenciação de *C. albicans* e *C. dubliniensis* das outras espécies do gênero, pois essas espécies apresentam hifas verdadeiras (sem constrição entre célula-mãe e o brotamento).

Em condições de estresse, como baixa tensão de O<sub>2</sub>, as espécies produzem padrões morfológicos que podem ser empregados na sua identificação. A prova do microcultivo permite a visualização microscópica de estruturas fúngicas características de cada espécie, que são importantes e, muitas vezes, suficientes, na identificação presuntiva de espécies do gênero (figura 8) (SIDRIM e ROCHA, 2004).

**Figura 8** - Aspecto micromorfológico de *Candida albicans* em ágar *corn meal* com Tween 80.



Figura 8: A seta indica a presença de blastoconídios e clamidoconídios característicos da espécie *C. albicans* no achado micromorfológico em microcultivo.

Fonte: CEMM, 2012.

Para a acurácia da identificação fenotípica das leveduras faz-se necessária a realização de testes bioquímicos, como a assimilação de carboidratos, fermentação de carboidratos e a prova da enzima uréase (SIDRIM e ROCHA, 2004). Ainda é possível utilizar-se de meios cromogênicos específicos para *Candida* spp., que diferencia algumas espécies com base na coloração apresentada por elas quando crescidas nesses meios (figura 9).

As técnicas fenotípicas tradicionais ainda são as mais usadas na rotina micológica para a identificação de *Candida* spp. Porém, métodos manuais e automatizados também podem ser utilizados. Esses métodos baseiam-se essencialmente em provas bioquímicas, como assimilação de carboidratos. Alguns exemplos são citados a seguir: kits API20C® e ID32C®, da BioMérieux, Microscan, VITEK (SIDRIM e ROCHA, 2004). Métodos moleculares são utilizados na pesquisa micológica, principalmente usando as regiões de *internal transcribed spacers* (ITS) e as regiões 28S e 18S (rDNA) do DNA ribossomal (UNDERHILL e ILIEV, 2014).

**Figura 9** - Provas bioquímicas para identificação de espécies do gênero *Candida*.

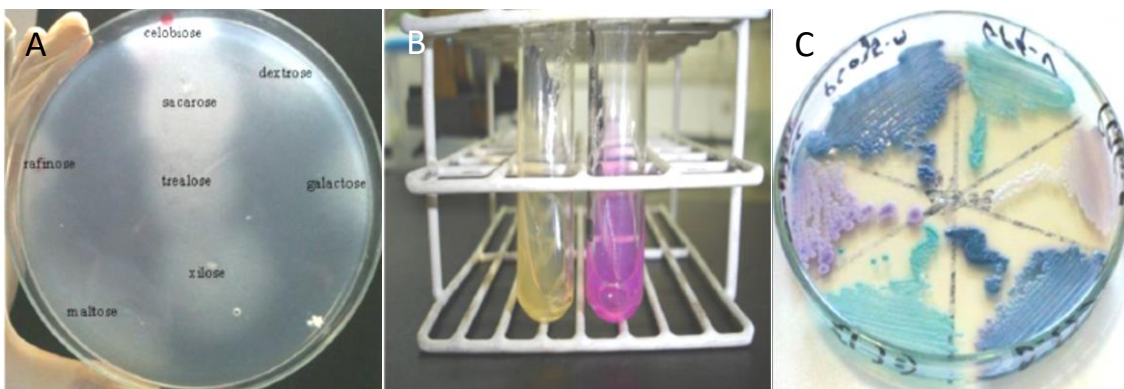


Figura 9: A- Prova de assimilação de carboidrato de *Candida* spp. B- Prova de produção de urease em meio ágar ureia de Christensen. C- Placa contendo ágar cromogênico.

Fonte: CEMM, 2013.

### 2.3.2 Patogenia e fatores de virulência

*Candida* spp. são micro-organismos com grande capacidade de adaptar-se a nichos ambientais distintos. Essa propriedade permite o estilo de vida dualístico entre comensal e patógeno oportunista. A sua dualidade relaciona-se com a competência na transição morfológica de blastoconídios para hifa e é de extrema importância na sua patogenicidade. Blastoconídios são tolerados pelo hospedeiro e são mantidos em uma carga baixa na mucosa vaginal por vários mecanismos que inibem a transição para hifa. Quando esses mecanismos de tolerância se tornam ineficientes, ocorre a transição para hifa e há a expressão de fatores de virulência (CASSONE, 2014).

Alguns dos atributos de virulência relacionados ao sucesso adaptativo de *C. albicans* como patógeno oportunista e determinantes no processo para o estabelecimento da CVV são: expressão de adesinas e invasinas, transição morfológica, secreção de enzimas hidrolíticas, capacidade de crescimento frente a alterações de pH, flexibilidade metabólica para captação de nutrientes e a capacidade de ligação a superfícies abióticas ou bióticas para a formação de biofilmes (MAYER, WILSON, HUBE, 2013).

A adesão microbiana a superfícies epiteliais é pré-requisito essencial para a colonização e infecção da mucosa. A adesão de *Candida* spp. ao epitélio vaginal é um processo complexo, multifatorial e dinâmico, que é definido pela associação entre os componentes da parede celular fúngica e as proteínas de superfície epitelial. Fatores físico-químicos, como as interações hidrofóbicas, e também a presença de receptores específicos na parede da célula fúngica, chamadas adesinas, são essenciais a esse processo (RICHARDSON e NAGLIK, 2018).



As adesinas ligam-se à glicoproteínas na superfície da célula epitelial, aderindo-se assim, à mucosa vaginal. Dois grupos de adesinas têm sido identificados: *Hyphal wall protein 1* (Hwp1) e *agglutinin-like sequences* (Als). Esses grupos são constituídos de proteínas ancoradas ao glicolípido glicosilfosfatidilinositol (GPI). Além de participarem do processo de adesão, Hwp1 e Als têm papel crucial no processo de formação de biofilme em *C. albicans* (CAUCHIE et al., 2017). A exclusão de Hwp1, por exemplo, está associada na redução de adesão e da virulência em um modelo de candidíase em murinos. A Als3, associada à hifa, é uma importante adesina que é regulada positivamente durante a infecção de mucosas e o rompimento do gene *ALS3*, que codifica essa adesina, reduz a adesão epitelial *in vitro* (RICHARDSON e NAGLIK, 2018).

As invasinas podem desencadear o processo de endocitose induzida, em que *C. albicans* pode entrar nas células do hospedeiro por um processo passivo. As invasinas identificadas até o momento são Als3p, Ssa1p, que interagem com a E-caderina, receptor epitelial do hospedeiro. Essa interação promove o acúmulo e a ativação de proteínas que regulam o remodelamento do citoesqueleto de actina, para fagocitar o fungo. Outras invasinas importantes são as Ssap5p e Ssap2p, que medeiam o processo de penetração ativa das hifas no epitélio estratificado das mucosas. Essas proteínas degradam componentes da membrana plasmática das células epiteliais das camadas mais superficiais para invasão ao epitélio mais profundo da mucosa. A penetração ativa ocorre em momentos posteriores durante a infecção quando comparada com a endocitose induzida. Este, provavelmente, é o mecanismo inicial que permite que *C. albicans* invada as camadas mais externas de um epitélio (RICHARDSON e NAGLIK, 2018).

A transição morfogênica é um mecanismo essencial na patogênese de *Candida* spp. no hospedeiro humano. A presença de blastoconídios está relacionada à colonização e disseminação assintomática. Já a forma de hifa contribui para a adesão e invasão das mucosas, além de ser fator determinante no desenvolvimento da infecção vaginal. Os blastoconídios são bem tolerados pelo hospedeiro e as células são mantidas na superfície do epitélio vaginal, apesar da expressão dos receptores de reconhecimento de padrão moleculares associados a patógenos (PAMPs) mecanismo de defesa da imunidade inata (BRADFORD e RAVEL, 2017; CAUCHIE et al., 2017).

As células de *Candida* sp. são estimuladas a formar hifas ao entrarem em contato com uma superfície, o que pode facilitar a penetração ativa dos tecidos do hospedeiro (BRADFORD e RAVEL, 2017). A transição de blastoconídio para hifa é um fator chave na defesa de *C. albicans* do ataque das células fagocíticas do hospedeiro. O ambiente do

fagossoma estimula a formação de hifas dos blastoconídios fagocitados, que, fortuitamente, pode perfurar os macrófagos, provocando a lise dessas células e evadindo-se do sistema fagocítico (CAUCHIE et al., 2017).

A expressão de enzimas hidrolíticas está relacionada à capacidade de adesão, penetração tecidual, invasão e destruição das células do epitélio vaginal. As aspartil -proteínases (Saps), uma família de 10 enzimas homólogas, tem a função de clivar proteínas do epitélio do hospedeiro, causando dano tecidual, além de facilitar no desenvolvimento da hifa e modular mudanças na resposta imune do hospedeiro. As Saps são ativadas e expressam sua atividade proteolítica quando o pH do ambiente é ácido. Estudos relatam que os genes de *SAP2*, *SAP4-6* e *SAP7* estão mais estreitamente relacionados à CVV (CASSONE, 2014; CAUCHIE et al., 2017; RICHARDSON e NAGLIK, 2018).

Outras enzimas extracelulares como as Fosfolipases (PLs), lipases (LPs) e hemolisinas (HMs) também são cruciais para a invasão ao tecido e aquisição de nutrientes. A produção de PLs é dependente da espécie e sua expressão contribui para adesão, bem como causa danos à célula do hospedeiro. As LPs, por sua vez, estão envolvidas na adesão e dano aos tecidos do hospedeiro. Seus genes já foram detectados em *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*. A aquisição de ferro é crucial para a sobrevivência de *Candida* spp. e a secreção de HMs é importante para a degradação da hemoglobina e captação do ferro, que facilita a invasão aos tecidos mais profundos (CAUCHIE et al., 2017; RICHARDSON e NAGLIK, 2018).

*C. albicans* é capaz de se proliferar em uma ampla gama de ambientes do hospedeiro e uma das condições ambientais mais importantes que flutuam em nichos diferentes é o pH. *C. albicans* já foi isolada de ambientes como o estômago (pH 2,0), vaginal (pH 4,5) e mucosa oral (pH 6,0). Contudo, sua capacidade de crescimento varia em pH de 2,0 a 10,0 (SHERRINGTON et al., 2017). O estudo de Sherrington et al. (2017) mostra que o crescimento em ambientes com pH mais baixo, como o da vagina, induz o remodelamento da parede celular fúngica, expondo mais quitina e os beta-glucanos presentes na parede. Isso estimula o reconhecimento do sistema imune inato, favorecendo o estabelecimento de infecções sintomáticas. Outra maneira que *C. albicans* possui de responder ao adaptar-se ao pH do ambiente em que se encontra foi descrito por Sun et al. (2015), que revelou a influência do pH no *switching* fenotípico de espécies *Candida*. Ainda, que a filamentação é estimulada em pH mais próximo ao neutro que em pH mais ácido (HUANG, 2012).

Evidências indicam que *C. albicans* utiliza múltiplas fontes de carbono no hospedeiro e esta capacidade está direcionada à promoção de interações comensais ou patogênicas (MIRAMÓN e LORENZ, 2017). Os nutrientes disponíveis no hospedeiro são decorrentes da dieta, do processamento metabólico e da sua microbiota. As bactérias do trato gastrointestinal contribuem para a digestão de carboidratos complexos e produzem inúmeros metabólitos, como os ácidos graxos de cadeia curta: lactato, acetato, butirato e propionato; sendo o lactato particularmente abundante (MIRAMÓN e LORENZ, 2017).

Os lactobacilos numerosos na mucosa vaginal são responsáveis por produzir ácido láctico a partir do glicogênio, disponibilizando esse substrato para as leveduras e promovendo um pH vaginal ácido. A produção de ácido láctico a partir do glicogênio, promove boa disponibilidade do lactato para os fungos, estimulando o incremento na sua capacidade de adesão (ÁLVARES et al., 2007). O lactato é a principal fonte de carbono no ambiente vaginal e é usado por *C. albicans* como sinal no estímulo à mudanças em sua arquitetura e composição de parede celular, afetando sua resistência em situações de estresse (HALL, 2017; MIRAMÓN e LORENZ, 2017). Estudos relatam que o lactato usado como fonte de carbono altera a composição da parede celular da *C. albicans*, igualmente, torna as leveduras ‘menos visíveis’ ao sistema imune do hospedeiro e reduzindo a formação da matriz extracelular dos biofilmes (ENE et al., 2013, PEMMARAJU et al., 2016).

#### 2.3.2.1 Biofilmes

Os biofilmes são definidos como comunidades microbianas complexas, aderidas a uma superfície biótica ou abiótica e imersas em uma matriz exopolimérica autoproduzida composta por polissacarídeos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (CAUCHIE et al., 2017). A capacidade de adesão a substratos bióticos e abióticos levam à grande preocupação no uso de dispositivos médicos, como cateteres, próteses, implantes, válvulas cardíacas (abióticos); ou em tecidos e mucosas do hospedeiro (bióticos) (CAVALHEIRO e TEIXEIRA, 2018). A grande relevância clínica dos biofilmes é devida a estarem associados a cerca de 80% das doenças infecciosas, causando persistência nas colonizações e reinfecções (HARRIOTT e NOVERR, 2011).

Micro-organismos associados em biofilmes possuem atributos distintos das células livres, como menor taxa de crescimento e maior resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento. São responsáveis por boa parte dos casos de refratariedade aos

tratamentos de doenças infecciosas, pois sua tolerância pode chegar a superar uma concentração mil vezes maior que a maior concentração testada em células planctônicas (TOBUDIC et al., 2012; CAVALHEIRO e TEIXEIRA, 2018).

Diversas doenças crônicas de grande relevância clínica-epidemiológica são atribuídas à formação de biofilmes como periodontite, pneumonia em pacientes portadores de fibrose cística, pé diabético, otite média, rinosinusite crônica, endocardite, infecções do trato gastrintestinal e infecções em pacientes em uso de dispositivos invasivos. Apesar de menos frequentes, as doenças fúngicas causadas por biofilmes também têm recebido considerável destaque pelos pesquisadores nos últimos anos. Neste aspecto, destacam-se espécies do gênero *Candida*, principalmente *C. albicans*, considerada a espécie mais frequente nas infecções fúngicas mediadas por biofilmes. Biofilmes formados por espécies do gênero *Candida* podem causar desde infecções superficiais até sistêmicas em pacientes imunocomprometidos (CAVALHEIRO e TEIXEIRA, 2018).

A formação de biofilmes de *Candida* spp. possui passos bem estabelecidos: proliferação e adesão dos blastoconídios à superfície (biótica ou abiótica), indução à filamentação e produção da matriz exopolimérica e posteriormente, quando o biofilme encontra-se em seu estágio maduro, há a dispersão das células não aderidas para a colonização de novos locais (figura 10) (CAUCHIE et al., 2017).

A adesão é mediada por adesinas, principalmente Als3 e Hwp1. Esse processo envolve interações entre a célula e o substrato e também as interações entre as células no desenvolvimento do biofilme. A aderência das leveduras à superfície forma uma fina camada, na base do biofilme. A formação de pseudo-hifas e hifas está associada ao crescimento e maturação do biofilme. É também durante a maturação do biofilme ocorre a autoprodução de material extracelular, composto por carboidratos, proteínas, DNA, além de componentes do hospedeiro, originando a matriz extracelular. O biofilme maduro é uma estrutura complexa, com propriedades bem particulares, onde a célula assume papéis especializados para a sobrevivência, e na fase de dispersão há liberação de células metabolicamente ativas, as quais podem fixar-se em sítios distantes daquele de origem (MARTINS et al., 2010; POLKE, HUBE e JACOBSEN, 2015).

**Figura 10** - Estágios de maturação do biofilme em espécies de *Candida*.

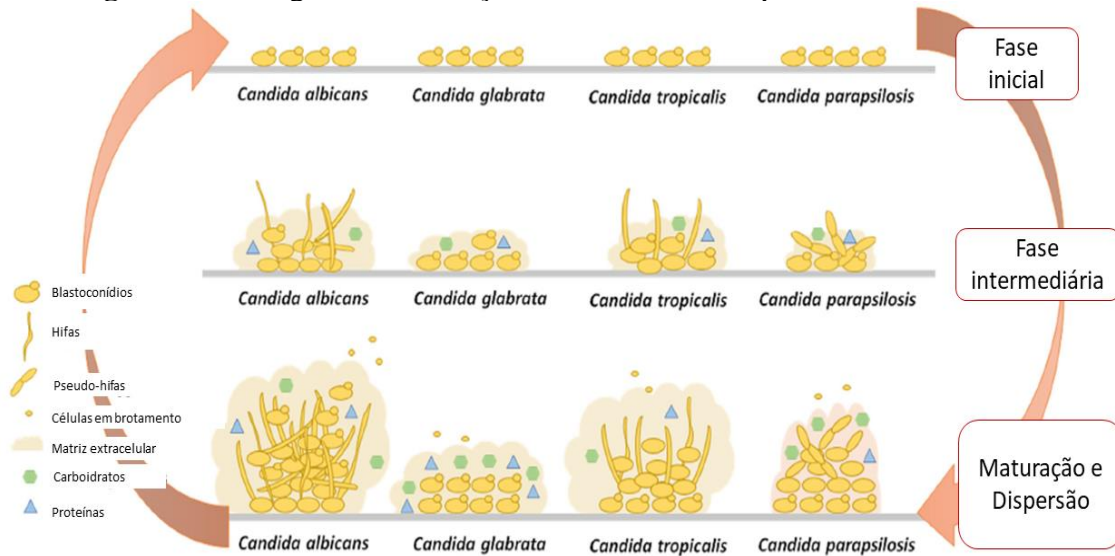


Figura 10: A fase inicial é caracterizada pela adesão ao substrato, posteriormente filimentação e produção de matriz exopolimérica. Por fim, a maturação e dispersão, com aspectos particulares para cada espécie. Fonte: Traduzido de Cavalheiro e Teixeira (2018).

Cada espécie de *Candida* possui diferenças na formação do biofilme, em sua morfologia, produção de matriz exopolimérica a resistência aos antifúngicos. (CAVALHEIRO e TEIXEIRA, 2018). A eficiência na formação de biofilme por *Candida* spp. depende de vários fatores como a textura da superfície (como rugosidade e hidrofobicidade), condições ambientais (disponibilidade de nutrientes e O<sub>2</sub>, pH etc) e a capacidade intrínseca do fungo para formar biofilmes (POLKE, HUBE e JACOBSEN, 2015).

Segundo Polke, Hube e Jacobsen (2015), os biofilmes de *C. albicans* são intrinsecamente resistentes a ação de antifúngicos, a estresses mecânicos e ação do sistema imune. Algumas estratégias dessa resistência são bem conhecidas, como a arquitetura do biofilme, a presença matriz exopolimérica, a expressão de bombas de efluxo e a plasticidade fenotípica e metabólica (figura 11).

**Figura 11** - Mecanismos de resistência nos biofilmes fúngicos.

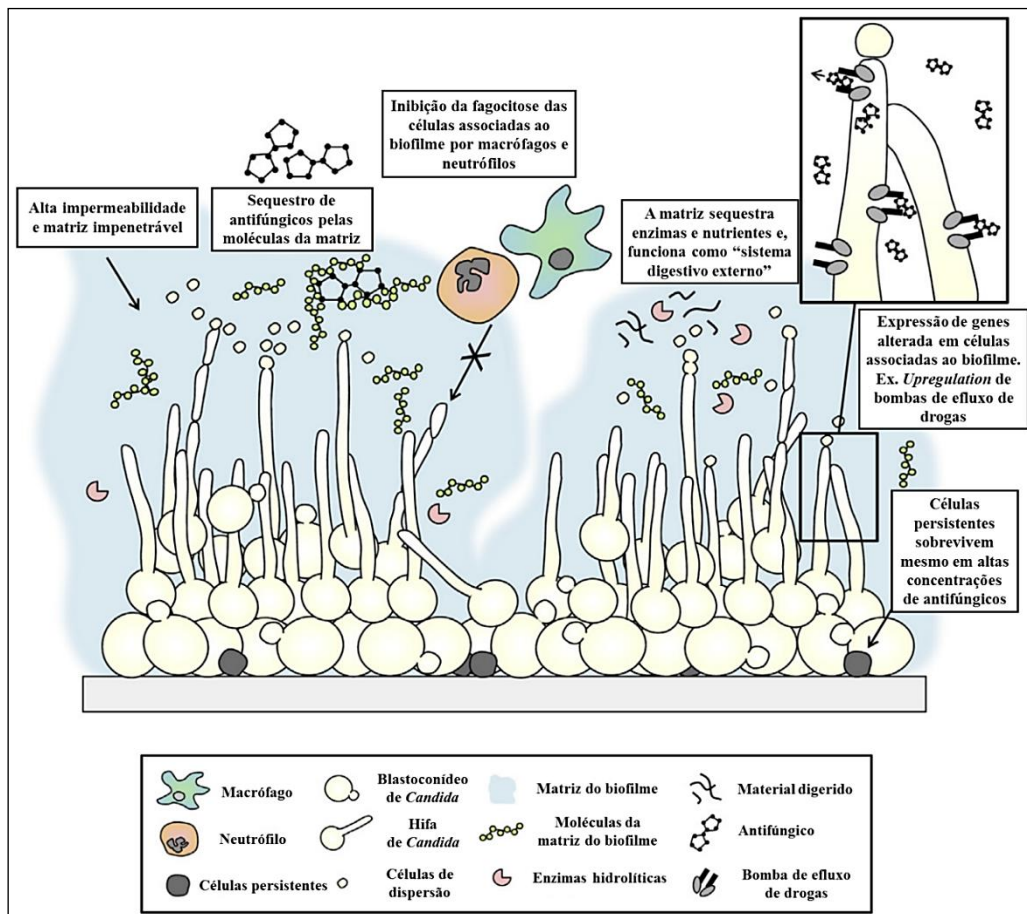


Figura 11: Produção de matriz exopolimérica, expressão de bombas de efluxo, plasticidade fenotípica são fatores que permitem o sucesso e manutenção dos biofilmes.

Fonte: Traduzido de Polke, Hube e Jacobsen, (2015).

A presença de matriz exopolimérica, constituída majoritariamente por  $\beta$ -1,3-glucanos, liga-se aos antifúngicos azólicos, impedindo de cheguem até às células fúngicas. O DNA extracelular também constituinte da matriz, é relacionado à resistência, uma vez que os biofilmes tratados com DNase mostram-se mais suscetíveis a anfotericina B e equinocandinas (MARTINS et al., 2012). A super expressão das bombas de efluxo, em que participam os transportadores do tipo ABC (*ATP binding cassette*), devolvem as moléculas de antifúngico novamente para fora da célula, impedindo que estes atuem em seus alvos. As células persistentes (*"persister cells"*) também favorecem a resistência do biofilme, pois são variantes fenotípicas capazes de crescer em elevadas doses de concentração inibitória mínima para um dado antifúngico devido à sua baixa taxa metabólica (POLKE, HUBE e JACOBSEN, 2015).

### 2.3.2.2 Biofilmes de *Candida spp.* em mucosas

Biofilmes de *C. albicans* também são formados em substratos bióticos, como as mucosas oral e vaginal, causando infecções mucocutâneas de grande relevância. Os biofilmes formados na mucosa vaginal, particularmente, trazem preocupação, pois são implicados na imunopatologia de CVV, nas falhas terapêuticas e recidivas da doença (BRADFORD e RAVEL, 2017).

A estrutura dos biofilmes de *C. albicans* em mucosas é semelhante aos formados em superfícies abióticas, como cateteres e próteses. Eles são constituídos também por blastoconídios e filamentos imersos em uma matriz extracelular polimérica. No entanto, em biofilmes *in vivo*, a mucosa do hospedeiro responde à presença do micro-organismo e aos fatores de virulência secretados durante o seu crescimento, além da regulação mediada pela microbiota do hospedeiro e da resposta imune, gerando um ambiente quimicamente mais complexo que os biofilmes formados em implantes. (GANGULY e MITCHELL, 2011; HARRIOTT e NOVERR, 2011; WILLIAMS et al., 2013).

A importância dos biofilmes de *C. albicans* em mucosas humanas está claramente demonstrada nas infecções em mucosa oral e na candidíase vulvovaginal (GANGULY e MITCHELL, 2011). Candidíases orais/orofaríngeas e candidíase vulvovaginal compreendem infecções frequentes na clínica médica, associadas a altos índices de recorrência em pacientes suscetíveis (CASSONE e CAUDA, 2012). Em 2010, Harriot e colaboradores formaram, pela primeira vez, um biofilme *in vivo* na mucosa vaginal de murinos. No estudo, foi inoculado uma carga de *C. albicans* em ratas pré-tratadas com estrogênio e avaliado, por microscopia eletrônica a formação e o desenvolvimento do biofilme no epitélio vaginal. Segundo os autores, este é um fator crucial e esclarecedor no estabelecimento da CVV, ocorrência e refratariedade.

### 2.3.2.3 Biofilme microcosmos

Sabe-se que os estudos *in vivo* são modelos complexos, que envolvem múltiplos elementos e mimetizam as situações reais encontradas no hospedeiro, além de envolver parâmetros diversos nas análises, como a resposta imune e a interação com a microbiota. No entanto, são estudos onerosos, que levam maior tempo, os parâmetros envolvidos são difíceis de ser controlados, e, em estudos com animais mamíferos, necessitam ser submetidos à conselhos de ética institucionais (LEBEAUX, 2013).

Os modelos de biofilme *in vitro*, por sua vez, oferecem diversas vantagens frente à experimentação animal: possibilidade de realização de testes simultâneos; baixo custo

devido à economia de insumos; facilidade de execução de testes em espaços laboratoriais reduzidos; capacidade de controle de variáveis físicas e químicas; possibilidade de produção em larga escala; adaptação a várias técnicas analíticas, tais como espectrometria de massas e microscopia eletrônica. Além de não estarem sujeitos a regulações legais dos comitês de ética institucionais (COENYE e NELIS, 2010; LEBEAUX, 2013).

Existem três categorias de modelos de estudo *in vitro*: estáticos ou fechados, abertos ou dinâmicos e o microcosmos. Os fechados ou estáticos incluem os modelos mais populares e bem-sucedidos, como os formados em placas de microtitulação. Esses modelos permitem análise de parâmetros bem definidos, produzindo quantificação rápida e direta de biomassa ou células viáveis. Os abertos ou dinâmicos são modelos de cultura contínua, em que há uma substituição dos meios de cultivo para retirada de resíduos, subprodutos metabólicos, células mortas e dispersas. São modelos utilizados principalmente para o estudo da resistência física e química dos biofilmes (LEBEAUX, 2013).

No modelo microcosmos participam várias espécies microbianas, além do material biológico do ambiente. São modelos mais sofisticados, pois objetivam aproximar-se do cenário *in vivo*, podendo ser adaptados aos modelos aberto ou fechados. Microcosmos incluem maior número de parâmetros ambientais e levam em consideração a complexidade do inóculo iniciador do biofilme em condições naturais, adequando-se ao estudo em sítios anatômicos com microbiota complexa (LEBEAUX et al., 2013).

O desenvolvimento de biofilmes a partir de microcosmos provenientes dos sítios de infecção fornecem informações valiosas acerca das interações entre espécies nestes ambientes, podendo mostrar a ocorrência de estimulação ou antagonismo do crescimento e fisiologia de determinados patógenos (KIM et al., 2016). Nos últimos anos, têm se observado um aumento nas pesquisas em biofilmes de microcosmos, exclusivamente associados à mucosa oral (KIM et al., 2016; MOSTAJO et al., 2017). Esses estudos levam à observação do papel da microbiota residente no controle do crescimento dos patógenos, como *Candida* spp., bem como a influência das condições nutritivas e físico-químicas destes ambientes e o impacto destes microcosmos na expressão de fatores de virulência e na resposta aos antifúngicos (KOOPMAN et al., 2015).

Muitos estudos hoje são realizados com biofilmes “*in vitro*” e, apesar de sua grande importância e auxílio na elucidação de muitos aspectos do biofilme, estes modelos não levam em conta parâmetros do ambiente e do hospedeiro durante sua caracterização. A microbiota vaginal é composta de numerosas bactérias de diferentes gêneros e *Candida*,



sendo elementos importantes no estabelecimento de *Candida* como patógeno oportunista. Assim, biofilmes em microcosmos são necessários ao entendimento desses biofilmes multiespécies, além do papel da mucosa e do sistema imune do hospedeiro (LEBEAUX et al., 2013).

O desenvolvimento de novos modelos *in vitro* de comunidades polimicrobianas seria ideal para testar hipóteses sobre o papel da microbiota vaginal na saúde e na doença (BRADFORD e RAVEL, 2017). Ainda, os modelos de cultivo que mimetizam a mucosa vaginal são de grande importância, fornecendo nutrientes e compostos capazes de reproduzir com sucesso o ambiente vaginal e fornecendo informações valiosas mais relacionadas ao ambiente *in vivo* durante o processo infeccioso (TOMÁS e NADER-MACIAS, 2007). Dessa maneira, o desenvolvimento de um modelo de biofilme microcosmo de *Candida* spp. permite uma aproximação ao ambiente multivariável em que a CVV é estabelecida.

## **2. HIPÓTESES**

1) Amostras vaginais provenientes de pacientes com CVV são capazes de servir como inóculo iniciador para a formação de biofilme microcosmos;

2) Biofilmes de *Candida* spp. em modelo microcosmo apresentam diferentes características morfológicas, fisiológicas e de sensibilidade aos antifúngicos, quando comparados aos biofilmes monoespécie produzidos pelo mesmo isolado de *Candida* spp.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Estabelecer um modelo de biofilme em microcosmo *in vitro* de *Candida* spp., a partir de amostras vaginais e compará-lo ao biofilme monoespécie, quanto aos aspectos morfofisiológicos e sensibilidade aos antifúngicos.

### **4.2 Objetivos específicos**

1) Estabelecer um modelo *in vitro* de formação de biofilme de *Candida* spp. em microcosmos provenientes de secreção vaginal de pacientes com CVV;

2) Comparar a atividade metabólica, produção de biomassa, número de UFC/mL e atividade proteolítica nos biofilmes microcosmos e biofilmes monoespécie de *Candida* spp. provenientes da secreção vaginal;

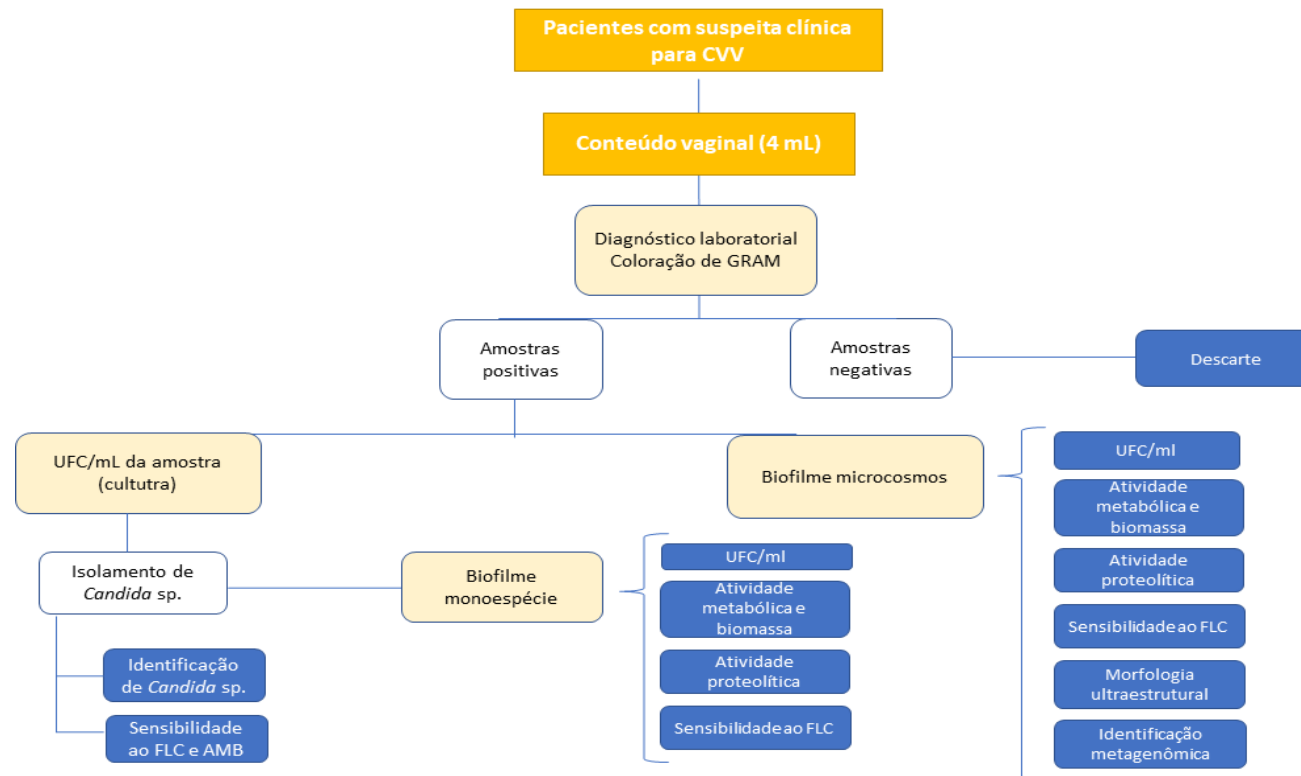
3) Comparar o perfil de sensibilidade dos biofilmes em microcosmos e monoespécie de *Candida* spp. frente ao fluconazol;

4) Avaliar a micromorfologia e a estrutura dos biofilmes de *Candida* spp. produzidos em microcosmos.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Desenho Experimental

**Figura 12** - Desenho experimental do estudo do modelo de biofilme em microcosmos e monoespécie de *Candida* spp. isoladas a partir de conteúdo vaginal de pacientes com CVV.



(UFC/mL: unidades formadoras de colônia por mL; FLC: fluconazol; AMB: anfotericina B)

## 5.2 População do estudo

A população do estudo foi constituída por mulheres com idade entre 18-55 anos, com quadros clínicos sugestivos de vaginite por *Candida* spp. (prurido e/ou corrimento e/ou vulvite) atendidos no Instituto de Prevenção do Câncer do Estado do Ceará, Brazil. Foram excluídas do estudo pacientes grávidas, com doenças autoimunes, tendo feito uso de antimicrobianos e antifúngicos há, pelo menos, três meses ou em uso de corticoides.

As voluntárias, mediante aceitação para participação no estudo, foram convidadas a assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a responder aos questionamentos sobre início, duração e período de intensificação dos sintomas, uso de medicamentos como anticoncepcionais e número de progênie.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Ceará sob o número 60257516.3.0000.5054, de acordo com os ditames da Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde do Brasil, que regula pesquisas em seres humanos.

## 5.3 Caracterização das amostras

O conteúdo vaginal foi colhido do fórnice vaginal, com escova ginecológica estéril pelo médico ginecologista ou enfermeiro no atendimento ambulatorial. O material foi armazenado em 2–4 mL de tampão fosfato estéril (pH 7,4), 28 °C, e transportada até o laboratório em no máximo 3 horas. A confirmação laboratorial de candidíase foi realizada por teste duplo cego (2 participantes) com observação de 20 campos distintos do esfregaço corada pelo método de Gram (aumento 1.000x). A análise evidenciou a presença de blastoconídios e pseudo-hifas livres ou aderidos às células epiteliais sugestivos de *Candida* spp.

## 5.4 Processamento das amostras e isolamento de *Candida* spp.

As amostras positivas ao exame laboratorial pelo método de Gram foram utilizadas como inóculo inicial para isolamento e identificação de *Candida* spp., identificação dos morfotipos bacterianos presentes, formação de biofilme microcosmos e posterior formação de biofilme monoespécie.

Para identificação das espécies de *Candida* presentes na amostra, 1µl do material coletado foi semeado, em duplicata, no meio ChromAgar *Candida* (BD Diagnostic

Systems-França) e então incubadas por até 72h, a 35 °C e 37 °C, em microaerofilia. Para identificação presuntiva dos morfotipos bacterianos presentes nessas pacientes com candidíase, igual volume de alíquota foi semeado, em duplicata, nos meios Ágar Sangue de Carneiro - 5% (BD Diagnostic Systems – Alemanha), *Brain Heart Infusion Ágar* (BD Diagnostic Systems – Alemanha), *MacConkey* (HiMedia – Índia) por até 72h, a 35 °C e 37 °C, em aeriose, microaerofilia e anaerobiose.

Para gerar a atmosfera de microaerofilia foi utilizada jarra reguladora de atmosfera com vela. A atmosfera de anaerobiose foi estabelecida em jarra de anaerobiose AnaeroJar (*Oxoid Microbiology Products* – Reino Unido) com gerador de atmosfera para o cultivo de microrganismos anaeróbios – Anaerobac (PROBAC – Brasil).

### 5.5 Identificação de *Candida* spp.

A identificação de *Candida* spp. ocorreu pela realização de métodos fenotípicos: crescimento em meio cromogênico, prova do microcultivo e assimilação de carboidratos. Para o crescimento em meio cromogênico, foi utilizado o meio Chromagar *Candida*® (BD Diagnostic Systems-França). As culturas foram semeadas por esgotamento e incubadas por até 48h a 35°C. A visualização de colônias pigmentadas serviu para identificação presuntiva da espécie de *Candida*.

A prova do microcultivo foi realizada com culturas recentes, crescidas por até 24h, semeadas em três estrias em meio *Corn Meal* com Tween 80 e recoberta com lamínula estéril. As estruturas características de cada espécie foram observadas após 6 dias de cultivo, a 28°C (SIDRIM e ROCHA, 2004).

A assimilação de carboidratos foi realizada com culturas recentes, crescidas por até 24h. O meio *Yeast Base Nitrogen* acrescido de Ágar foi utilizado como base para a suspensão do inóculo, e então foram distribuídos em placa. Os açúcares foram distribuídos na placa e a mesma incubada por até 48 h a 28 °C (SIDRIM e ROCHA, 2004).

Para a confirmação da identificação fenotípica foram realizadas análises moleculares como PCR, com primers *CALF* e *CALR* (para identificação de *C. albicans*), e identificação proteômica com *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS)

O DNA fúngico foi extraído utilizando o kit *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche™). Após a extração, foi realizada a quantificação do DNA obtido por Qubit™ para checar o rendimento do processo. A técnica de PCR para identificação de *C. albicans* foi realizada com o uso dos primers CALF (5' -

TGGTAAGGCGGGATCGCTT – 3') e CALR (5' - GGTCAAAGTTTGAAGATATAC). A reação de PCR foi realizada em volume final de 25 µL com 2 µL de cada primer (50 pmol/µL), 5 µL de dNTP mix (Promega™) a 1 mM, 0,25 U *GoTaq® Hot Start Polymerase* (Promega™), 5 µL *5X Green GoTaq® Flexi Buffer* (Promega™), 5 µL de MgCl<sub>2</sub> (Promega™), 3,95 µL de água ultrapura e 2 µL de DNA-molde. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial por 5 min a 95 °C, seguida de 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 55 °C por 30 s e 72 °C por 1 min e extensão final por 10 min a 72 °C (ROCHA et al., 2017).

A identificação proteômica, uma alíquota de 10<sup>6</sup> células/ mL foi transferida pra placa-alo de 48 poços (FlexiMass, Shimadzu Biotech, UK) e foi formada uma solução de matriz com ácido fórmico e trifluoroacético. Então as amostras foram secas ao ar e analisadas por MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics Inc., EUA / Alemanha). Os espectros obtidos no foram comparados com os espectros da base de dados Biotyper™ versão 3.1 (Bruker Daltonics, Germany/USA) para identificação de levedura considerando os valores de score ≥2 (LIMA-NETO et al., 2014).

### **5.6 Sensibilidade planctônica de *Candida* spp. isoladas das secreções vaginais a fluconazol e a anfotericina B**

O perfil de sensibilidade em crescimento planctônico foi definido pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as diretrizes do documento (M27-A3) do *Clinical & Laboratory Standards Institute - CLSI* (2008) em meio RPMI 1640, tamponado com 0,165 M de MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS; Sigma Chemical Co., EUA) a pH 7,0). As drogas testadas foram fluconazol (FLC; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) e anfotericina B (AMB; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). As concentrações de FLC utilizadas variaram de 0,125-64 µg/mL e AMB variaram de 0,0313- 16 µg/mL.

As concentrações inibitórias mínimas de FLC e AMB foram definidas como as menores concentrações capazes de inibir 50% e 100%, respectivamente, do crescimento fúngico quando comparado ao controle livre de drogas. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e cepa padrão *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi incluída como controle de qualidade para cada teste.

## 5.7 Biofilme Microcosmos

### 5.7.1 Formação do Biofilme microcosmos

Previamente à formação do biofilme microcosmos, foi avaliada a capacidade de formação de biofilme por *C. albicans* em dois meios sintéticos de composição distinta: *Vaginal fluid simulant* (VFS; OWEN e KATZ, 1999) e *Medium simulating vaginal fluid* (MSFV; adaptado de Tomás e Nader-Macías, 2007. Glicogênio: redução de  $10\text{g. l}^{-1}$  para  $5\text{g. l}^{-1}$ ) (Composição dos meios: ANEXO A). Os inóculos de três cepas isoladas de pacientes com suspeita clínica de CVV foram preparados isoladamente em PBS na concentração de  $1$  a  $2,5 \times 10^6$  células/mL, depositados em placa de 96 poços e incubados por até 48h a  $35^\circ\text{C}$  em aerobiose. Os biofilmes formados foram avaliados quanto a biomassa, por meio da coloração com cristal violeta (PEETERS, NELIS E COENYE, 2008) e atividade metabólica, por redução de XTT (MARTINEZ E CASADEVALL, 2006). A condição experimental que revelou melhores resultados quanto a quantificação de biomassa e atividade metabólica foi empregada para todos os experimentos descritos a seguir.

Para a formação do biofilme microcosmos,  $60\ \mu\text{l}$  do material coletado foi adicionado em microplaca de 96 poços juntamente com o mesmo volume de MSFV, adaptado de Tomás e Nader-Macías (2007). Em seguida, foi incubado por até 72h, a  $35^\circ\text{C}$  e  $37^\circ\text{C}$ , em aerobiose, microaerofilia e anaerobiose. A cada 24 horas, os poços foram substituídos com  $200\ \mu\text{l}$  do MSFV.

### 5.7.2 Caracterização do Biofilme microcosmos

Os biofilmes foram analisados em 48h e 72h. A cada tempo foram avaliadas a relação entre morfotipos celulares e contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) de *Candida* spp., atividade proteolítica dispersa nos sobrenadantes de cultivo, a sensibilidade de *Candida* spp. ao fluconazol, atividade metabólica e biomassa. Realizou-se ainda uma análise da relação de fluorescência e morfologia ultraestrutural. Para tanto, uma alíquota de  $150\ \mu\text{l}$  da amostra foi adicionada em microplacas de 24 poços com lâminas de poliestireno (Thermanox ®) ao fundo e o mesmo volume de MSFV foi adicionado ao poço. As análises foram realizadas e imagens foram geradas dos biofilmes nos tempos de cultivo de 48h e 72h.

#### 5.7.2.1 Morfotipos celulares e contagem de UFC/mL

Após os períodos de incubação de 48h e 72h em microaerofilia a 35 °C, com reposição de MSFV a cada 24h, os sobrenadantes foram aspirados, desprezados e os poços repleenidos com 200 µl de PBS estéril. Os biofilmes foram raspados com ponteira estéril, ressuspendidos em PBS e homogeneizados por agitação intensa em vórtex por 30 segundos. Foram feitas diluições seriadas em NaCl (0,9%) estéril na proporção de 1:10 até a diluição 10<sup>-3</sup>. Posteriormente, alíquotas de 100 µL foram semeadas, por espalhamento, em placas Ágar Sabouraud com Cloranfenicol e *Brain Heart Infusion Agar*, em duplicata. As placas foram incubadas em microaerofilia por 48h a 35 °C. As colônias foram diferenciadas por seus morfotipos e posteriormente contadas.

#### 5.7.2.2 Análise da atividade metabólica e biomassa do biofilme microcosmos

Após os períodos de incubação de 48h e 72h em microaerofilia a 35 °C, com reposição de MSFV a cada 24h, os biofilmes foram analisados quanto à sua atividade metabólica por meio da redução de XTT a formazam. Esse composto, quando em contato com seu catalisador (menadiona), é reduzido a formazam pelas desidrogenases mitocondriais, sendo sua atividade avaliada pela intensidade de cor observada após o tempo de incubação. Uma alíquota de 131 µl do mix de XTT [50 µl de PBS, 75 µl de XTT (1 mg mL<sup>-1</sup>; Sigma) e 6 µl de Menadiona (1mM em acetona; Sigma)] (CORDEIRO et al., 2015) foi adicionada aos biofilmes os quais foram incubados por 3h. A análise colorimétrica foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm.

A biomassa do biofilme formado foi avaliada por meio da técnica de coloração do cristal violeta. Os biofilmes foram fixados com metanol e, em seguida corados com cristal violeta (0,33%) por 30 min. Depois foram descorados com ácido acético a 33%. (PEETERS, NELIS e COENYE, 2008). A análise foi realizada colorimetricamente, em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 590 nm.

#### 5.7.2.3 Atividade proteolítica dispersa nos sobrenadantes de cultivo

A atividade proteolítica dos biofilmes formados em 48h e 72h em microaerofilia a 35 °C, com reposição de MSFV a cada 24h, foi detectada usando a azoalbumina como substrato. Os sobrenadantes dos biofilmes formados após os cultivos de 48h e 72h foram coletados e centrifugados a 10000 rpm por 10 minutos. Duzentos microlitros do sobrenadante foi misturado à azoalbumina 0.3% e incubado em banho maria a 37 °C por 3 horas. A reação enzimática foi interrompida adicionando 5% de ácido tricloroacético,



seguida pela adição de NaOH 0.5M. (CORDEIRO et al., 2015). A leitura da absorbância foi feita a 440 nm.

#### 5.7.2.4 Sensibilidade de *Candida spp.* ao fluconazol em biofilme microcosmos

Após os períodos de incubação de 48h em microaerofilia a 35 °C, com reposição de MSFV a cada 24h, os sobrenadantes foram aspirados, desprezados e os poços repleenidos com 200 µl de MSFV adicionados de fluconazol (64 a 512 µg/mL). As placas foram novamente incubadas por 24h, a 35°C, em microaerofilia, e a avaliação da atividade inibitória foi realizada por redução de XTT, sendo avaliado por espectrofotometria no comprimento de onda de 492nm.

#### 5.7.2.5 Micromorfologia e análise estrutural do biofilme microcosmos

A micromorfologia dos biofilmes após os períodos de incubação de 48h e 72h em microaerofilia a 35 °C, com reposição de MSFV a cada 24h, foram analisadas por microscopia confocal de varredura a laser. Os biofilmes foram recobertos com os corantes de fluorescência Iodeto de Propídio (impermeável à membrana celular e se liga aos ácidos nucleicos se as células estiverem com membrana danificada/ inviáveis) e SYTO 9 (permeável à membrana plasmática, ligando-se diretamente aos ácidos nucleicos). As imagens foram analisadas em Microscópio Confocal Nikon C2 nos diferentes filtros exigidos pelos corantes (COLLINS, 2007).

A análise ultraestrutural dos biofilmes formados em 48h e 72h em microaerofilia a 35 °C, com reposição de MSFV a cada 24h, foi feita por Microscopia Eletrônica de Varredura. Após cada tempo de cultivo, os sobrenadantes foram retirados e os biofilmes fixados com 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato (0,15M), com azul de alcian (0,1%), *overnight* a 4°C. Os biofilmes foram desidratados com séries ascendentes de etanol e depois, com hexametildisilazano. Em seguida, as lâminas foram recobertas com 10 nm de ouro (Emitech Q150T) e observadas em microscópio eletrônico de varredura FEI Inspect S50, em alto vácuo a 15 kV. As imagens foram processadas em *software* ImageJ (CORDEIRO et al., 2015).

### 5.7 Biofilme *in vitro* de *Candida spp.* isoladas das secreções vaginais

Após o isolamento e a identificação de *Candida spp.* das amostras, os biofilmes foram formados com um inóculo inicial de 1 a 2,5 x10<sup>6</sup> células/mL (SHERRY et al., 2017) em meio MSFV. Os poços foram lavados a cada 24h e repleenidos com meio

MSFV estéril. Os biofilmes foram incubados até 72h, a 35°C, em microaerofilia. Depois disso, foram realizadas todas as análises (contagem de número de UFC/mL em Ágar Batata (item 5.7.2.1), atividade metabólica e biomassa (item 5.7.2.2), atividade proteolítica no sobrenadante de cultivo (item 5.7.2.3), sensibilidade a fluconazol (item 5.7.2.4) e micromorfologia e análise ultraestrutural (item 5.7.2.5). *C. albicans* ATCC 10231 foi empregada como controle em cada teste.

### **5.8 Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados por one-way e two-way ANOVA, tendo o valor de  $P < 0.05$  considerado significativo. A análise estatística foi realizada com GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software).

## 6. RESULTADOS

Os resultados obtidos no estudo serão apresentados em três etapas distintas:

- 6.1) População de estudo, identificação de *Candida* spp., sensibilidade planctônica e caracterização das amostras clínicas (n=11).
- 6.2) Testes para estabelecimento do protocolo (n=6);
- 6.3) Testes de validação do protocolo (n=5)

### 6.1 População de estudo; identificação de *Candida* spp. e sensibilidade planctônica; e caracterização das amostras,

#### 6.1.1 População de estudo

Durante o período de janeiro a outubro de 2018 foram colhidas 51 amostras vaginais de pacientes com suspeita clínica de vaginite por *Candida* spp. Onze das 51 amostras colhidas (21,56%) foram positivas ao exame laboratorial pelo método de Gram, com observação de microbiota mista ou dominada por lactobacilos, associada à presença de vários blastoconídios e pseudo-hifas livres ou aderidos às células epiteliais. Observou-se também a presença de neutrófilos (núcleos desnudos) e numerosas células epiteliais.

A média de idade das pacientes diagnosticadas com CVV foi de 28,6 anos; 3/11 apresentavam idade entre 18 e 25 anos, 6/11 apresentavam idade entre 26 e 45 anos e 2/11 apresentavam idade entre 46 e 55 anos no momento do diagnóstico.

A leucorreia foi a queixa com maior frequência de relato pelas mulheres, 72,7% (8/11) das pacientes relataram esse sintoma, seguido pelo prurido com 36,3% de relatos (4/11). Questionou-se se havia correlação do aparecimento ou intensificação dos sintomas à proximidade do período menstrual e 36,3% das pacientes (4/11) relataram perceber o aparecimento ou intensificação dos sintomas ao aproximarem-se do período menstrual.

Ao serem indagadas quanto ao uso de anticoncepcionais, 27,5% (3/11) relataram fazer uso do medicamento. Com relação ao uso de antimicrobianos, 45% (5/11) não lembraram quando utilizaram pela última vez, 27,5% (3/11) afirmaram ter feito uso há pelo menos três meses e 27,5% usaram antimicrobianos há mais de um ano (3/11).

### 6.1.2 Identificação de *Candida* spp.

As identificações fenotípicas foram realizadas nas 11 cepas de *Candida* spp. isoladas das pacientes com CVV. Para a confirmação da identificação, as mesmas foram submetidas ao PCR, não sendo observado o padrão de bandas esperado em duas cepas (2/11). Por fim, as cepas utilizadas para a caracterização do modelo de biofilme em microcosmos (n=5) e mais uma cepa que não apresentou o padrão de bandas característico da *C. albicans* no PCR foram submetidas à identificação por MALDI-TOF.

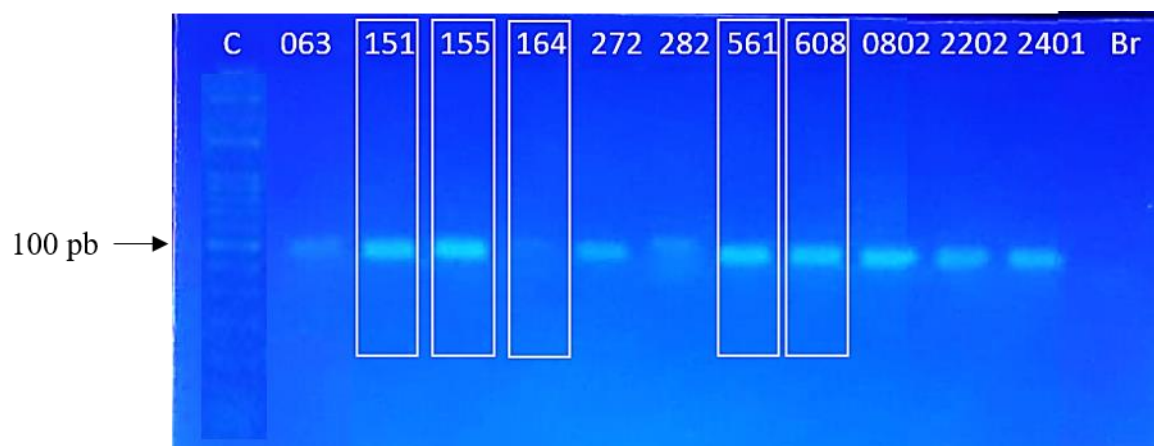
A identificação fenotípica realizada em meio cromogênico CHR evidenciou, após 48 horas de crescimento, colônia glabras, de cor verde-claro a verde médio, sugestivo de *C. albicans* (10/11). Somente a cepa isolada da amostra 164 (1/11) apresentou características distintas, com a coloração rosa claro.

Na prova do microcultivo observou-se a presença de blastoconídios em cachos, hifas e clamidoconídios terminais (10/11), sugestivo de *C. albicans*. Na cepa da amostra 164 (1/11) foram observados apenas blastoconídios de tamanho pequeno, sugestivo de *C. glabrata*.

Os testes fenotípicos foram confirmados com a prova de assimilação de carboidratos. Em 10/11 espécies de *Candida* isoladas houve crescimento nos seguintes açúcares: Glicose, Sacarose, Galactose, Xilose, Trealose e Maltose, sugestivo de *C. albicans*. Já a cepa isolada da amostra 164 assimilou apenas Lactose e Glicose, sugestivo de *C. glabrata*. A assimilação de glicose é usada como controle do experimento.

Identificação de *C. albicans* por PCR se deu com o padrão de bandas de 100 pb relativo a *C. albicans*, que foi observado em (9/11) isolados (figura 13). As amostras 164 e 282, por não terem apresentado o padrão de bandas esperado, foram submetidas à identificação pelo método do MALDI-TOF, juntamente com as amostras avaliadas no modelo de biofilme microcosmos (151,155, 561 e 608).

**Figura 13** - Corrida eletroforética dos isolados de *C. albicans* provenientes de paciente com CVV.



Os dados obtidos pela técnica de MALDI-TOF confirmaram os resultados dos testes fenotípicos e da reação de PCR, com o isolamento de *C. albicans* (5/6) e *C. glabrata* (1/6), conforme na tabela 1:

**Tabela 1** - Identificação por MALDI-TOF das espécies de *Candida* nas amostras clínicas de pacientes com CVV. (n=6).

Amostra clínica	Espécie
282	<i>Candida albicans</i>
151	<i>Candida albicans</i>
155	<i>Candida albicans</i>
164	<i>Candida glabrata</i>
561	<i>Candida albicans</i>
608	<i>Candida albicans</i>

### 6.1.3 Sensibilidade planctônica dos isolados de *Candida* spp.

Os resultados de sensibilidade das células planctônicas de *Candida* spp. isoladas de pacientes com CVV são expressos na tabela 2. O fluconazol foi capaz de inibir o crescimento planctônico de espécies de *Candida*, apresentando CIM entre 0,25 a 32 µg/ml. A sensibilidade frente a anfotericina B apresentou CIM variando entre 0,125 e 0,5 µg/ml.

**Tabela 2-** Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de FLC e AMB frente aos isolados de *Candida* spp. oriundos de pacientes com CVV (n=11).

Amostra clínica/ espécie	CIM (µg/mL)	
	FLC (CIM)	AMB (CIM)
2401 / <i>C. albicans</i>	0,25	0,25
0802 / <i>C. albicans</i>	0,25	0,25
2202 / <i>C. albicans</i>	0,25	0,25
272 / <i>C. albicans</i>	0,25	0,5
282 / <i>C. albicans</i>	0,25	0,25
063 / <i>C. albicans</i>	32	0,5
164 / <i>C. glabrata</i>	2	0,5
151/ <i>C. albicans</i>	2	0,125
155/ <i>C. albicans</i>	0,25	0,25
561/ <i>C. albicans</i>	0,25	0,25
608/ <i>C. albicans</i>	0,25	0,25
CP ATCC 22019	1	0,25

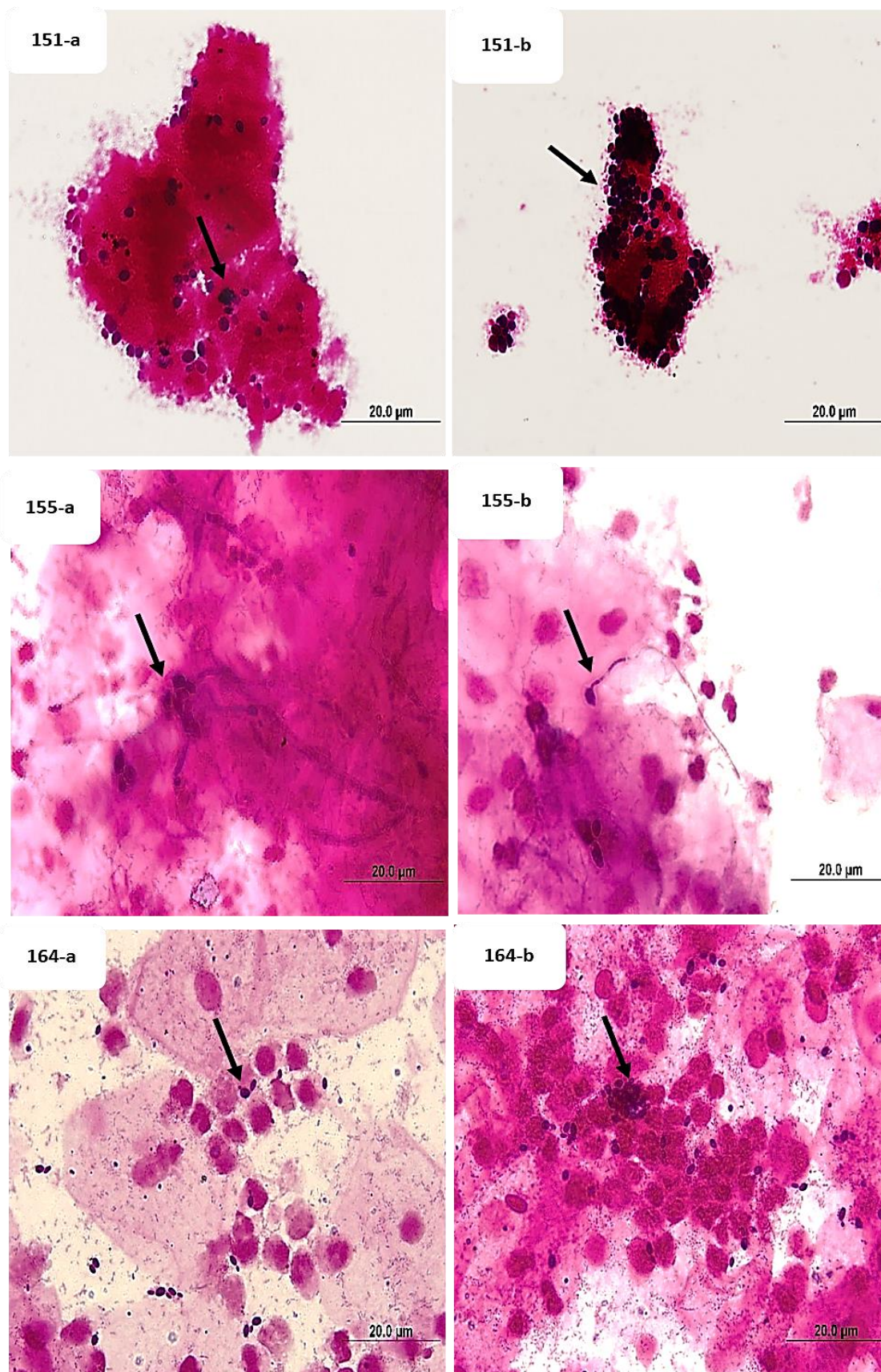
Nota: FLC: fluconazol; AMB: anfotericina B. CPATCC: *Candida parapsilosis*; controle do teste

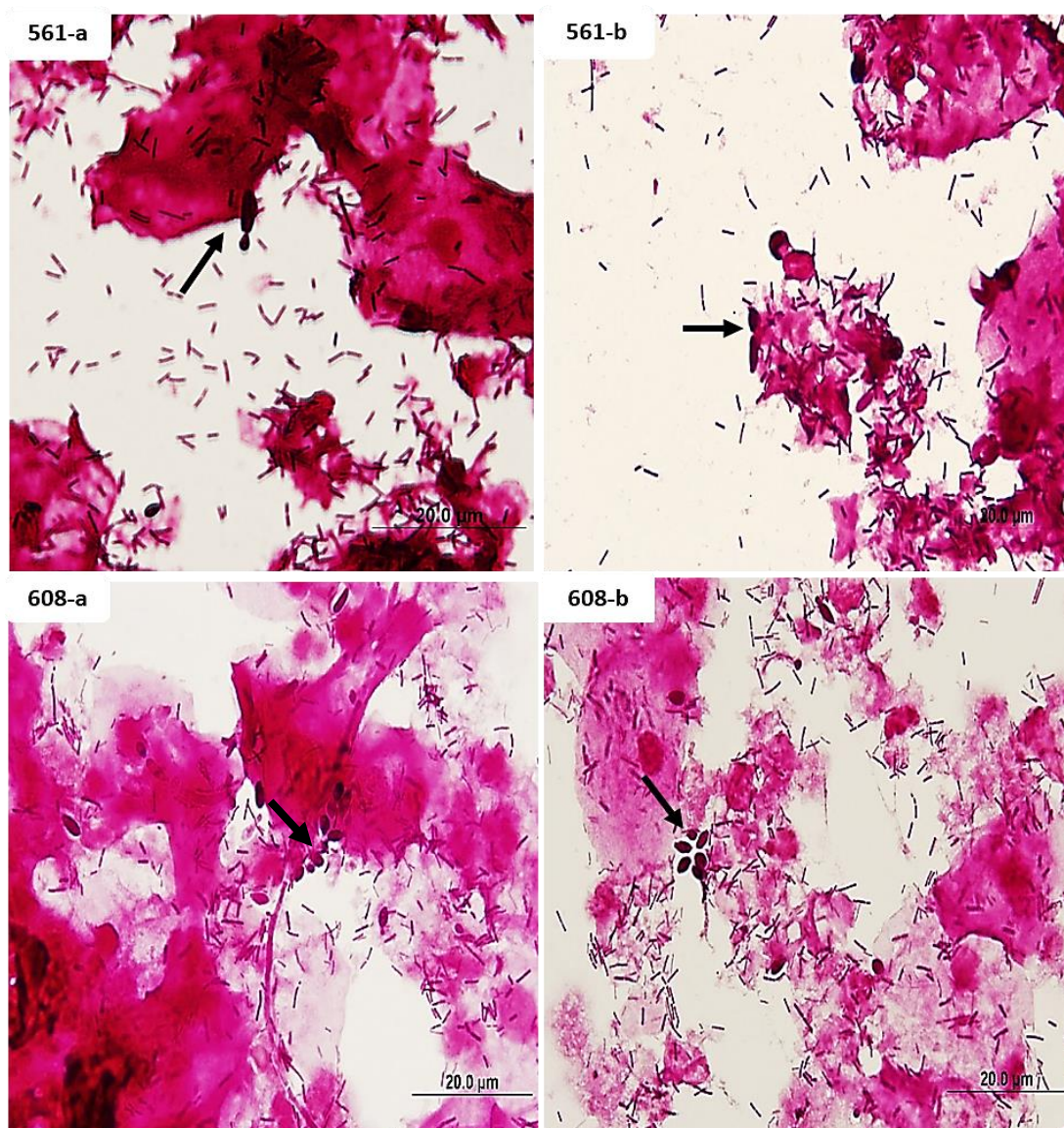
#### 6.1.4 Caracterização da amostra clínica

##### 6.1.4.1 Visualização da lâmina corada pelo método de Gram

A visualização dos esfregaços das amostras vaginais em lâmina corada pelo método de Gram (n=11) evidenciou microbiota mista (9/11) e microbiota dominada por lactobacilos (2/11), com presença de blastoconídios sugestivos de *Candida* sp., e/ou pseudo-hifas, e/ou hifas verdadeiras livres ou associadas às células epiteliais, bem como a presença de núcleos desnudos de polimorfonucleares, sugerindo um processo inflamatório local. A figura 14 mostra os esfregaços obtidos das amostras que foram empregadas para a validação do modelo de biofilme microcosmos (n=5).

**Figura 14-** Amostras clínicas de pacientes com CVV visualizadas em lâmina corada pelo método de Gram. Visualização em aumento de 1000x em microscópio óptico.





Nota: As setas indicam a presença de *Candida* sp. pela observação de blastoconídios e pseudo-hifas. A presença de núcleos desnudos de neutrófilos sugere processo inflamatório.

#### 6.1.4.2 Unidades formadoras de colônia da amostra (UFC/ mL)

Houve diferenças na quantidade de UFC/mL nas amostras em pacientes clinicamente sintomáticas para CVV (n=11). Não houve crescimento em meio MacConkey e a coloração do meio Ágar Sangue de Carneiro (5%) dificultou a contagem das colônias, portanto são apresentados na tabela 3 apenas os valores de isolados nos meios BHI e CHR. O número de UFC/mL variou de  $6 \times 10^3 (\pm 1,4)$  a  $1,01 \times 10^6 (\pm 25,5)$  em BHI e de  $8 \times 10^3 (\pm 1,4)$  a  $7,86 \times 10^5 (\pm 45,2)$  UFC/ mL em CHR (tabela 3). Em (6/11) foram isolados apenas colônias glabras, de aspecto leitoso, coloração branca a creme, morfotipo característico de *Candida* sp., sendo confirmados pela coloração de Gram, ao



serem observados estruturas sugestivas de *Candida* spp. Já em 2401, 282, 063 (3/11), além de *Candida* sp., foram isolados outros morfotipo bacterianos (observar na tabela 5). Em 561 e 608 (2/11) foram isoladas além de *Candida* sp., colônias puntiformes, transparentes, ( $>5 \times 10^7$  UFC/mL) que sua contagem não foi possível, pelo seu pequeno tamanho e grande quantidade na placa. Na coloração de Gram essas colônias puntiformes apresentaram-se como bacilos Gram positivos.

**Tabela 3** - Média do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e seus desvios-padrões ( $\pm$ SD) em amostras de secreção vaginal de pacientes com CVV (n=11).

Amostras	Média de UFC/mL	
	BHI	ChromAgar
2401	$1,01 \times 10^6 \pm 25,5$	$1,43 \times 10^5 \pm 12,7$
0802	$8,25 \times 10^4 \pm 51,6$	$5,4 \times 10^4 \pm 28,3$
2202	$6,4 \times 10^4 \pm 31,2$	$5,8 \times 10^4 \pm 13,5$
272	$6 \times 10^3 \pm 1,4$	$8,5 \times 10^3 \pm 2,1$
282	$2,4 \times 10^4 \pm 38,9$	$8 \times 10^3 \pm 1,4$
063	$1,1 \times 10^4 \pm 2,8$	$3,5 \times 10^3 \pm 2,1$
151	$1,2 \times 10^5 \pm 12,7$	$1,26 \times 10^5 \pm 38,9$
155	$1,38 \times 10^5 \pm 63,6$	$1,14 \times 10^5 \pm 23,3$
164	$7,91 \times 10^5 \pm 24$	$7,86 \times 10^5 \pm 45,2$
561	$8,35 \times 10^4 \pm 14,8$	$1,40 \times 10^5 \pm 31,8$
608	$1,82 \times 10^5 \pm 41$	$1,85 \times 10^5 \pm 112$

#### 6.1.4.3 Emprego das amostras clínicas positivas para CVV

**Tabela 4** - Amostras de secreção vaginal de pacientes com CVV (n=11), em quais testes foram empregadas e identificação de *Candida* sp. presente na amostra.

Amostras	Empregada para qual fim?	<i>Candida</i> spp. isoladas
2401	Estabelecimento do protocolo	<i>C. albicans</i>

<b>0802</b>	Estabelecimento do protocolo	<i>C. albicans</i>
<b>2202</b>	Estabelecimento do protocolo	<i>C. albicans</i>
<b>272</b>	Estabelecimento do protocolo	<i>C. albicans</i>
<b>282</b>	Estabelecimento do protocolo	<i>C. albicans</i>
<b>063</b>	Estabelecimento do protocolo	<i>C. albicans</i>
<b>151</b>	Validação do modelo em microcosmos	<i>C. albicans</i>
<b>155</b>	Validação do modelo em microcosmos	<i>C. albicans</i>
<b>164</b>	Validação do modelo em microcosmos	<i>C. glabrata</i>
<b>561</b>	Validação do modelo em microcosmos	<i>C. albicans</i>
<b>608</b>	Validação do modelo em microcosmos	<i>C. albicans</i>

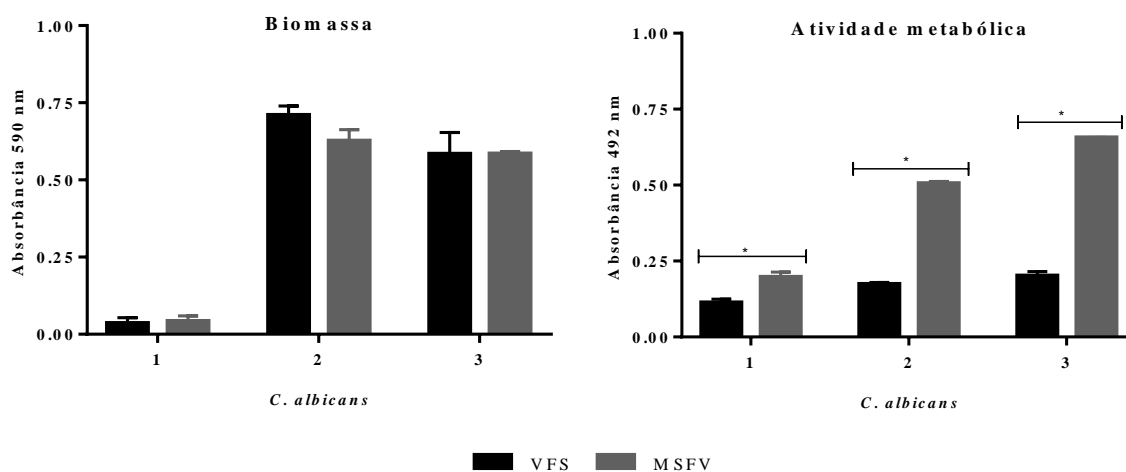
---

## **6.2 Testes para estabelecimento do protocolo**

### **6.2.1 Meio de cultivo**

Foi avaliada a capacidade de formação de biofilme por *C. albicans* em dois meios sintéticos de composição distinta que simulam o ambiente vaginal: VFS pH 4,2 (*Vaginal fluid simulant*) e MSFV pH 4,5 (*Medium simulating vaginal fluid*). Os resultados de quantificação de biomassa evidenciaram não haver diferenças significativas entre os meios de cultivo em cada amostra. No entanto, a atividade metabólica dos biofilmes de *Candida* spp. mostrou-se maior em todas as amostras que foram cultivadas em MSFV (gráfico 1).

**Gráfico 1** - Capacidade de formação de biofilme em meios VFS e MSFV em cepas clínicas *C. albicans* provenientes de amostras vaginais.



VFS: *Vaginal fluid simulant* e MSFV: *Medium simulating vaginal fluid*.

### 6.2.2 Condições de incubação: tempo, temperatura e atmosfera gasosa

Inicialmente, foi avaliada formação de biofilme microcosmos (BMi) em uma amostra clínica (2401) em MSFV por 24h a 35°C em aerobiose e microaerofilia, bem como por até 72h a 37°C em anaerobiose. Após raspagem dos biofilmes e semeadura em diferentes meios de cultura (BHI, CHR e MAC) para determinação do número de UFC/mL, observou-se que houve crescimento microbiano apenas em BMi formados em aerobiose ou microaerofilia. Não foi observada formação de biofilmes na condição de anaerobiose, mesmo após 72h de incubação, independente do meio de cultura empregado para a recuperação das células. O meio MAC não permitiu a recuperação das células que compunham os BMi, independente da condição de incubação. A tabela 6 mostra os resultados do isolamento de colônias (UFC/ml) em cada condição experimental. Há diferença significativa apenas no número de UFC/mL em ChromAgar, em que foram isoladas mais colônias em aerobiose que em microaerofilia ( $p < 0,05$ )

**Tabela 5** - Número de unidades formadoras de colônias/mL (UFC/mL) e morfotipos predominantes obtidos partir do cultivo da amostra 2401 por 24 horas em aerobiose a 35 °C nos meios BHI (*Brain Heart Infusion Agar*), CHR (*Chromagar Candida*) e MAC (*MacConkey*).

Meio de cultura	Aerobiose		Microaerofilia	
	UFC/mL	Morfotipos	UFC/mL	Morfotipos
<b>BHI</b>	1,09 x 10 <sup>6</sup> ± 26,16	Cocos Gram (+)	1,01 x 10 <sup>6</sup> ± 25,46	Bacilos Gram (+)
		Bacilos Gram (+)		Diplocococos Gram (+)
		Diplocococos Gram (+)		<i>Candida</i> spp.
		<i>Candida</i> spp.		
<b>CHR</b>	1,95 x 10 <sup>5</sup> ± 22,63	<i>Candida</i> spp.	1,43 x 10 <sup>5</sup> ± 12,73	<i>Candida</i> spp.
<b>MAC</b>	0	-	0	-

Não foi observado crescimento microbiano após cultivo da amostra por 72 horas em anaerobiose a 37 °C. Resultados mostrados como média ± desvio padrão das amostras (SD).

**TOMADA DE DECISÃO:** Diante desses resultados, decidiu-se optar pela condição de crescimento em microaerofilia a 35 °C em MSFV para os estudos de formação de BMi, pois esta revelou resultados semelhantes àqueles mostrados no crescimento em aerobiose, no que tange à diversidade de morfotipos bacterianos e número de UFC/mL, bem como é a condição de tensão de oxigênio que mais se aproxima do encontrado no ambiente vaginal.

Com essa condição estabelecida, foi avaliada a capacidade de formação de BMi em duas amostras clínicas (2401, 282), avaliando os parâmetros: número de UFC/mL na amostra e no BMi, biomassa e atividade metabólica. unidades formadoras de colônia. Os BMi foram incubados em meio MSVF por 24h e 48h.

As condições para esse teste foram: microaerofilia, temperatura de 35°C, período de incubação de 24h e 48h, em MSFV.

Os dados obtidos mostraram que houve uma redução no número de UFC/mL ao se comparar os cultivos de 24h e 48h em BHI para a amostra 2401 e em BHI e CHR para a amostra 282. Os valores de biomassa aumentaram de 24h para 48h no BMi da amostra 2401 e atividade metabólica aumentou de 24h para 48h no BMi das duas amostras (tabela 6).

**TOMADA DE DECISÃO:** Dado o reduzido volume coletado de cada amostra clínica, tornou-se inexecutável analisar todos os parâmetros de caracterização do biofilme microcosmos em 24, 48 e 72h de cultivo. Decidiu-se, portanto, avaliar os biofilmes no seu estágio de maturação mais avançado, ou seja, após 48 e 72h de incubação.

Com as condições de microaerofilia e tempo de cultivo estabelecidas, prosseguiu-se para mais uma etapa. As próximas duas amostras (272, 063) foram analisadas nas seguintes condições: microaerofilia, temperatura de 35°C, tempo de incubação de 48h e 72h, em meio MSFV. Os resultados evidenciam desenvolvimento semelhantes nos biofilmes formados. O número de UFC/mL aumentou de 48h para 72h na amostra 272 em BHI e CHR. Houve redução de biomassa entre 48h e 72h no BMi da amostra 063. Os outros valores mantiveram-se iguais estatisticamente (tabela 7). Observamos que, devido ao reduzido volume de MSFV adicionado durante a formação do biofilme, 60 µl por poço, havia ocorrido evaporação do meio, o que poderia ter comprometido o desenvolvimento do biofilme por até 72h. Então resolvemos substituir o meio de cultivo a cada 24 horas. Das amostras 0802 e 2202 foi possível analisar apenas o UFC/mL das amostras, pois as mesmas não foram capazes de formar biofilme.

**Tabela 6** - Número de unidades formadoras de colônias (UFC/ml) nas amostras clínicas 2401 e 282 e em biofilmes microcosmos originados dessas amostras após 24 e 48h de cultivo em microaerofilia a 35°C no meio MSFV.

Amostra	Inóculo inicial (UFC/mL)		Biofilme							
			UFC/mL				Biomassa		Atividade metabólica	
			24h		48h		24h	48h	24h	48h
			BHI	CHR	BHI	CHR				
2401	1,01 x 10 <sup>6</sup>	1,43 x 10 <sup>5</sup>	1,54 x 10 <sup>6</sup>	5,1 x 10 <sup>5</sup>	1,0 x 10 <sup>6</sup>	7,3 x 10 <sup>5</sup>	0,60	1,11	0,54	0,91
	± 25,46	± 12,73	± 297	± 137,2	± 65,05	± 114,6	± 0,2	± 0,3	± 0,006	± 0,2
282	2,4 x 10 <sup>4</sup>	8 x 10 <sup>3</sup>	4,28 x 10 <sup>5</sup>	3,1 x 10 <sup>5</sup>	1,86 x 10 <sup>5</sup>	1,52 x 10 <sup>5</sup>	0,45	0,32	0,26	0,13
	± 38,89	± 1,41	± 74,25	± 24,75	± 25,46	± 22,63	± 0,002	± 0,08	± 0,009	± 0,01

Valores de absorvância são mostrados para as análises de biomassa e atividade metabólica dos biofilmes formados nas condições citadas. (±desvios-padrões dos valores obtidos). BHI: *Brain Heart Infusion Agar*, CHR: *Chromagar Candida*. Valores circulados em azul mostram redução significativa nos tempos de 24h para 48h. Valores circulados em vermelho mostram aumento significativo em 24h e 48h. (p<0,05).

**Tabela 7** - Número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL) nas amostras clínicas 272 e 063 e em biofilmes microcosmos originados dessas amostras após 48 e 72h de cultivo em microaerofilia 35°C no meio MSFV.

<b>Biofilme</b>										
Amostra	Inóculo inicial (UFC/mL)		UFC/mL				Biomassa		Atividade metabólica	
			48h		72h		48h	72h	48h	72h
	BHI	CHR	BHI	CHR	BHI	CHR				
<b>272</b>	$6 \times 10^3$	$8,5 \times 10^3$	$1,17 \times 10^6$	$1,45 \times 10^6$	$1,51 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$	0,65	0,34	1,08	0,578
	$\pm 1,4$	$\pm 2,1$	$\pm 206,5$	$\pm 125,2$	$\pm 404,5$	$\pm 588,3$	$\pm 0,006$	$\pm 0,16$	$\pm 0,76$	$\pm 0,06$
<b>063</b>	$1,1 \times 10^4$	$3,5 \times 10^3$	$2,2 \times 10^4$	$2,15 \times 10^4$	$3,75 \times 10^4$	$1,85 \times 10^4$	0,43	0,17	0,307	0,138
	$\pm 2,8$	$\pm 2,1$	$\pm 1,41$	$\pm 0,7$	$\pm 3,5$	$\pm 2,12$	$\pm 0,03$	$\pm 0,02$	0,02	$\pm 0,08$

Valores de absorvância são mostrados para as análises de biomassa e atividade metabólica dos biofilmes formados nas condições citadas. ( $\pm$ desvios-padrões dos valores obtidos). BHI: *Brain Heart Infusion Agar*, CHR: *Chromagar Candida*. Valores circulados em azul mostram redução significativa nos tempos de 48h para 72h. Valores circulados em vermelho mostram aumento significativo em 48h e 72h. ( $p < 0,05$ )

Desta forma, foi definido que as condições mais apropriadas para o estabelecimento do modelo de BMi foram:

- Amostra: 60  $\mu$ L; diluída 1:2 em meio de cultura
- Meio: MSFV pH4,5 (com troca de meio fresco a cada 24 h – 200  $\mu$ l )
- Temperatura: 35°C
- Atmosfera: microaerofilia
- Tempo de incubação: 48h e 72h

### 6.3 Testes para validação do modelo de biofilme microcosmos *in vitro*

#### 6.3.1 Caracterização dos biofilmes microcosmos (BMi)

Após a definição das condições de formação dos BMi descritas acima, foram avaliadas cinco amostras clínicas (151, 155, 164, 561, 608), cujos resultados estão descritos a seguir.

##### 6.3.1.1 Número de unidades formadoras de colônia de *Candida spp.* (UFC/mL) em biofilmes microcosmos (BMi) e monoespécie (BMo)

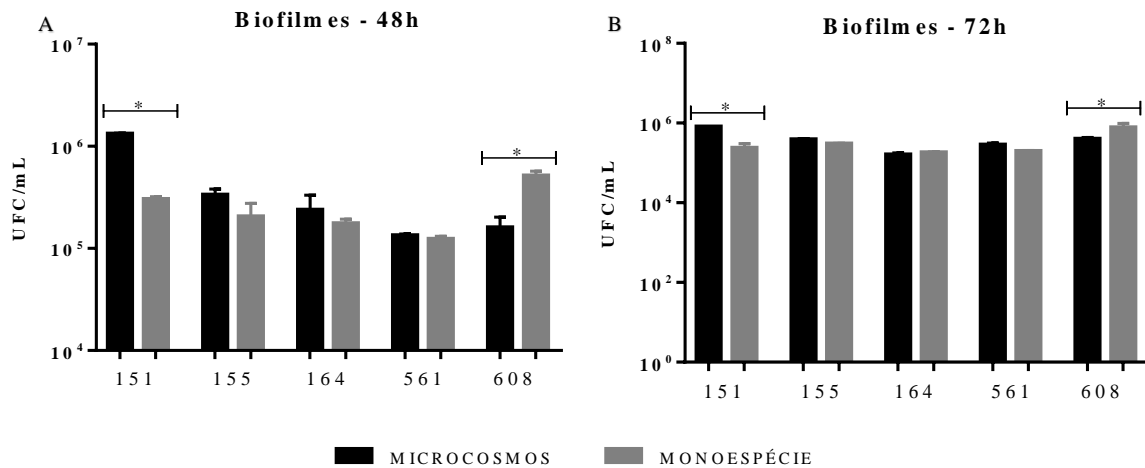
Na maioria das amostras não houve diferença significativa do número de UFC/mL isoladas em BMi e BMo. Contudo, o BMi da mostra 151 foi mais numeroso que o seu BMo (65% e 20% maior em 48h e 72h, respectivamente). Por sua vez, a cepa 608 mostrou comportamento inverso, em que foram isoladas mais UFC/mL em seu BMo, que o seu correspondente BMi (69% a mais em 48h e 49,5% a mais em 72h). (gráfico 2-A e B).

Comparando a cinética de BMi nos intervalos de 0 hora, 48 horas e 72 horas, observou-se aumento no número de células do tempo zero para 48 horas em todas as amostras. Além disso, houve redução 39% no número de UFC/mL de 48h para 72h na amostra 151 e aumento no número de UFC/mL de 48 para 72h nas amostras 561 (53%) e 608 (60%) (gráfico 3 - A). Ainda, nas amostras 561 e 608 também foi possível observar o crescimento de colônias puntiformes, transparentes, semelhantes à bacilos Gram positivos na coloração de Gram. Este morfotipo também foi isolado no UFC/mL da amostra, indicando que permaneceram no desenvolvimento do BMi.



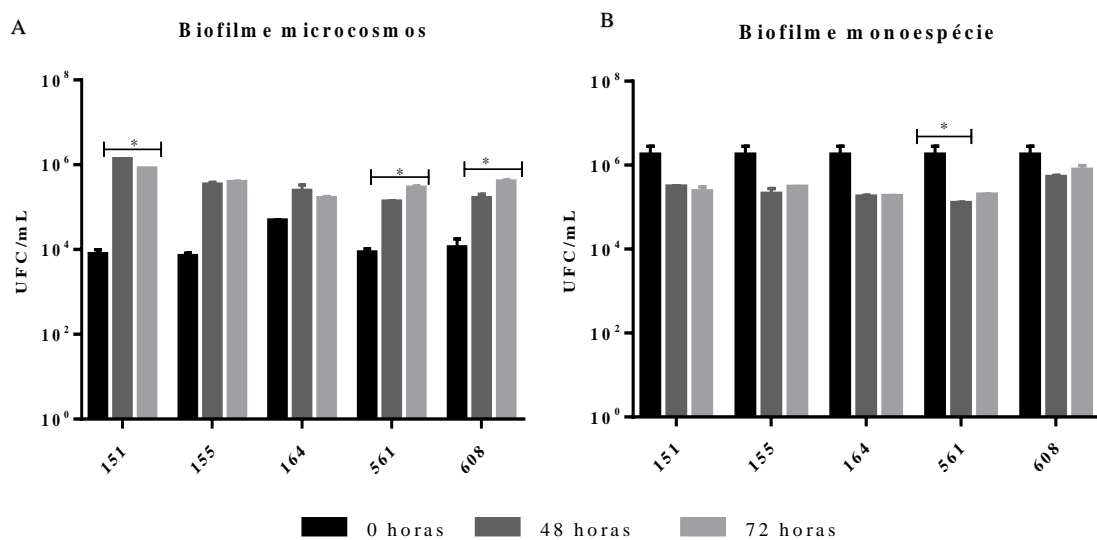
No BMo não houve diferenças significativas do número de UFC/mL entre os tempos zero, 48 e 72h em grande parte das cepas testadas. Com exceção da cepa 561, que reduziu em 30% o número de UFC/mL no intervalo de zero para 48 horas (gráfico 3 - B).

**Gráfico 2** - Número de unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) obtidas nos biofilmes microcosmos crescidos em Sabouraud com cloranfenicol e biofilmes monoespécie cultivados em Ágar Batata



A-UFC/mL isoladas em BMi e BMo em 48h. B - UFC/mL isoladas em BMi e BMo em 72h.

**Gráfico 3**- Número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC/mL) obtidas no inóculo iniciador, em 48 e 72 horas em biofilme microcosmos e monoespécie crescidos em Sabouraud com cloranfenicol e Ágar Batata

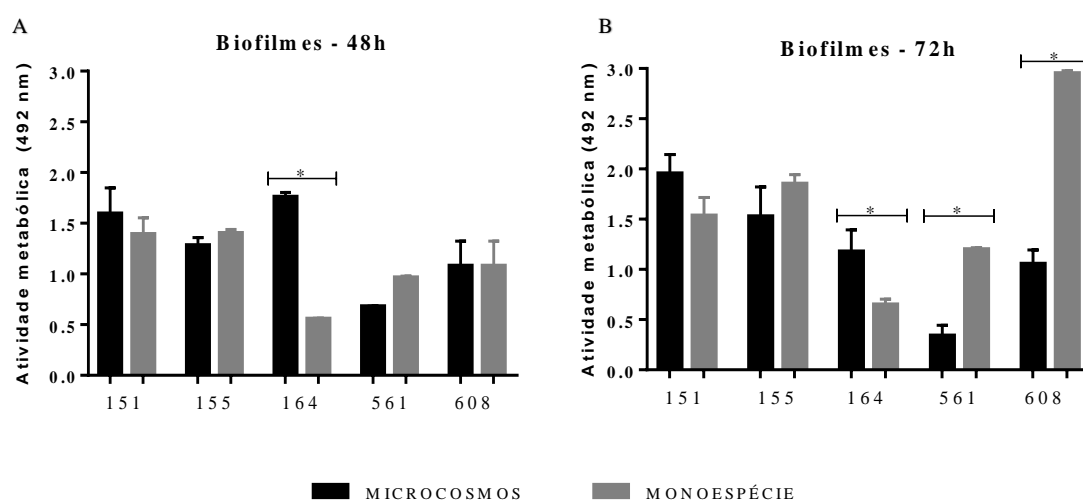


A – cinética de crescimento do BMi. B – cinética de crescimento do BMo.

### 6.3.1.2 Atividade metabólica em biofilmes microcosmos e monoespécie

Quanto à atividade metabólica em BMi e BMo, observou-se que a amostra 164 teve uma atividade metabólica maior em BMi que seu correspondente em BMo (70% maior em 48h e 45% maior em 72h). Contrariamente, as amostras 561 e 608 tiveram valores de atividade metabólica menores em BMi que em BMo no tempo de 72h (de 65 e 72% menos, respectivamente) (gráfico 4 – A e B). As amostras 151 e 155 apresentaram valores equivalentes de atividade metabólica em BMi e BMo.

**Gráfico 4** - Atividade metabólica do biofilme microcosmos e monoespécie em 48 e 72 horas. Leitura feita em comprimento de onda de 492 nm.

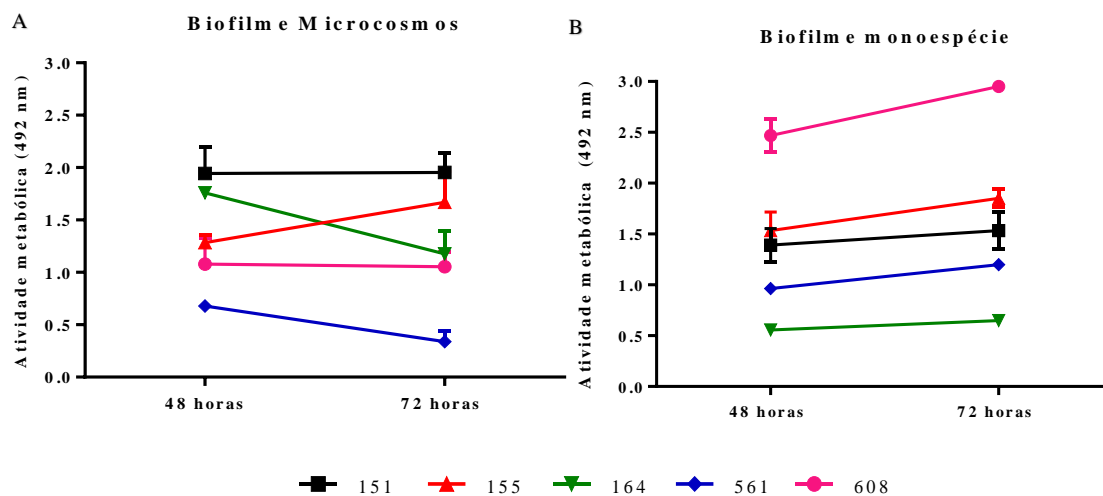


A – Atividade metabólica de BMi e BMo em 48h. B – Atividade metabólica de BMi e BMo em 72h.

Avaliando as diferenças de metabolismo em BMi ao longo dos tempos de cultivos, 48 e 72h, observou-se não haver alterações significativas na maioria das amostras. Apenas a amostra 164 sofreu redução significativa de 33% em seu metabolismo no intervalo de 48 para 72 horas (gráfico 5 -A).

Por sua vez, a atividade metabólica de BMo manteve-se constante na maioria das cepas testadas entre 48 e 72h. Porém, a amostra 608 aumentou sua atividade metabólica significativamente em 20 % (gráfico 5-B).

**Gráfico 5** - Atividade metabólica no período de 48 a 72 horas de biofilme microcosmos e monoespécie. Leitura feita em comprimento de onda de 492 nm.



A- atividade metabólica de BMi no intervalo de 48 para 72h. B – atividade metabólica de BMo no intervalo de 48 para 72h.

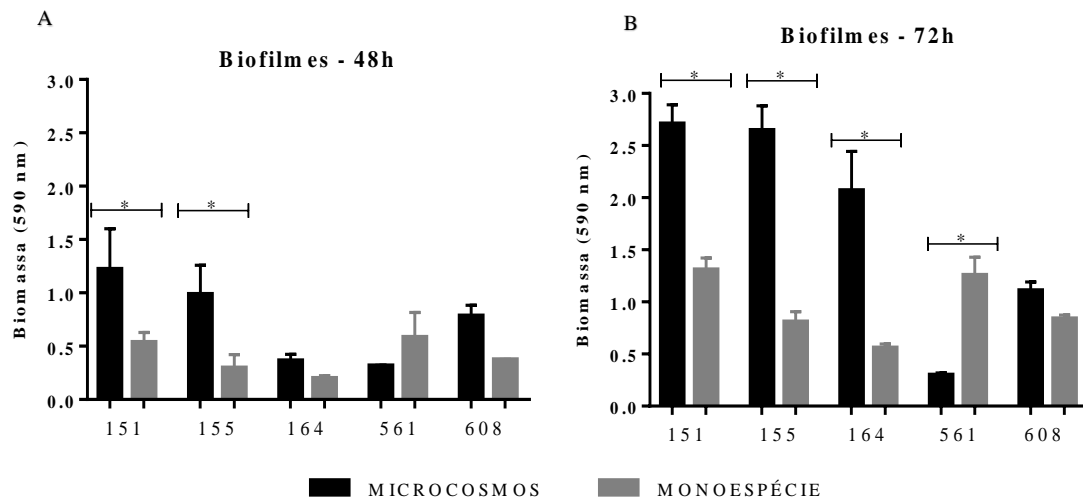
### 6.3.1.3 Quantificação de Biomassa

A biomassa do BMi das amostras 151 e 155 foram mais robustas 57 a 70 % que do BMo. A amostra 164 só evidenciou diferença no BMi maduro (tempo de 72h), com biomassa 70% maior que o BMo, Contudo, na amostra 561 houve expressão de maior biomassa no BMo, 76% maior que o BMi. Não houve diferença significativa entre os valores de biomassa do BMi e BMo para a amostra 608. (gráfico 6 – A e B).

Ao analisar a cinética do BMi em 48 e 72 horas, evidenciou-se aumento significativo de 54 a 82% na quantificação da biomassa das amostras 151, 155 e 164. Contudo, não houve diferenças significativas de quantificação de biomassa de 48 pra 72h nas amostras 561 e 608 (gráfico 7-A).

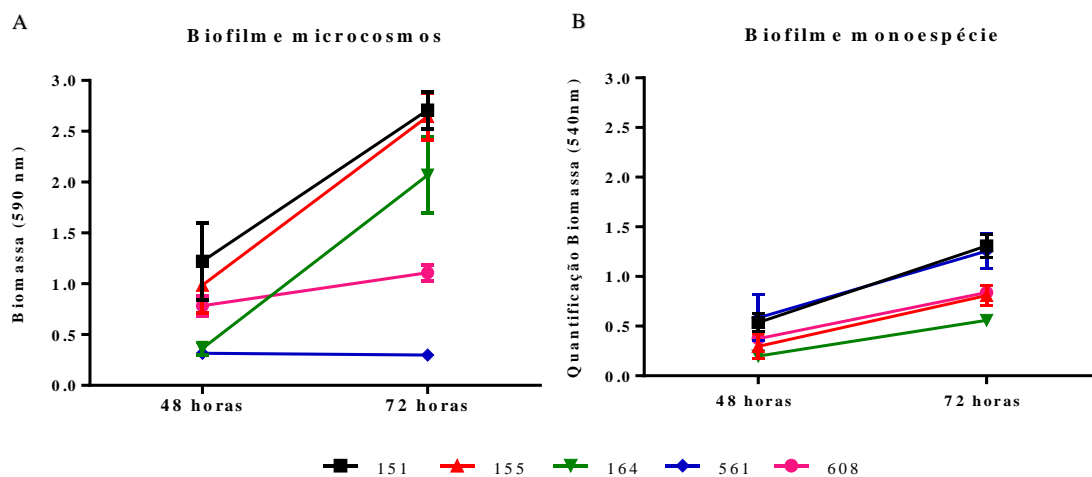
Já os valores de quantificação de biomassa em BMo aumentaram significativamente de 53 a 63% no período de 48 para 72h na maioria das cepas, à exceção da cepa 164 que não obteve valores com diferenças significativos (gráfico 7- B).

**Gráfico 6** - Biomassa do biofilme microcosmos e monoespécie em 48 e 72 horas. Leitura realizada em comprimento de onda de 590 nm.



A – Biomassa de BMi e BMo em 48h. B – Biomassa de BMi e BMo em 72h.

**Gráfico 7** - Biomassa no intervalo de 48 para 72 horas dos biofilmes microcosmos e monoespécie. Leitura feita em comprimento de onda de 590 nm.

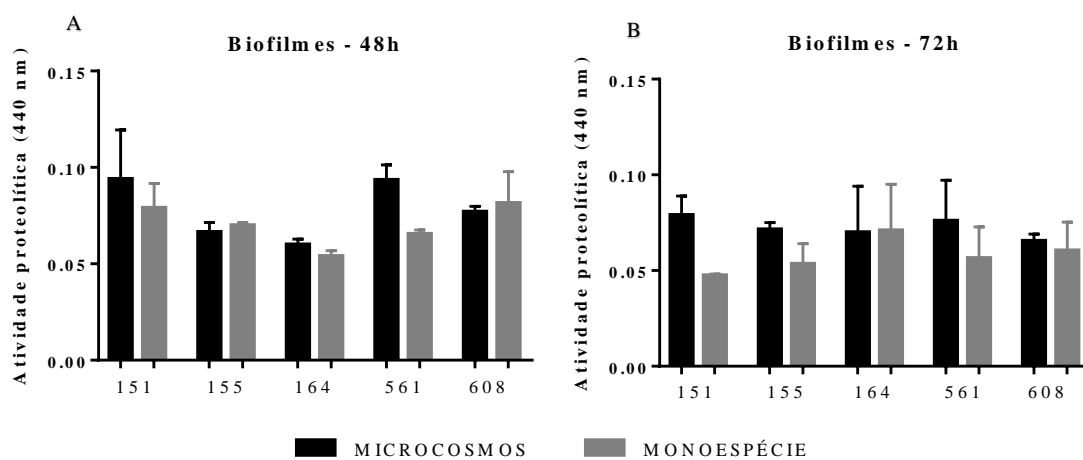


A – Biomassa de BMi no intervalo de 48h para 72h. B – Biomassa de BMo no intervalo de 48 para 72h.

#### 6.3.1.4 Atividade proteolítica:

A atividade proteolítica do BMi e BMo manteve-se constante em todas as amostras/cepas avaliadas (gráfico 8 – A e B).

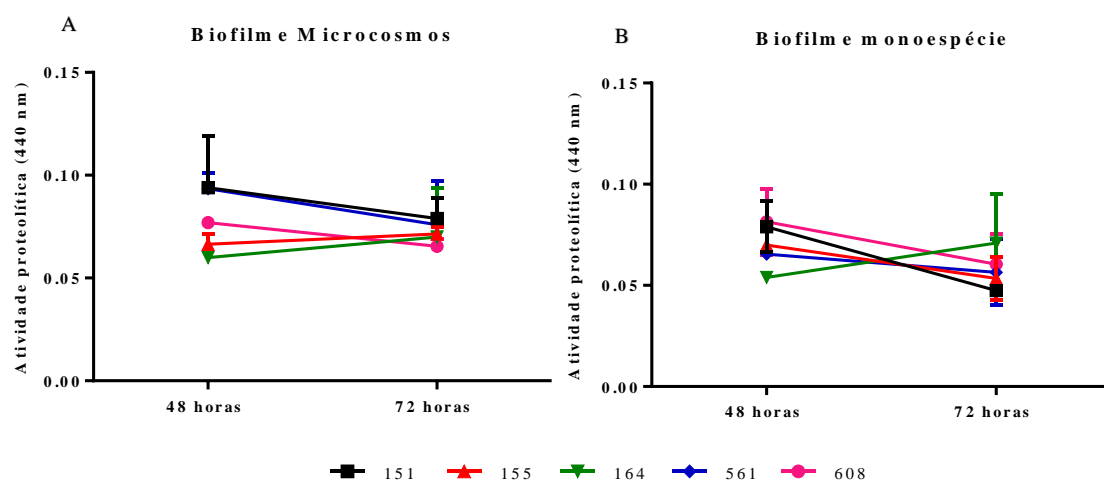
**Gráfico 8** - Atividade proteolítica dos biofilmes microcosmos e monoespécie em 48 e 72 horas. Leitura feita em comprimento de onda de 440 nm.



A - atividade proteolítica de BMi e BMo em 48h. B – atividade proteolítica de BMi e BMo em 72h.

A atividade proteolítica não sofreu mudanças no intervalo de análise de 48 para 72h em todas as amostras analisadas em BMi e BMo (gráfico 9– A e B).

**Gráfico 9** - Atividade proteolítica de 48 para 72 horas nos biofilmes microcosmos e monoespécie. Leitura feita em comprimento de onda de 440 nm.



A – atividade proteolítica de BMi no intervalo de 48 para 72h. B – atividade proteolítica de BMo no intervalo de 48 para 72h

### 6.3.1.5 Sensibilidade ao fluconazol em 48h de maturação dos biofilmes

Ao se comparar a sensibilidade dos BMi, percebe-se que não há uma tendência de comportamento, é dependente de cada amostra. No entanto, observa-se que em todas as amostras há redução ou manutenção da viabilidade na concentração de 512  $\mu\text{g/mL}$ . Em compensação, os BMo seguem uma inclinação de redução em seu metabolismo apenas nas concentrações mais elevadas de teste (256-512  $\mu\text{g/mL}$ ) (gráfico 10 – A a J).

A amostra 151, em BMi, obteve reduções crescentes nas concentrações de 64-256  $\mu\text{g/mL}$  (de 10% a 40%) e porcentagem igual ao controle na maior concentração avaliada (gráfico 10 – A). Por sua vez, o BMo foi reduzido em 50% somente na concentração de 512  $\mu\text{g/mL}$  (gráfico 10 – B).

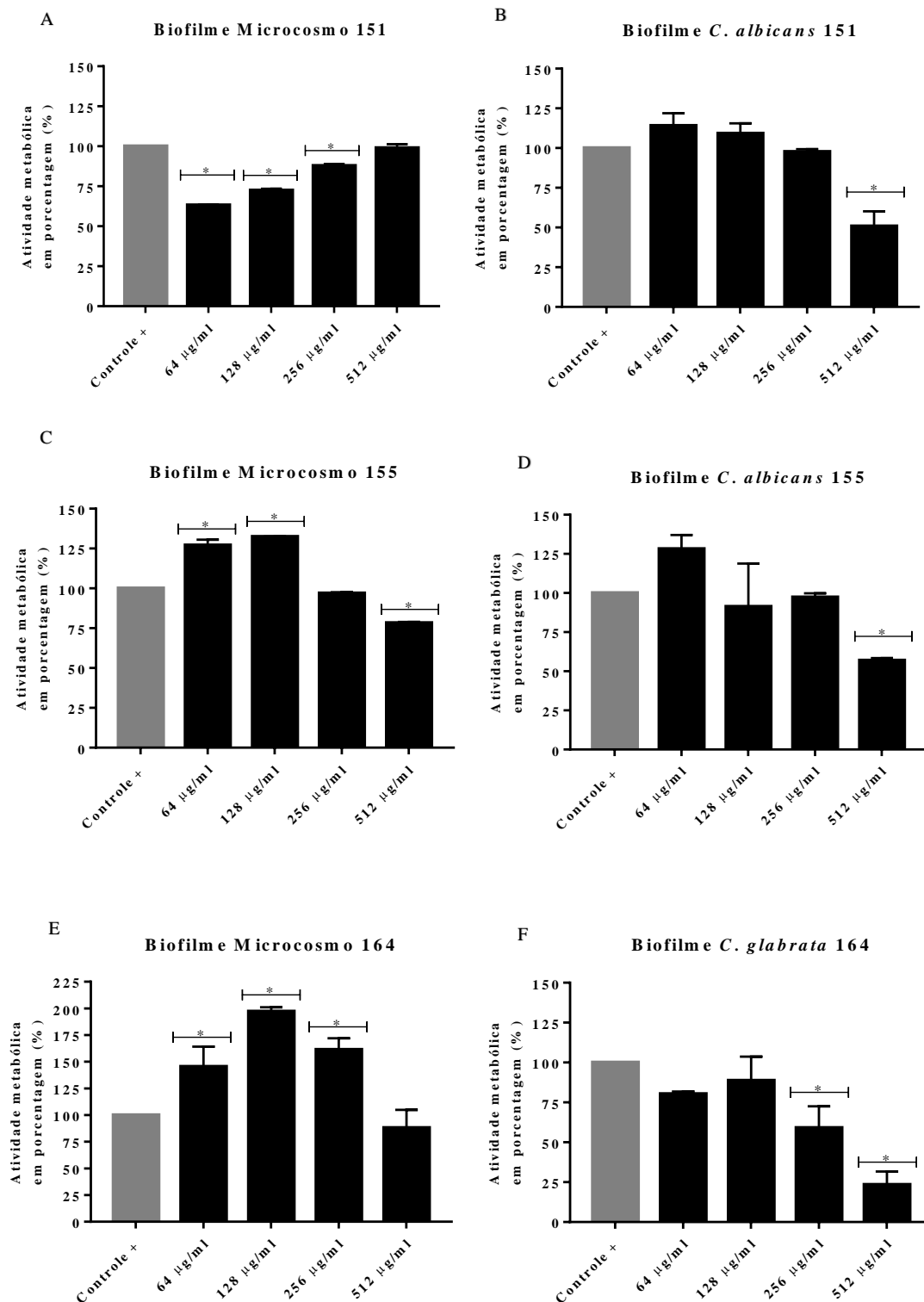
A amostra 155, em BMi, aumentou sua atividade metabólica (de 25 a 30%) nas concentrações intermediárias (64 e 128  $\mu\text{g/mL}$ ) e reduziu 23% em 512  $\mu\text{g/mL}$  (gráfico 10 – C). Seu BMo reduziu o metabolismo apenas em 512  $\mu\text{g/mL}$  (60%) (gráfico 10 – D).

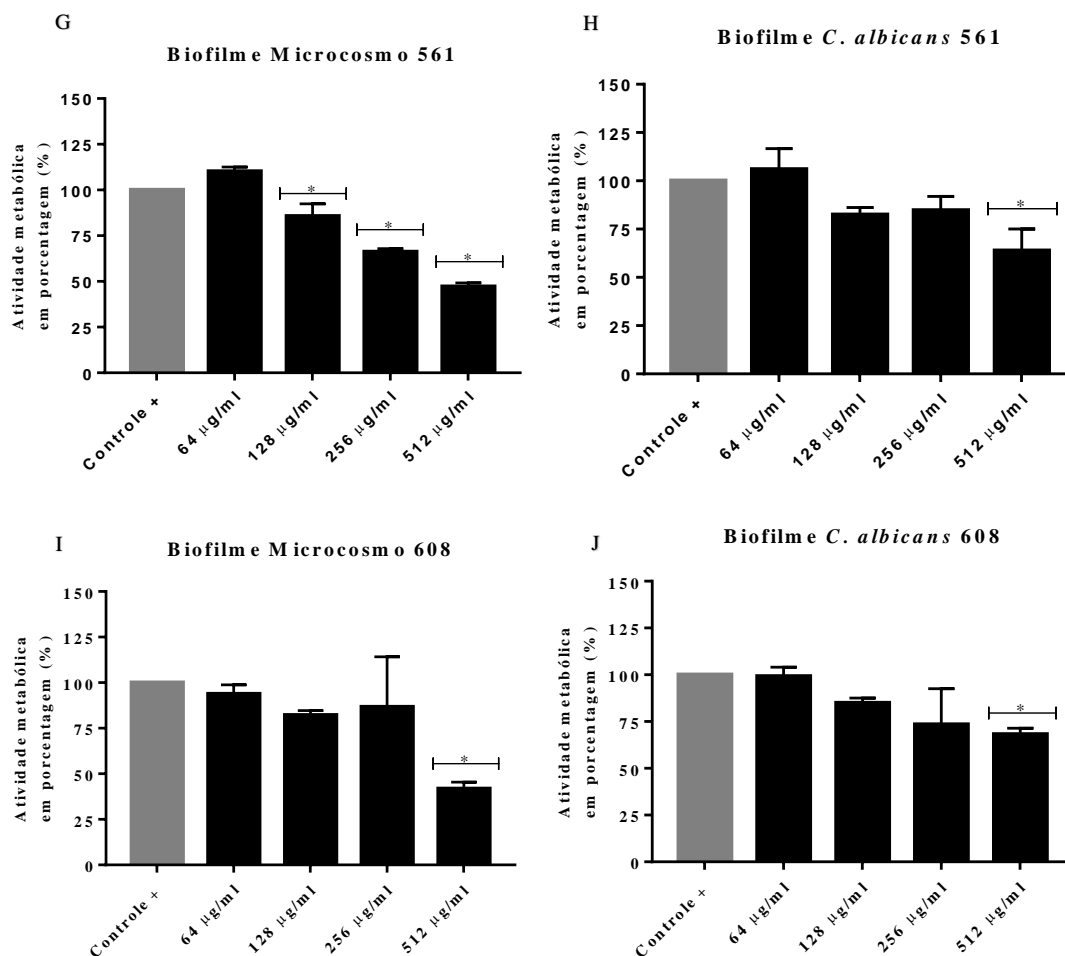
A amostra 164 também aumentou seu metabolismo em BMi nas concentrações intermediárias de 64 a 256  $\mu\text{g/mL}$  (de 40 a 100%), enquanto que na concentração mais elevada, a atividade metabólica permaneceu correspondente ao controle livre de droga (gráfico 10 – E). O BMo evidenciou redução metabólica que variou de 30% a 50% em 256 e 512  $\mu\text{g/mL}$  (gráfico 10 – F).

A amostra 561 reduziu sua atividade metabólica em BMi a partir da concentração de 128  $\mu\text{g/mL}$  até 512  $\mu\text{g/mL}$  (variação de 10% a 50%). Apenas a concentração de 64  $\mu\text{g/mL}$  teve metabolismo semelhante ao controle positivo (gráfico 10 – G). Em BMo, houve redução de 36% na atividade metabólica entre a concentração de 512  $\mu\text{g/mL}$  e o controle livre de droga (gráfico 10 – H).

Por fim, a amostra 608, em BMi, manteve os valores de seu metabolismo iguais ao controle e reduziu em 60% sua atividade metabólica na concentração de 512  $\mu\text{g/mL}$  de FLC (gráfico 10 – I). O BMo dessa cepa reduziu sua atividade metabólica em 23% na concentração de 512  $\mu\text{g/mL}$  (gráfico 10 – J).

**Gráfico 10** - Perfil de sensibilidade ao FLC de biofilmes microcosmos e monoespécie formados em 48 horas de cultivo.





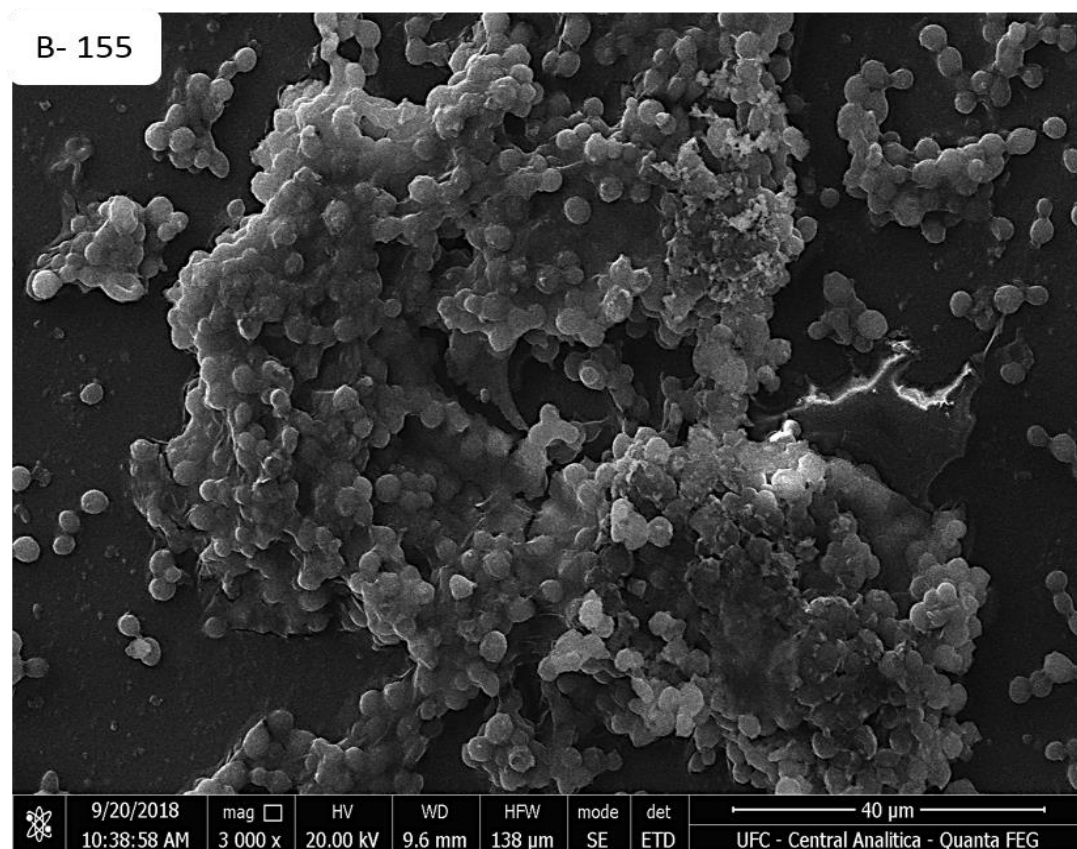
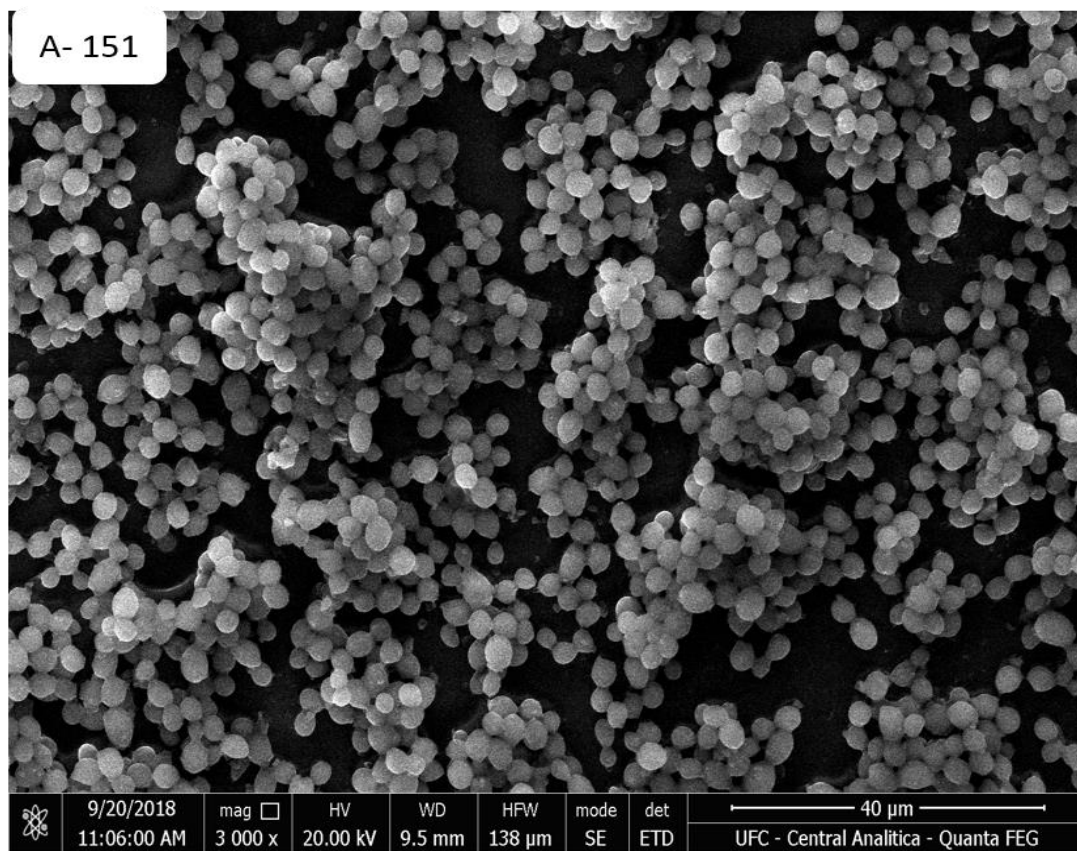
### 6.3.1.6 Micromorfologia e análise estrutural do BMi

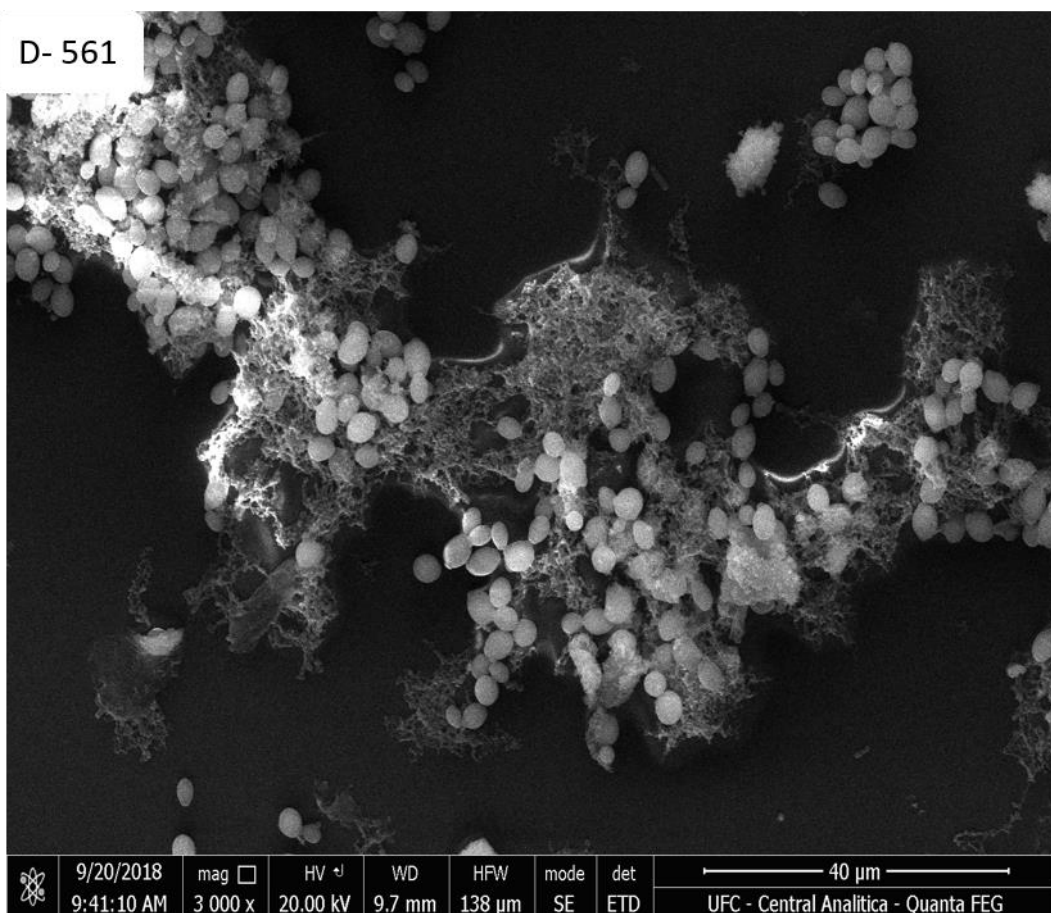
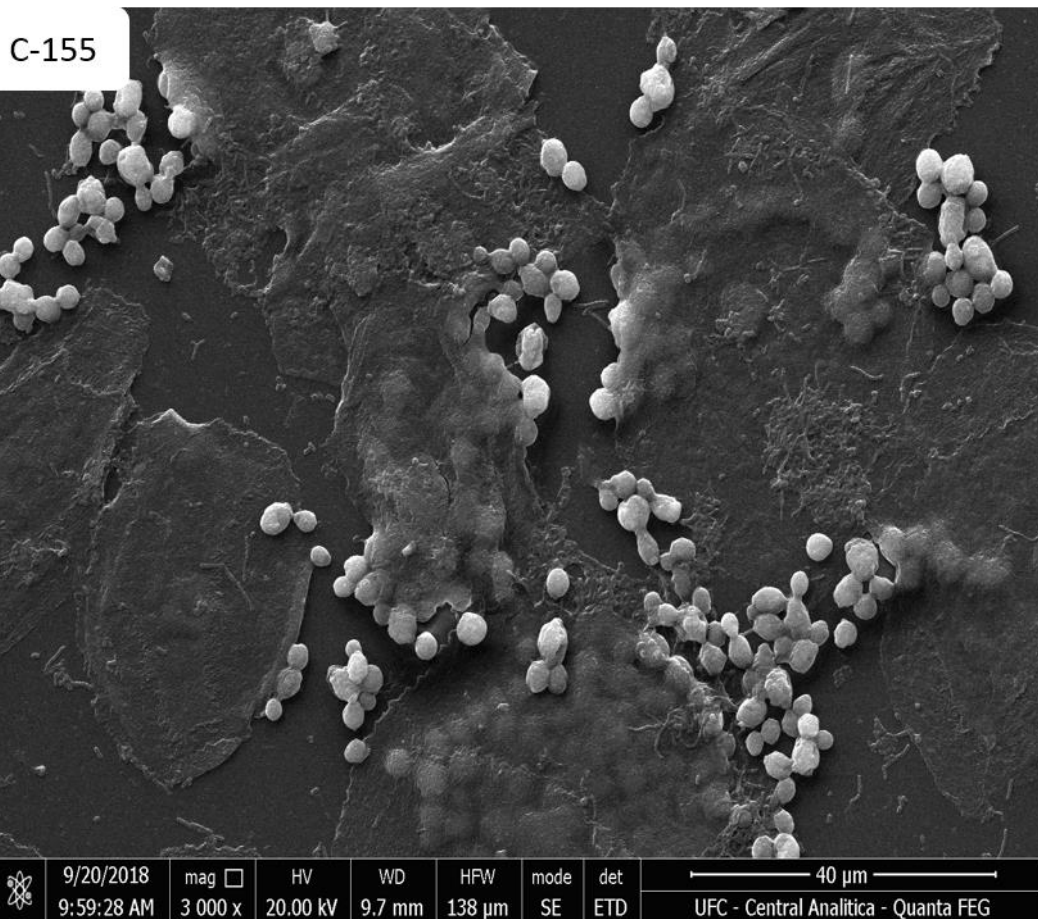
As imagens obtidas a partir de microscopia eletrônica de varredura (MEV) são representativas das amostras estudadas e evidenciaram um biofilme microcosmos que é dominado por blastoconídios de *Candida* spp. A sua robustez variou para cada amostra (figuras 15 A e B). Na figura 15 C e D observou-se a aderência de *Candida* sp. às células epiteliais, por mais que as mesmas tenham sido danificadas devido ao processo de desidratação pelos quais passam as amostras.

A relação de fluorescência das amostras mostrou principalmente a arquitetura do BMi (figura 16 A e B), o predomínio de *Candida* spp. e sua adesão às células epiteliais (figura 16 C e D).

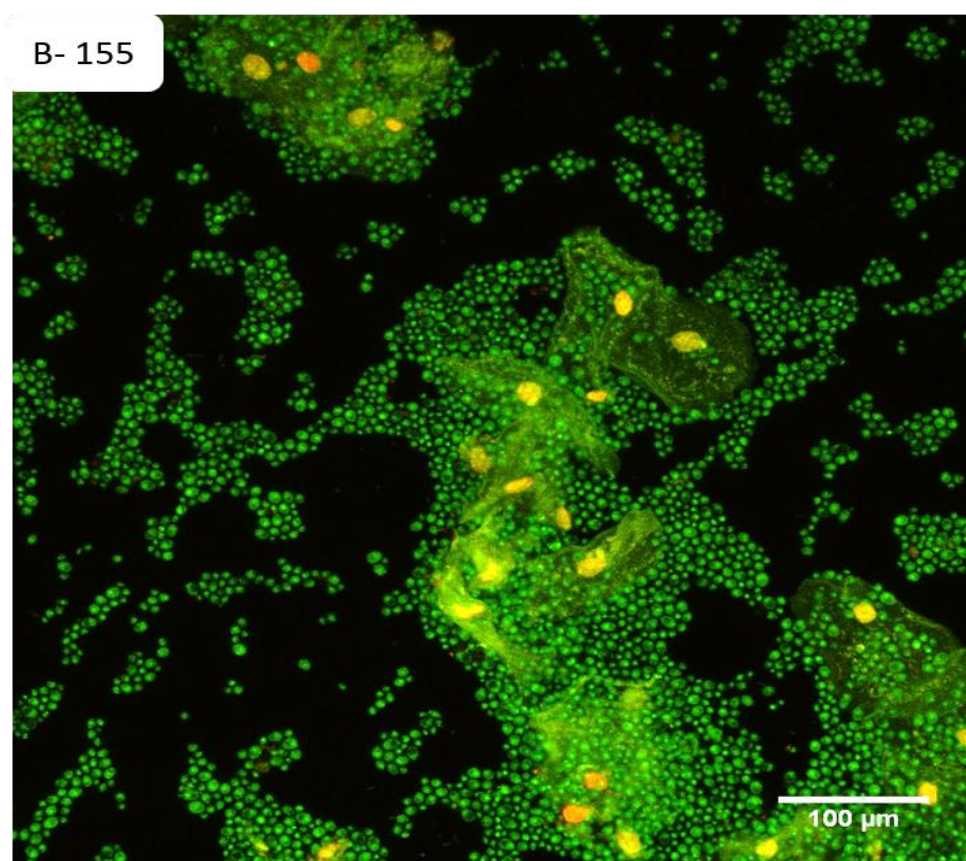
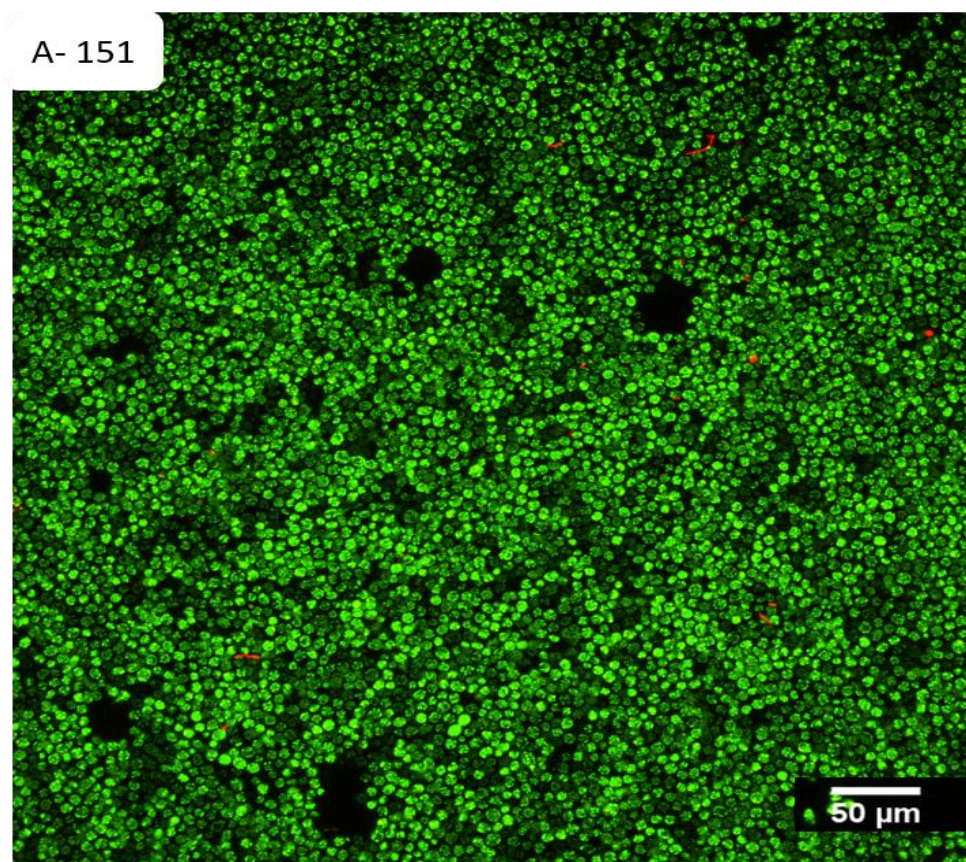


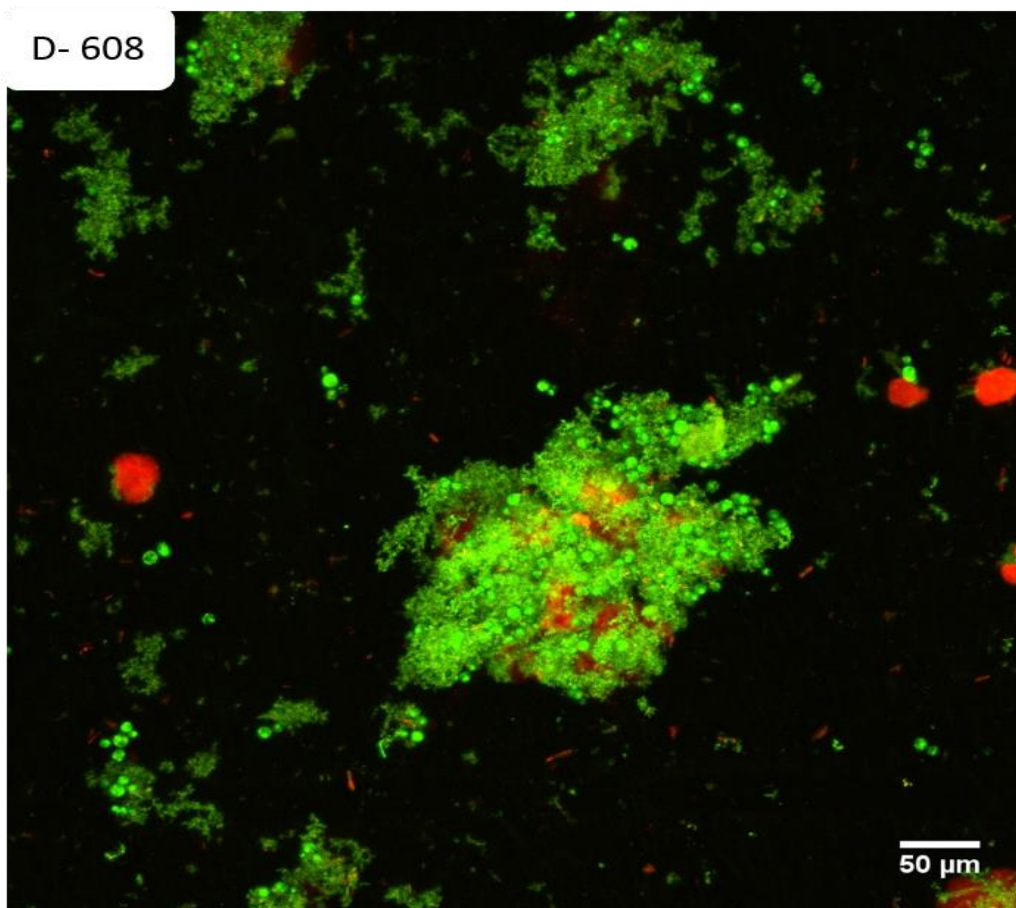
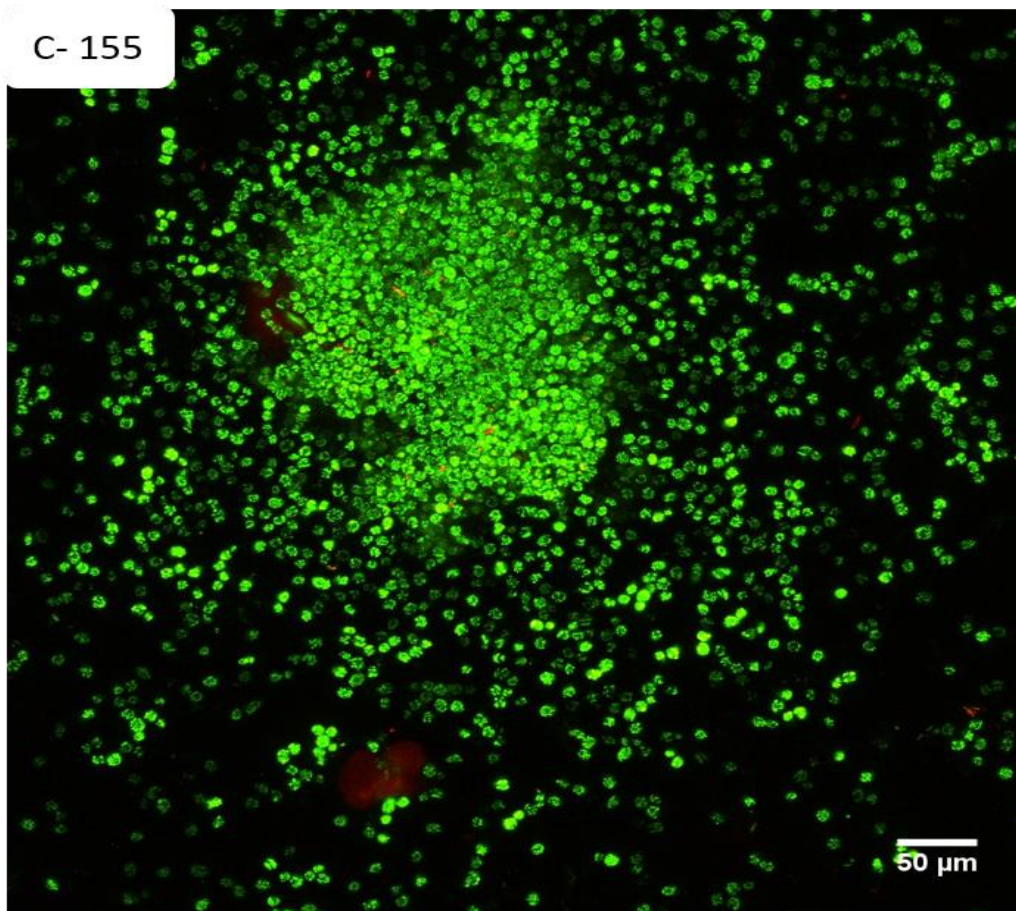
**Figura 15** - Imagem de microscopia eletrônica de varredura obtida a partir de biofilme microcosmos.





**Figura 16** - Imagem de microscopia confocal obtida a partir de biofilme microcosmo.  
Magnitude: 600x.





## 7. DISCUSSÃO

Grande número de mecanismos regulatórios está associado à interação entre a microbiota vaginal e *Candida*, estudos associados à formação de biofilmes a partir de microcosmos vaginais podem fornecer informações valiosas mais relacionadas ao ambiente *in vivo* durante o processo infeccioso. Assim, neste trabalho foi estabelecido um modelo de biofilme *in vitro* do tipo microcosmos para o estudo dos aspectos microbiológicos que envolvem a CVV.

Dos meses de janeiro a outubro de 2018 foram coletadas 51 amostras de pacientes com quadros sugestivos de CVV, onze destas foram positivas para *Candida* spp. ao exame laboratorial (21,56%). A porcentagem de amostras positivas para *Candida* spp. encontradas em nosso estudo corrobora com os achados de Boatto et al. (2016) que isolou 40 amostras positivas (23%) para *Candida* spp. do total 168 amostras avaliadas. A média de idade de 28,6 anos obtida entre as pacientes diagnosticadas com CVV aproxima-se do encontrado no estudo de Brandolt et. al (2018) que obteve uma média de idade de 28,5 anos entre as mulheres com a doença. Contrariamente a esse mesmo estudo, que associou a presença da CVV ao uso de anticoncepcionais em 54,7 % das mulheres, apenas 27,5% das pacientes observadas em nosso estudo relataram fazer uso de anticoncepcionais.

Das 11 cepas avaliadas em nosso estudo, 10 delas eram *C. albicans* (91%) e uma era *C. glabrata* (9%). Esses resultados corroboram com o que foi encontrado por Fornari, et al. (2016), Boatto et al. (2016) e Brandolt et. al (2018), que isolaram a espécie *C. albicans* em até 82,5% das amostras positivas para *Candida* spp. A segunda espécie mais isolada nesses estudos foi *C. glabrata*, variando de 7,5% a 20%. Em nosso trabalho, *C. glabrata* foi isolada em 11% das amostras.

Além dos aspectos clínicos que envolveram as amostras colhidas, também foi observado condições ideais para o estabelecimento do modelo de biofilme em microcosmos como: meio de cultivo, atmosfera gasosa, temperatura e tempo de incubação.

O uso de meios de cultivo que forneçam as condições nutritivas e químicas que mimetizem o ambiente vaginal são de grande relevância para a aproximação ao cenário *in vivo* que é proposto neste trabalho. O meio simulador de fluido vaginal (MSFV), descrito por Tomás e Nader-Macías (2007) foi utilizado por estes autores para avaliar o crescimento de lactobacilos vaginais. A composição desse meio foi baseada nos componentes obtidos do fluido vaginal, que contém água (90 a 95%), sais orgânicos e

inorgânicos, ureia, carboidratos, mucinas, ácidos graxos, albumina, imunoglobulinas e outras macromoléculas, além da presença de glicogênio, que pode ser degradado por bactérias vaginais e/ou células epiteliais (TOMÁS e NADER-MACÍAS, 2007). Em nosso trabalho, o biofilme de *C. albicans* formado a partir do MSFV, evidenciou uma atividade metabólica maior, quando comparado ao VFS, que também simula o ambiente vaginal, no entanto é ausente de glicogênio, mucina, KCl, tween 80 e cisteína. Esse fato pode ser justificado pela presença de outros componentes que fazem parte do fluido vaginal como glicogênio e mucina no MSFV e uma maior concentração de glicose nesse meio.

A atmosfera gasosa também é um fator importante para o desenvolvimento do biofilme microcosmos. Assim, observou-se que a microaerofilia apresentou resultados similares aos obtidos na condição de aerobiose, situação geralmente utilizada nos testes convencionais *in vitro*. Além disso, não se observou crescimento de *Candida* spp. ou outro morfotipo bacteriano na condição de anaerobiose em até 72h de cultivo. Janus e colaboradores (2017) avaliaram a influência de *Candida albicans* em biofilmes microcosmos orais. Nesse estudo, *C. albicans* só proliferou em atmosfera aeróbia (48h) e a presença da levedura no biofilme oral permitiu o crescimento de anaeróbios estritos em condições enriquecidas de oxigênio (JANUS et al., 2017; FOX et al., 2014).

As temperaturas testadas foram de 35 °C e 37 °C. No entanto, à temperatura de 37 °C observou-se evaporação do meio de cultivo, devido ao pequeno volume colocado nos poços (60 µL) para a formação de biofilme. Para assegurar que não houvesse evaporação também na temperatura de 35 °C optou-se por substituir o meio de cultivo a cada 24 horas, fornecendo assim nutrientes e complexidade química ao biofilme microcosmos em níveis constantes em todo o período de análise.

O material colhido na escova ginecológica possui volume pequeno para a quantidade de análises feitas. Por isso, colocou-se a amostra em 4 mL de tampão PBS. Esse volume foi estabelecido baseado no volume de amostra colhido e na quantidade de análises que deveriam ser feitas, sendo viável o uso de apenas 60 µL de inóculo em cada poço. Ainda, não seria possível aumentar o volume de tampão, pois esse fato poderia diluir demasiadamente o inóculo iniciador, distanciando-o do cenário que é encontrado no ambiente vaginal.

Quanto ao tempo de cultivo, optou-se por avaliar o biofilme microcosmos em 48 e 72 horas, período em que o biofilme se encontra no estágio maduro (POLKE, HUBE e JACOBSEN, 2015). Harriot e colaboradores (2010) descrevem o biofilme de *C.*

*albicans* no epitélio vaginal de ratos ao longo de 24 a 72 horas. No tempo de 24h, existem blastoconídios, além de um emaranhado de hifas e presença de matriz extracelular. Essa estrutura é robustecida no período de 48h, com a maior presença de matriz extracelular e hifas. E por fim, as 72h observam-se blastoconídios na parte apical do biofilme, dando indício do início do processo de dispersão (HARRIOT et. al, 2010). Os achados dos autores corroboram com nossa escolha, pois apresentam o biofilme maduro em 72h, com grande desenvolvimento de hifas e blastoconídios.

Para a caracterização do modelo de biofilme microcosmos, foram utilizados alguns parâmetros de análise de biofilmes já estabelecidos na literatura, como unidades formadoras de colônia, atividade metabólica e proteolítica, biomassa, resistência aos antifúngicos e morfologia ultraestrutural (CHANDRA, MUKHERJEE e GHANNOUM, 2008).

O número de unidades formadoras de colônia isoladas nos tempos de cultivo evidenciou uma equivalência na maioria das cepas testadas entre biofilmes microcosmos (BMi) e monoespécie (BMo). Esse fato permite inferir que há uma proliferação celular maior em BMi que em BMo, já que o valor do inóculo inicial foi menor no BMi que no BMo (BMi: aproximadamente  $10^5$  células/mL e BMo:  $10^6$  células/mL). Os dados obtidos demonstram que o ambiente mimetizado no BMi, com a presença da microbiota vaginal, permitiu o crescimento e multiplicação de *Candida* spp. de uma maneira mais acentuada que em BMo cultivado nas mesmas condições.

Contrariamente, nas amostras 561 e 608 foram isolados dos BMi morfotipos bacterianos correspondentes a bacilos Gram<sup>+</sup> juntamente com *Candida albicans*. Observou-se que a presença de bacilos Gram<sup>+</sup> reduz ou inibe a proliferação da *C. albicans* na formação do biofilme, pois os resultados demonstram um menor número de UFC/mL nas amostras, sobretudo em 608, em que se isolou mais UFC/mL em BMo que em BMi. De fato, a presença de bacilos Gram<sup>+</sup> fornece condições necessárias à homeostase do ambiente vaginal, como por exemplo, a inibição competitiva pela adesão às células epiteliais ou mesmo pela produção de substâncias como bacteriocinas e peróxido de hidrogênio, que influenciam para que *Candida* spp. mantenha-se em baixos níveis no trato vaginal (BRADFORD e RAVEL, 2017)

A análise da atividade metabólica entre BMi e BMo mostrou uma equivalência de valores na maioria das amostras. No entanto, a amostra 164 apresentou metabolismo maior em BMi que o seu equivalente em BMo. Esse fato pode ser devido à espécie contida nesse biofilme ser *C. glabrata*, que tem o seu metabolismo alterado em microcosmos,

evidenciando uma maior taxa metabólica. Os estudos de Seneviratne et al. (2009) complementam esses achados porque demonstram que *C. glabrata* em biofilmes possui uma atividade metabólica maior que *C. albicans*. No entanto, ainda não foi descrito na literatura o mecanismo relacionado à essa maior taxa metabólica tanto em biofilmes monoespécie quanto em microcosmos.

Da mesma maneira, há uma atividade metabólica maior em BMo nas amostras 561 e 608, que estão associadas à presença de bacilos Gram<sup>+</sup> nos BMi. Mais uma vez, esse resultado evidencia que a presença de bacilos Gram<sup>+</sup> influenciaram negativamente para a adesão e formação de biofilme de *Candida* em BMi. Muitos estudos confirmam que a presença de bacilos Gram<sup>+</sup> juntamente com espécies de *Candida* spp. dificulta seu crescimento, morfogênese, adesão e a formação de biofilme, principalmente pelo mecanismo de inibição competitiva e por inibirem a expressão de proteínas relacionadas à adesão, como Hwp1 e Als (ALLONSIUS et al., 2017; SANTOS et al., 2016; MURINA et al., 2014).

A quantificação de biomassa evidenciou que os BMi são mais robustos que os BMo, a exceção das amostras 561 e 608. Com efeito, a produção da matriz extracelular em BMi fornece maior proteção às ações externas e dos antifúngicos. A disponibilidade de outros componentes no MSFV também pode favorecer o aumento da biomassa do BMi. A presença de células bacterianas ou debris celulares oriundos de células epiteliais e da própria microbiota podem contribuir para a robustez maior dos BMi. A menor biomassa no BMi de 561 e 608 mostram que os bacilos Gram<sup>+</sup> influenciam na produção de matriz exopolimérica no biofilme, podendo estar relacionado também ao menor número de células presentes nestes biofilmes.

Sabe-se que um dos fenótipos mais importantes na formação de biofilmes é a capacidade de resistir à ação dos antifúngicos, sendo necessário, muitas vezes, concentrações até 1000x mais elevada que a usada em células livres (MARTINS et al., 2012). Essa resistência pode ser atribuída aos componentes da matriz exopolimérica, principalmente  $\beta$ -1,3-glucanos, que se ligam aos antifúngicos azólicos, impedindo de chegarem até às células fúngicas, ou mesmo pela super expressão das bombas de fluxo, que devolvem as moléculas de antifúngico novamente para fora da célula, impedindo que estes atuem em seus alvos (POLKE, HUBE e JACOBSEN, 2015).

O perfil de resistência ao fluconazol em BMi mostrou haver aumento de metabolismo em concentrações intermediárias da droga (64-256  $\mu$ g/mL), fato justificado por condições de estresse em que as células do biofilme podem sofrer, acabando por



demonstrarem maior atividade metabólica. A redução de metabolismo em BMi só ocorreu na concentração mais elevada (512 µg/mL) em duas amostras e permaneceu inalterada, compatível com o controle livre da droga, em outras duas. Já a amostra 561 mostrou maior sensibilidade ao fluconazol, com redução já na concentração de 128 µg/mL. A presença dos bacilos Gram<sup>+</sup> nessa amostra confirma todos os dados discutidos anteriormente, culminando em tornar os biofilmes de *Candida* mais sensíveis a ação dos antifúngicos.

Diferentemente do BMi, os BMo possuem um perfil padrão de reduzirem sua atividade metabólica apenas na concentração de 512 µg/mL. Pesquisas anteriores demonstram o perfil de resistência de biofilmes monoespécie de *Candida* frente ao fluconazol. Corroborando com os achados de nosso estudo, os biofilmes de *C. albicans* são afetados apenas em concentrações maiores que 256 µg/mL (LIU et al., 2014; SARKAR et al., 2012; MUKHERJEE et al., 2003).

A morfologia ultraestrutural evidenciou principalmente que em BMi *Candida* spp. utilizam como substrato principal as células epiteliais presentes na amostra. Em algumas amostras são observados “espaços vazios” onde não existem células epiteliais e *Candida* spp. aderida somente às células epiteliais presentes. Esse fato demonstra que no ambiente microcosmos que foi estabelecido, há uma preferência de adesão de *Candida* à célula epitelial, aderindo-se a ela mais facilmente que na superfície de poliestireno que foi disponibilizada para seu crescimento. O mecanismo de adesão de *Candida* às superfícies epiteliais já é bem descrito, havendo interações de receptores na parede celular da levedura com glicoproteínas na superfície do epitélio. Além disso, genes reguladores da adesão, como *ALS* e *HWPI*, também promovem a formação do biofilme em mucosas (RICHARDSON e NAGLIK, 2018; GANGULY e MITCHELL, 2011).

Os resultados obtidos com esse estudo demonstram que os BMi se diferenciam nos aspectos morfofisiológicos dos BMo, principalmente quanto ao perfil de resistência ao fluconazol e morfologia ultraestrutural. Contudo, estudos mais aprofundados da cinética dos BMi, bem como, os fatores de causa ou consequência dessas diferenças observadas, devem ser pesquisados em estudos posteriores para a compreensão da complexidade dos BMi. Ainda, este é um estudo inicial, que nos incita para outras questões a serem analisadas no âmbito do microcosmos a partir de amostras vaginais. Estudos como este são relevantes na elucidação de vários pontos ainda não esclarecidos na fisiopatologia da CVV.

## 8. CONCLUSÕES

- 1) Amostras vaginais provenientes de pacientes com CVV são viáveis para o estabelecimento de biofilme de *Candida* spp. em modelo microcosmos;
- 2) Os biofilmes microcosmos possuem perfis morfofisiológicos distintos de seus correspondentes biofilmes monoespécie, principalmente nos aspectos da produção de biomassa e número de UFC/mL;
- 3) Biofilmes microcosmos são mais tolerantes ao fluconazol que seus correspondentes biofilmes monoespécie. Mas a presença de bacilos Gram positivos em biofilme microcosmos de *C. albicans* torna os biofilmes com maior sensibilidade ao fluconazol.
- 4) Biofilmes microcosmos possuem micromorfologia com predominância de blastoconídios de *Candida* sp. e adesão preferencial à células epiteliais.

## REFERÊNCIAS

ALLONSIUS, C. N.; VAN DEN BROEK, M. F. L.; DE BOECK, I.; KIEKENS, F.; FOUBERT, K.; VANDENHEUVEL, D.; COS, P.; DELPUTTE, P.; LEBBER, S. Interplay between *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Candida* and the involvement of exopolysaccharides. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p.1753-1763, 2017.

ÁLVARES, C. A.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 5, p. 319-327, 2007.

ALVES, C. T. Effect of progesterone on *Candida albicans* vaginal pathogenicity. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 8, p.1011-1017, 2014.

BOATTO, H. F.; GIRAO, M.J. B. C.; FRANCISCO, E. C.; MACHADO, A. P.; MORAES, M. S.; FISCHMAN, O. Susceptibility to fluconazole and ketoconazole of *Candida spp.* isolated from primary and episodic vulvovaginites by E-Test. **Open Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.6, p.689-697, 2016.

BRADFORD, L. L.; RAVEL, J. The vaginal mycobiome: A contemporary perspective on fungi in women's health and diseases, **Virulence**, v.8, n.3, p.342-351, 2017.

BRANDOLT, T. M.; KLAFKEA, G. B.; GONCALVES, C. V.; BITENCOURTA, L. R.; MARTINEZ, A. M. B.; MENDES, J. F.; MEIRELES, M. C. A.; XAVIER, M. O. Prevalence of *Candida spp.* in cervical-vaginal samples and the in vitro susceptibility of isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p.145-150, 2017.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman - 12.ed. **AMGH**, 2012

CASSONE, A.; CAUDA, R. *Candida* and candidiasis in HIV-infected patients: where commensalism, opportunistic behavior and frank pathogenicity lose their borders **AIDS**, v. 26, p. 1457–1472, 2012.

CASSONE, A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. **BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology**, v. 122, n. 6, p.785-794, 2014.

CAUCHIE, M.; DESMET, S.; LAGROU, K. *Candida* and its dual lifestyle as a commensal and a pathogen. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 9-10, p.802-810, 2017.

CAVALHEIRO, M.; TEIXEIRA, M. C. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. **Frontiers in Medicine**, v. 5, p.1-15, 2018.

CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, A. M. *In vitro* growth and analysis of *Candida* biofilms. **Nature Protocols**, v. 3, n. 12, p.1909-1924, 2008

CHAY, L. Y. A.; DENNING, D. W.; WARN, P. *Candida tropicalis* in human disease. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 282-298, 2010.

*Clinical Laboratory National Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts.* Approved standard M27-A3. CLSI, Wayne, Pennsylvania, 2008.

COENYE, T.; NELIS, H.J. *In vitro* and *in vivo* model systems to study microbial biofilm formation. **Journal Microbiology Methods** v.83, p. 89–105, 2010.

COLLINS, T. J. ImageJ for microscopy. **Biotechniques**, v.43, p. 25-30, 2007.

CORDEIRO, R. A.; SERPA, R.; ALEXANDRE, C. F. U.; MARQUES, F. J. F.; MELO, C. V. S.; FRANCO, J. S.; EVANGELISTA, S. J. J.; CAMARGO, Z. P.; BRILHANTE, R. S. N.; ROCHA, M. F. G.; MOREIRA, J. L.B.; BANDEIRA, T. J. P.G.; SIDRIM, J. J. C. *Trichosporon inkin* biofilms produce extracellular proteases and exhibit resistance to antifungals. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 11, p.1277-1286, 2015.

CORDEIRO, R. A.; EVANGELISTA, A. J. J.; SERPA, R.; ANDRADE, A. R. C.; MENDES, P. B. L.; FRANCO, J. S.; OLIVEIRA, J. S.; ALENCAR, L. P.; SALES, J. A.; CAMARA, L. C.; CASTELO-BRANCO, D. S. C.; BRILHANTE, R. S. N.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G.  $\beta$ -lactam antibiotics & vancomycin increase the growth & virulence of *Candida spp.* **Future Microbiology**, v. 13, n. 8, p.869-875, 2018.

DENNING, D.W.; KNEALE, M.; SOBEL, J. D.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R. Global burden of recurrent vulvovaginal candidiasis: a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p.1-9, 2018.

ENE, I.V. CHENG, S.C.; NETEA, M. G.; BROWN, A. J. P. Growth of *Candida albicans* cells on the physiologically relevant carbon source lactate affects their recognition and phagocytosis by immune cells. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 1, p.238-248, 2012.

FAROOGI, J.; JABEEN, K.; SAEED, N.; ZAFAR, A.; BRANDT, M. E.; HASAN, R. Species identification of invasive yeasts including *Candida* in Pakistan: limitations of phenotypic methods. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v. 62, n.10, p.995-998, 2012

FORNARI, G. V. A.; GOMESA, R. R.; MURO, M. D.; PINHEIRO, R. L.; FERRARI, C.; HERKERTA, P.F.; TAKIMURA, M.; CARVALHO, N. S.; QUEIROZ-TELLES, F. Susceptibility and molecular characterization of *Candida* species from patients with vulvovaginitis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p.373-380, 2016.

GANGULY, S. E.; MITCHELL, A.P. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. **Current Opinion Microbiology**. v.14, n.4, p. 380–385, 2011.

GODHA, K. Human vaginal pH and microbiota: an update. **Gynecological Endocrinology**, v. 34, n. 6, p.451-455, 2017.

GONÇALVES, B., FERREIRA, C., ALVES, C. T., HENRIQUES, M., AZEREDO J., SILVA, S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors, **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 905-927, 2016.

HALL, A. R. Adapting to change: interactions of *Candida albicans* with its environment. **Future Microbiology**, v. 12, n. 11, p.931-934, set. 2017.

HARRIOTT, M.M.; LILLY, E.A.; RODRIGUEZ, T.E.; FIDEL, P.L., JR.; NOVERR, M.C. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. **Microbiology** v.156, p. 3635–3644, 2010.

HARRIOTT, M.M.; NOVERR, M.C. Importance of *Candida*-bacterial polymicrobial biofilms in disease. **Trends Microbiology**. v. 19, n. 11, p. 557–563, 2011.

HUANG, G. Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. **Virulence**, v. 3, n. 3, p.251-261, 2012.

JANUS, M. M., Crielaard, W., Volgenant, C. M. C., van der Veen, M. H., Brandt B. W. Krom, B. P. *Candida albicans* alters the bacterial microbiome of early *in vitro* oral Biofilms. **Journal of Oral Microbiology**, v. 9, n. 1, 2017.

KABIR, M. A.; HUSSAIN, M. A.; AHMAD, Z. *Candida albicans*: a model organism for studying fungal pathogens. **ISRN Microbiology**, v. 2012, p.1-15, 2012.

KIM, Y.S.; KANG, S.M.; LEE, E.S.; LEE, J.H.; KIM, B.R.; KIM, B.I. Ecological changes in oral microcosm biofilm during maturation **Journal of Biomedical Optics** v.21, n.10, 2016.

KOOPMAN, J.E.; RÖLING, W.F.M.; BUIJS, M.J.; SISSONS, C.H.; CATE, J.T.; KEIJSER, B.J.F.; CRIELAARD, W.; ZAURA, E. Stability and resilience of oral microcosms toward acidification and *Candida* outgrowth by arginine supplementation **Microbial Ecology** v, 69, p. 422–433, 2015.

LEBEAUX, D.; CHAUHAN, A.; RENDUELES, O.; BELOIN, C. From *in vitro* to *in vivo* models of bacterial biofilm-related infections. *Pathogens*, v.2, n.2, p. 288-356, 2013.

LEVY, M.; KOLODZIEJCZYK, A. A.; TAHISS C. A.; ELINAY, E. Dysbiosis and the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 4, p. 219-232, 2017

LIMA-NETO, R.; CLEDIR, S.C.; LIMA, N.; SAMPAIO, P.; PAÍS, C.; NEVES, R.P. Aplicação de MALDI-TOF MS para requalificação de uma coleção de cultura de isolados clínicos de *Candida*. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v. 45, n. 2, p. 515-522, 2014.

LINHARES, M. I.; GIRALDO, P. C.; BARACAT, E.C. Novos conhecimentos sobre a flora bacteriana vaginal. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n.3, p. 370-374, 2010.

LIU, S.; YINGLONG, H.; CHEN, X.; GAO, Y.; LI, H.; SUN, S. Combination of fluconazole with non-antifungal agents: A promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 5, p. 395-402, 2014.

MAJUMDAR, T.; MULLICK, J. B.; BIR, R.; ROY, J.; SIL, S.K. Determination of virulence factors and biofilm formation among isolates of vulvovaginal candidiasis. **Journal of Medical Sciences**, v. 36, n. 2, p.53-58, 2016.

MARTINS, M.; UPPULURI, P.; THOMAS, D.P.; CLEARY, I.A.; HENRIQUES, M.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; OLIVEIRA, R. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* biofilm matrix and its contribution to biofilms. **Mycopathologia**. v. 169, n.5, p. 323-31, 2010.

MARTINS. M.; HENRIQUES, M.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; OLIVEIRA, R. Addition of DNase improves the in vitro activity of antifungal drugs against *Candida albicans* biofilms. **Mycoses**. v. 55, n.1, p.80-85, 2012.

MARTINEZ, L. R.; CASADEVALL, A. Susceptibility of *Cryptococcus neoformans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 1021–1033, 2006.

MAYER, F.L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence** v.4, n.2, p.119–128, 2013.

MEDEIROS, M. A.P.; MELO, V.; SOUSA, A.M. M.; SILVA-ROCHA, W. P.; MILAN, E. P.; CHAVES, G. M. Characterization of virulence factors of vaginal and anal isolates of *Candida albicans* sequentially obtained from patients with vulvovaginal candidiasis in north-east Brazil. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 27, n. 4, p.567-572, 2017.

MENDLING, W. Vaginal Microbiota. In: SCHWIERTZ, A. **Microbiota of the Human Body: Implications in Health and Disease**. Herborn: Springer, p. 83-90, 2016.

MERSEGUEL, K. B.; NISHIKAKU, A. S.; RODRIGUES, A. M.; PADOVAN, A. C.; FERREIRA, R. C.; AZEVEDO, M. A. S.; BRIONES, M. R.; COLOMBO, A. L. Genetic diversity of medically important and emerging *Candida* species causing invasive infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 57, p. 1-11, 2015.

MIRAMÓN, P.; LORENZ, M.C. A feast for *Candida*: Metabolic plasticity confers an edge for virulence. **PLoS Pathogens**, v. 13, n2, p.1006-1014, 2017.

MOSTAJO, M. F.; EXTERKATE, R. A. M.; BUIJS, M. J.; BEERTSEN, W.; WEIJDEN, G. A.; ZAURA, E.; CRILAARD, W. A reproducible microcosm biofilm model of subgingival microbial communities. **Journal of Periodontal Research**, v. 52, n. 6, p.1021-1031, 2017.

MTIBAA, L.; FAKHFAKH, N.; KALLEL, A.; BELHADJ, S.; BELHAJ, N. S.; BADA, N.; KALLEL, K. Vulvovaginal candidiasis: etiology, symptomatology and risk factors. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 27, n. 2, p.153-158, jun. 2017.

MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; GHANNOUM, N. A. Mechanism of Fluconazole Resistance in *Candida albicans* Biofilms: Phase-Specific Role of Efflux Pumps and Membrane Sterols. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4333–4340, 2003.

MURINA, F.; GRAZIOTTIN, A.; VICARIOTTO, F.; DE SETA, F.; Can *Lactobacillus fermentum* LF10 and *Lactobacillus acidophilus* LA02 in a slow-release vaginal product be useful for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis? A Clinical Study. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 48, n. 1, p. 102-105, 2014.

ODDS, FRANK C. *Candida* and candidosis: a review and bibliography. **Bailliere Tindall**, 1988.

OWEN, D. H.; KATZ, D. F. **Contraception** v. 59, p. 91-95, 1999.

PAPPAS, P.G. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, p.1-50, v.62, n.4, p.1-50, 2015.

PEETERS, E.; NELIS, H.J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiology Methods**, v. 72, n. 2, p. 157–165, 2008.

PEMMARAJU, S.; PARUL, C.; PRUTHI, A.; PRASAD, R.; PRUTHI, V. Modulation of *Candida albicans* biofilm by different carbon sources. **Mycopathologia**, v. 181, n. 5-6, p.341-352, 2016.

POLKE, M.; HUBE, B.; JACOBSEN, I. D. *Candida* survival strategies. **Advanced Applied Microbiology**, v. 91, p. 139-235, 2015.

RAVEL, J.; GAJER, P.; ABDO, Z.; SCHNEIDER, G. M.; KOENIG, S. S.; MCCULLE, S. L.; KARLEBACH, S.; GORLE, R.; RUSSELL, J.; TACKET, C. O.; BROTMAN, R. M.; DAVIS, C. C.; AULT, K.; PERALTA, L.; FORNEY, L. J. Vaginal microbiome of reproductive-age women. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 1, p. 4680-4687, 2011.

RICHARDSON, J. P.; NAGLIK, J.H.; JULIAN, R. *Candida*–Epithelial Interactions. **Journal of Fungi**, v. 4, n. 1, p.22-36, 2018.

ROCHA, M.F.G.; BANDEIRA, S.P.; ALENCAR, L.P.; MELO GUEDES, G.M.; CASTELO-BRANCO, D. Combination of phenotypic tests as a screening approach for the differentiation of cryptic species *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. **Medical Mycology Open Access**, v.3, n.2, p. 24-27, 2017.

SANTOS, C. M.; PIRES, M. C. V.; LEÃO, T. L.; HERNÁNDEZ, Z. P.; RODRIGUEZ, N. L.; MARTINS, A. K. S.; MIRANDA, L. S.; MARTINS, F. S.; NICOLI, J. Selection of *Lactobacillus* strains as potential probiotics for vaginitis treatment. **Microbiology**, v. 162, n. 7, p.1195-1207, 2016.

SARKAR, S.; UPPULURI, P.; PIERCE, C.G.; LOPEZ-RIBOT, J. L. *In vitro* study of sequential fluconazole and caspofungin treatment against *Candida albicans* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 1183–1186, 2014.

SCHULZE, J.; SONNENBORN, U. Yeasts in the gut: from commensals to infectious agents, **Deutsches Arzteblatt International**, v. 106, n. 51, p. 837-842, 2009.

SENEVIRATNE, C. J.; SILVA, W.J.; JIN, L.J.; SAMARANAYAKE, Y.H.; SAMARANAYAKE, L.P. Architectural analysis, viability assessment and growth kinetics of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. **Archives of Oral Biology**, v. 54, n. 11, p. 1052–1060, 2009

SHERRINGTON, S.L., SORSBY, E.; MAHTEY, N.; KUMWENDA, P.; LENARDON, M.D.; BROWN, I. Adaptation of *Candida albicans* to environmental pH induces cell wall remodelling and enhances innate immune recognition. **PLoS Pathogens**, v. 13, n.5 p. 1-28, 2017.

SHERRY, L.; KEAN, R.; MCKLOUD, E.; O'DONNELL, E. L.; METCALFE, R.; JONES, B. L.; RAMAGE, G. Biofilms Formed by Isolates from Recurrent vulvovaginal candidiasis patients are heterogeneous and insensitive to fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 9, p.1-14, 2017

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**, 2004. 288 pgs.

SOBEL, J.D. Genital candidiasis. **Medicine**, v. 42, n. 7, p.364-368, 2014.

SOBEL, J. D., SOBEL, R. Current treatment options for vulvovaginal candidiasis caused by azole-resistant *Candida* species, **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 19, n. 9, p. 971-977, 2018.

STEPANOVIC S.; VUKOVIC, D.; HOLA, V.; BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; IRKOVIC, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v.115, p. 891-899, 2007.

SUN, Y.; CAO, C.; JIA, W.; TAO, L.; GUAN, G.; HUANG, G. pH regulates white-opaque switching and sexual mating in *Candida albicans*. **Eukaryotic Cell**, v. 14, n. 11, p.1127-1134, 2015.

THOMPSON, D. S.; CARLISLE, P. L.; KADOSH, D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 9, p. 1173-1182, 2011.

TOBUDIC, S.; LASSNIGG, A.; KRATZER, C.; GRANINGER, W.; PRESTERL, E. Antifungal activity of amphotericin B, caspofungin and posaconazole on *Candida albicans* biofilms in intermediate and mature development phases. **Mycoses**. v.53, n.3, p.208-214, 2010.

TOMÁS, M.S.; NADER-MACÍAS, M.E. Effect of a medium simulating vaginal fluid on the growth and expression of beneficial characteristics of potentially probiotic lactobacilli. In: Méndez-Vilas A, editor. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**. Badajoz, Spain: Formatex. p. 732–739, 2007.



UNDERHILL, D. M.; ILIEV, I. D. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 6, p.405-416, 2014.

WIJGERT, J. H. H. M. The Vaginal Microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization?. **Plos One**, v. 9, n. 8, p.1-10, 2014.

WIJGERT, J. H. H. M.; JESPERS, V. The global health impact of vaginal dysbiosis. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 9-10, p.859-864, 2017.

WILLIAMS, D.W.; JORDAN, R.P.C.; WEI, X.Q.; ALVES, C.T.; WISE, M.P.; WILSON, M.J.; LEWIS, M.A.O. Interactions of *Candida albicans* with host epithelial surfaces. **Journal of Oral Microbiology**, v.5, p. 224-234, 2013.

## APÊNDICES

### APÊNDICE – A

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidada pela Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro como participante da pesquisa intitulada “Desenvolvimento de um modelo de biofilme microcosmos para estudo da candidíase vulvovaginal”. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.

A sua participação envolve o fornecimento de uma única amostra de secreção vaginal que será coletada pelo seu médico ginecologista, durante consulta em ambulatório. O médico utilizará um dispositivo semelhante a um cotonete de algodão chamado “swab”, que será introduzido cuidadosamente na cavidade vaginal. O dispositivo será girado delicadamente para absorver a secreção vaginal e em seguida removido para análises no laboratório. Informo que este procedimento já é empregado de forma rotineira pelo seu médico como parte da consulta ginecológica, quando se suspeita que a paciente tenha alguma infecção. O objetivo desta pesquisa é conhecer os germes que podem estar causando a sua doença. Informo que não haverá pagamentos, entrega de brindes ou vantagens financeiras para nenhuma participante desta pesquisa.

Riscos da pesquisa: Embora seja um procedimento comum nos ambulatórios de ginecologia, você poderá sentir-se constrangida durante o exame. Há também a possibilidade de que você sinta ardência local no momento da coleta. No entanto, este desconforto é passageiro e dura apenas alguns minutos.

Benefícios da pesquisa: a sua participação poderá contribuir para a geração de dados que, no futuro, auxiliarão os médicos na descoberta de novas formas de tratar a candidíase vulvovaginal.

Sua privacidade será respeitada ao longo desta pesquisa. Você pode se recusar a participar do estudo, ou retirar seu consentimento a qualquer momento, sem justificativa e sem prejuízo ao seu atendimento.

As informações conseguidas por meio da sua participação não permitirão a identificação da sua pessoa, exceto aos responsáveis pela pesquisa, e a divulgação das informações mencionadas só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto.

Endereço do responsável pela pesquisa:

Nome: Rossana de Aguiar Cordeiro

Instituição: Universidade Federal do Ceará – Faculdade de Medicina – Departamento de Patologia e Medicina Legal

Endereço: Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Bloco da Biomedicina, Laboratório de Micologia. Rua Coronel Nunes de Melo, 1315, Bairro: Rodolfo Teófilo, Fortaleza-Ceará, CP: 60.430-270

Telefones para contato: (85) 3366-8594 / 988779291

ATENÇÃO: Se você tiver alguma consideração ou dúvida, sobre a sua participação na pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ. Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, fone: 3366-8344/46. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira). O CEP/UFC/PROPESQ é a instância da Universidade Federal do Ceará responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

O abaixo assinado \_\_\_\_\_, \_\_\_\_ anos, RG: \_\_\_\_\_, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante de uma pesquisa.

Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Fortaleza, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Nome da participante da pesquisa: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura da participante: \_\_\_\_\_

Nome do pesquisador: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador: \_\_\_\_\_

Nome da testemunha: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura (se o voluntário não souber ler): \_\_\_\_\_

Nome do profissional que aplicou o TCLE: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Assinatura do profissional que aplicou o TCLE: \_\_\_\_\_

**APÊNDICE – B****Questionário aplicado no ato da assinatura do TCLE****Toma anticoncepcional?**

( ) SIM ( ) NÃO

**Última vez que tomou algum antibiótico:**

( ) há pelo menos 1 ano ( ) há pelo menos 3 meses ( ) não lembra

**Correlaciona o aparecimento dos sintomas à proximidade com a menstruação?**

( ) SIM ( ) NÃO

**Possui Filhos?**

( ) SIM ( ) NÃO.

Se sim, quantos? \_\_\_\_\_

**Quais os sintomas que relata?**

( ) COCEIRA

( ) CORRIMENTO. Qual aspecto? \_\_\_\_\_

( ) DOR AO URINAR OU INCOMODO NO ATO SEXUAL

( ) Outro: \_\_\_\_\_

**Possui alguma doença de base?**

( ) SIM ( ) NÃO.

Se sim, qual? \_\_\_\_\_

## ANEXOS

## ANEXO – A

## Composição dos meios de cultivos

<i>Vaginal Fluid Simulant (VFS)</i> Owen and Katz, 1999	<i>Medium Simulant Vaginal Fluid (MSFV)</i> adaptado de Tomás e Nader-Macías, 2007
pH4,2	pH4,5
Glicose 5g. L <sup>-1</sup>	Glicose 10g. L <sup>-1</sup>
Glicerol 0,16g. L <sup>-1</sup>	Ácido láctico 2g. L <sup>-1</sup>
Ácido Láctico 2g. L <sup>-1</sup>	Ácido acético 1g. L <sup>-1</sup>
Ácido acético 1g. L <sup>-1</sup>	Nacl 3,5g. L <sup>-1</sup>
Nacl 3,51g. L <sup>-1</sup>	Kcl 1,5g. L <sup>-1</sup>
KOH 1,4g. L <sup>-1</sup>	Cisteína 0,5g. L <sup>-1</sup>
Ca(OH) <sub>2</sub> 0,22g. L <sup>-1</sup>	Tween 80 1,064g. L <sup>-1</sup>
Ureia 0,4g. L <sup>-1</sup>	Glicogênio: redução de 10g. L <sup>-1</sup> para 5g. L <sup>-1</sup>
Albumina 0,018g. L <sup>-1</sup>	Mucina 0,25g. L <sup>-1</sup>
	Ureia 0,5g. L <sup>-1</sup>
	Albumina 2g. L <sup>-1</sup>

## ANEXO – B

**Submissão do artigo intitulado:** *Candida* spp. from patients with vulvovaginal candidiasis produce antifungal tolerant biofilms.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz



***Candida* spp. from patients with vulvovaginal candidiasis  
produce antifungal tolerant biofilms**

Journal:	Memórias do Instituto Oswaldo Cruz
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Cordeiro, Rossana; Universidade Federal do Ceara, Andrade, Ana Raquel Portela, Fernando Victor Pereira, Livia Maria Moura, Santiago Oliveira, Jonathas Sales, Gyrilane Pergentino, Marlana Mendes, Patricia Guedes, Glaucia Brilhante, Raimunda; ufc, Castelo-Branco, Debora Sidrim, José Julio Rocha, Marcos
Keyword:	vulvovaginal candidiasis, antifungal susceptibility, biofilms, resistance
Theme:	Microbiology, Infectious Disease

SCHOLARONE™  
Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/mioc-scielo>