



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

**ANA RAQUEL COLARES DE ANDRADE**

**EFEITO DOS HORMÔNIOS PROGESTERONA E B-ESTRADIOL EM MODELOS  
DE BIOFILME MICROCOSMOS E MONOESPÉCIE DE *Candida* spp. DERIVADOS  
DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

**FORTALEZA**

**2023**

**ANA RAQUEL COLARES DE ANDRADE**

**EFEITO DOS HORMÔNIOS PROGESTERONA E B-ESTRADIOL EM MODELOS  
DE BIOFILME MICROCOSMOS E MONOESPÉCIE DE *Candida* spp. DERIVADOS  
DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências Médicas. Área de concentração: Medicina 1.

Orientador: Prof. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro.

**FORTALEZA**

**2023**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas

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

---

A565e Andrade, Ana Raquel Colares de Andrade.  
Efeito dos hormônios progesterona e beta-estradiol em modelos de biofilme microcosmos e monoespécie de *Candida* spp. derivados de candidíase vulvovaginal / Ana Raquel Colares de Andrade Andrade. – 2023.  
110 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Rossana de Aguiar Cordeiro.

1. *Candida albicans*; vulvovaginite; hormônios esteroides; biofilme.. I. Título.

CDD 610

---

**ANA RAQUEL COLARES DE ANDRADE**

**EFEITO DOS HORMÔNIOS PROGESTERONA E B-ESTRADIOL EM MODELOS DE BIOFILME MICROCOSMOS E MONOESPÉCIE DE *Candida spp.* DERIVADOS DE CANDIDÍASE VULVOVAGINAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de doutor em Ciências Médicas. Área de concentração: Medicina 1.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle  
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

---

Prof. Dra. Rhanna Emanuela Fontenelle Lima de Carvalho  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dra. Thereza Maria Magalhães Moreira  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---

Prof. Dra. Julliana Ribeiro Alves dos Santos  
Universidade CEUMA (UNICEUMA)

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que é a minha alegria, minha força, meu sustento, meu amparo e minha esperança. Bendito seja Deus para sempre!

À minha família: meus pais, João Andrade e Maria Colares, que não medem esforços e se dedicam por inteiro para educar, formar e amar aqueles a quem Deus lhes confiou; e meus irmãos, João Paulo e Ana Paula, pelo apoio e suporte em todos os momentos.

Ao meu esposo, Natan Pinheiro, pela dedicação, amor, paciência, companheirismo, compreensão e apoio em todos os momentos; e ao meu filho Joaquim, é por você e para você que busco, a cada dia, ser uma pessoa melhor.

À esta universidade, direção e administração que proporciona infinitas oportunidades de crescimento profissional e humano. Corpo docente do PPGCM, pela oportunidade de aprender e crescer com seus ensinamentos. À minha orientadora, professora Rossana Cordeiro, obrigada pela sua orientação, por sua confiança em mim, pelo seu compromisso, suporte e incentivo.

Aos amigos Lívia Galdino e Fernando Monteiro, que são meu apoio em tudo e para tudo. Obrigada pelo auxílio e a companhia de vocês, que tornaram essa jornada mais leve e divertida. Aos demais colegas do laboratório, pelas contribuições na execução dos trabalhos.

À Mônica Sampaio Rezende pelo enorme auxílio na prospecção e colheita das amostras. À todas as voluntárias que se dispuseram em participar desta pesquisa, doando suas amostras para análise.

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

Aos professores que compuseram as bancas de qualificação e defesa, pelas contribuições na melhoria deste trabalho.

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.

Ser filha, mãe e esposa, desses títulos eu me orgulho mais.

“Aliás, sabemos que todas as coisas concorrem para o bem daqueles que amam a Deus. Que diremos depois disso? Se Deus é por nós, quem será contra nós? Em todas as coisas, somos mais que vencedores pela virtude daquele que nos amou.”

*Romanos, 8 – 28.31.37*

## RESUMO

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma doença do trato reprodutor feminino inferior causada por *Candida* spp., e acomete até 75% das mulheres em idade reprodutiva ao menos uma vez na vida. Por ser uma doença multifatorial, diversos elementos interferem no seu curso, desde fatores inerentes ao hospedeiro, como os níveis dos hormônios sexuais femininos; e relacionados ao patógeno, como a expressão de fatores de virulência e a capacidade de formação de biofilmes. Assim, o presente estudo objetivou avaliar o efeito de progesterona e  $\beta$ -estradiol sobre biofilmes de *Candida* spp. formados em modelo microcosmo (BMi) e monoespécie (BMo), cultivados em meio simulador de fluido vaginal (MSFV) e RPMI 1640, bem como na sensibilidade de células planctônicas e biofilmes de *C. albicans* cultivados em MSFV e RPMI 1640. Para tanto, 11 amostras/cepas oriundas de pacientes com CVV foram empregadas em testes que avaliaram os BMi, BMo - MSFV e BMo - RPMI, suplementados de hormônios esteroides (HE) quanto à produção de células viáveis, biomassa e células persistentes. As análises foram realizadas pelo número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) e quantificação de biomassa por Cristal Violeta. Adicionalmente, 25 cepas de *C. albicans*, provenientes de CVV e isoladas anteriormente a este estudo, foram testadas quanto à sensibilidade frente a oito antifúngicos, em MSFV e RPMI 1640. Também foram avaliados os efeitos dos HE sobre a sensibilidade planctônica e biofilmes de quatro isolados de *C. albicans* frente ao FLC e CLO por meio de UFC/mL e quantificação de biomassa. Observou-se que, em BMi, a presença dos HE influenciou na redução de UFC/mL, aumentou a biomassa e estimulou a formação de CP. Em BMo -MSFV os HE aumentaram o número de UFC/mL, a quantificação de biomassa e não influenciaram na produção de CP. Já em BMo - RPMI, os HE não influenciaram na produção de UFC/mL, mas reduziram a quantificação e biomassa e produção de CP. O cultivo de células planctônicas em MSFV promoveu a redução na sensibilidade de *C. albicans* em cinco dos oitos antifúngicos testados. Os HE não influenciaram na sensibilidade de células planctônicas de *C. albicans* frente aos fluconazol e clotrimazol. Os BMo - MSFV de *C. albicans* mostraram-se irresponsivos ao tratamento com FLC e CLO no número de UFC/mL, porém sua biomassa foi reduzida em até 71%. Já BMo - RPMI de *C. albicans* reduziram o número de UFC/mL e biomassa em até 75% e 73%, respectivamente. Em BMo - MSFV, a presença de HE não reduziu o número de UFC/mL, mas reduziu a quantificação de biomassa até 55% mais. Em BMo - RPMI, os HE reduziram o UFC/mL até 20% a mais e até 15% a mais a quantificação de biomassa. Por fim, os dados

mostraram que, em concentrações próximas aos picos fisiológicos do ciclo menstrual, os HE foram capazes de influenciar na dinâmica e desenvolvimento de biofilmes de *Candida* spp., a depender do modelo de estudo empregado e da cepa utilizada. Bem como, a utilização de meio de cultivo que mimetiza o ambiente vaginal permitiu que isolados de *C. albicans* apresentassem sensibilidade reduzida frente aos principais antifúngicos utilizados para o tratamento da CVV. Esses achados impactam no conhecimento sobre os aspectos microbiológicos e fisiopatológicos da CVV e podem elucidar, mesmo que inicialmente, características atreladas ao aumento das falhas terapêuticas e recidivas da doença.

**Palavras-chave:** *Candida albicans*; vulvovaginite; hormônios esteroides; biofilme.



## ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is a disease of the lower female reproductive tract caused by *Candida* spp. and affects up to 75% of women of reproductive age at least once in their lifetime. As a multifactorial disease, several elements affect in this course, factors inherent to the host, such as female sex hormone levels; and assigned to the pathogen, like the expression of virulence factors and the ability to form biofilms. Therefore, the present study aimed to evaluate the effect of progesterone and  $\beta$ -estradiol on biofilms of *Candida* spp. in microcosm (MiB) and monospecie (MoB) models, cultivated in Vaginal Fluid Simulating Medium (VFSM) and RPMI 1640, as well the effect of progesterone and  $\beta$ -estradiol in susceptibility of planktonic cells and biofilms of *C. albicans* cultivated in MSFV and RPMI 1640. Thus, eleven samples/specimens from VVC were applied in tests that evaluated MiB, MoB - VFSM and MoB - RPMI, supplemented with steroid hormones (SH) regarding the production of viable cells, biomass and persistent cells. (PC). Analyses were performed by number of colony forming units (UFC/mL) and biomass. Additionally, 25 previously isolated strains of *C. albicans* from CVV were tested for their susceptibility against eight antifungal agents, in VFSM and RPMI 1640 media. The effects of SH on planktonic cells and biofilms susceptibility for four *C. albicans* isolates against FLC and CLO was evaluated for CFU/mL and quantification of biomass. It was observed that, in BMi, the presence of SH influenced the reduction of CFU/mL, increased the biomass and stimulated the formation of PC. In BMo - MSFV, SH increased the number of CFU/mL, the quantification of biomass and did not influence the PC production. In BMo - RPMI, HE did not influence the production of CFU/mL, but reduced the quantification of biomass and PC production. The cultivation of planktonic cells in MSFV reduced the susceptibility of *C. albicans* to five of the eight antifungals tested. HE did not influence the susceptibility of planktonic cells of *C. albicans* against fluconazole and clotrimazole. BMo – MSFV from *C. albicans* were unresponsive to treatment with FLC and CLO in the number of CFU/mL, but their biomass was reduced by up to 71%. BMo - RPMI of *C. albicans* reduced the number of CFU/mL and biomass up to 75% and 73%, respectively. In BMo – MSFV, the presence of HE did not reduce the number of CFU/mL, but reduced the quantification of biomass up to 55% more. In BMo – RPMI, HE reduced the CFU/mL up to 20% more and up to 15% more in the biomass quantification. Finally, the data showed that, at concentrations close to the physiological peaks of the menstrual cycle, HE were able to influence the dynamics and development of *Candida* spp. biofilms, depending on the study model employed and the strain used. In addition, the use of a

culture medium that mimics the vaginal environment allowed *C. albicans* isolates to present reduced sensitivity to the main antifungal agents used for the treatment of VVC. These findings have an impact on knowledge about the microbiological and pathophysiological aspects of VVC and can elucidate, even if initially, characteristics linked to the increase in therapeutic failures and disease relapses.

**Keywords:** *Candida albicans*; vulvovaginitis; steroids hormones; biofilm.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	A CVV como uma doença multifatorial.....	22
Figura 2 –	Irritação vulvar e leucorreia característica de CVV.....	27
Figura 3 –	Visualização de esfregaço de amostra vaginal de pacientes com quadro característico de CVV corado pelo método de coloração de Gram.....	28
Figura 4 –	Prevalência de CVV no Brasil por região demográfica.....	31
Figura 5 –	Ciclo menstrual normal.....	33
Figura 6 –	Sítios de colonização de <i>Candida</i> spp. no corpo humano e principais sítios de acometimento de doenças oportunistas causadas por espécies de <i>Candida</i> .....	37
Figura 7 –	Morfotipos encontrados no gênero <i>Candida</i> . Pseudo-hifas, blastoconídeos e hifas verdadeiras.....	38
Figura 8 –	Colônias de <i>Candida albicans</i> em Ágar Sabouraud Dextrose.....	38
Figura 9 –	Adesão, invasão ao epitélio e penetração nos tecidos por <i>Candida</i> .....	43
Figura 10 –	Microscopia eletrônica de varredura de biofilmes de <i>Candida</i> spp.....	44
Figura 11 –	Etapas de desenvolvimento dos biofilmes microbianos.....	46
Figura 12 –	Mecanismos de tolerância dos biofilmes microbianos.....	48
Figura 13 –	Fluxograma do processamento e destinação das amostras colhidas para o estudo.....	54
Figura 14 –	Desenho experimental do estudo do modelo de biofilme em microcosmos e monoespécie de <i>Candida</i> spp. isoladas a partir de conteúdo vaginal de pacientes com CVV.....	55
Figura 15 –	Esfregaços provenientes de amostras clínicas de pacientes com CVV visualizadas em lâmina corada pelo método de coloração de Gram.....	64
Figura 16 –	Crescimento de <i>C. albicans</i> em meio cromogênico <i>Chromagar Candida</i> .....	65
Figura 17 –	Desenvolvimento dos biofilmes de <i>Candida</i> spp. em microcosmos (BMi) e monoespécie (BMo – MSFV e BMO – RPMI 1640) ao longo dos tempos de 24 h, 48 h e 72 h.....	68
Figura 18 –	Efeito da adição de hormônios esteroides Progesterona [P2, 7.5 µg/L] e β-estradiol [E4,700 ng/L] na produção de células viáveis e biomassa ao longo do desenvolvimento de biofilmes de <i>Candida</i> spp. em BMi..	70
Figura 19 –	Efeito da adição de hormônios esteroides Progesterona [P2, 7.5 µg/L] e	72

	$\beta$ -estradiol [E4,700 ng/L] na produção de células viáveis e biomassa ao longo do desenvolvimento de biofilmes de <i>Candida</i> spp. em BMo – MSFV.....	
Figura 20 –	Efeito da adição de hormônios esteroides Progesterona [P2, 7.5 $\mu$ g/L] e $\beta$ -estradiol [E4,700 ng/L] na produção de células viáveis e biomassa ao longo do desenvolvimento de biofilmes de <i>Candida</i> spp. em BMo – RPMI .....	74
Figura 21 –	Recuperação de células persistentes a partir de biofilmes maduros de <i>Candida</i> spp. em microcosmos (BMi) e monoespécie (BMo – MSFV e BMo -RPMI 1640).....	76
Figura 22 –	Porcentagem de recuperação de células persistentes (%) a partir de biofilmes maduros de <i>Candida</i> spp. em microcosmos (BMi) e monoespécie (BMo – MSFV e BMo - RPMI 1640).....	77
Figura 23 –	Recuperação de células persistentes a partir de biofilmes maduros de <i>Candida</i> spp. em microcosmos BMi suplementados com progesterona e $\beta$ -estradiol.....	79
Figura 24 –	Recuperação de células persistentes a partir de biofilmes maduros de <i>Candida</i> spp. em BMo cultivados em MSFV suplementados com progesterona e $\beta$ -estradiol.....	80
Figura 25 –	Recuperação de células persistentes a partir de biofilmes maduros de <i>Candida</i> spp. em BMo cultivados em RPMI 1640 suplementados com progesterona e $\beta$ -estradiol.....	81
Figura 26 -	Comparação entre as CIMs obtidas pela leitura visual em MSFV e a recuperação de células (UFC/mL) nas concentrações testadas de anfotericina B e fluconazol em três isolados de <i>C. albicans</i> oriundas de pacientes com CVV.....	85
Figura 27 –	Sensibilidade de biofilmes monoespécie de <i>C. albicans</i> (BMo) cultivados em MSFV e RPMI 1640 frente ao fluconazol [256 $\mu$ g/mL] e clotrimazol [12,5 $\mu$ g/mL].....	87
Figura 28 –	Sensibilidade de biofilmes monoespécie de <i>C. albicans</i> (BMo) cultivados em MSFV e suplementados com progesterona e $\beta$ -estradiol frente ao fluconazol [256 $\mu$ g/mL] e clotrimazol [12,5 $\mu$ g/mL].....	89
Figura 29 –	Sensibilidade de biofilmes monoespécie de <i>C. albicans</i> (BMo)	90

cultivados em RPMI 1640 e suplementados com progesterona e  $\beta$ -estradiol frente ao fluconazol [256  $\mu\text{g/mL}$ ] e clotrimazol [12,5  $\mu\text{g/mL}$ ].

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Identificação proteômica das cepas a partir das amostras colhidas de pacientes com CVV e contagem do número de células fúngicas em cada amostra (cfu/ $\mu$ L).....	66
Tabela 2 –	Sensibilidade planctônica de <i>C. albicans</i> oriundas de pacientes com CVV em meios RPMI 1640 e MSFV.....	83
Tabela 3 –	Classificação do perfil de sensibilidade de isolados de <i>C. albicans</i> de CVV baseado nos breakpoints de interpretação do CLSI (2008).....	83
Tabela 4 -	Sensibilidade planctônica de <i>C. albicans</i> oriundas de pacientes com CVV em meios RPMI 1640 e MSFV suplementados com progesterona e $\beta$ -estradiol.....	86

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
2.1	<b>Candidíase vulvovaginal (CVV)</b> .....	21
2.1.1	<i>Etiologia</i> .....	22
2.1.2	<i>O papel da microbiota na CVV</i> .....	23
2.1.3	<i>Aspectos gerais da fisiopatologia da CVV</i> .....	24
2.1.4	<i>Aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento</i> .....	26
2.1.5	<i>Epidemiologia</i> .....	29
2.1.6	<i>Fatores predisponentes</i> .....	31
2.1.6.1	<i>Ação dos hormônios esteroides sobre <u>Candida</u> spp. na CVV</i> .....	32
2.2	<b>Candida spp.</b> .....	36
2.2.1	<i>Aspectos morfológicos e identificação laboratorial</i> .....	37
2.3	<b>Patogenicidade e fatores de virulência de <i>Candida</i> spp. na CVV</b> .....	39
2.3.1	<i>Transição morfogênica</i> .....	40
2.3.2	<i>Adesão, invasão e danos ao tecido do hospedeiro</i> .....	40
2.3.3	<i>Plasticidade metabólica</i> .....	43
2.3.4	<i>Biofilmes</i> .....	44
2.3.4.1	<i>Modelos de estudos dos biofilmes</i> .....	47
3.	<b>HIPÓTESES</b> .....	51
4.	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	52
5.	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	52
6.	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	53
6.1	<b>População de estudo</b> .....	53
6.2	<b>Colheita e processamento de amostras</b> .....	53
6.3	<b>Desenho experimental</b> .....	54
6.4	<b>Isolamento e identificação de <i>Candida</i> spp.</b> .....	55
6.5	<b>Formação de biofilmes de <i>Candida</i> spp. em microcosmos (BMi)</b> .....	56
6.6	<b>Formação de biofilmes monoespécie (BMo) de <i>Candida</i> spp. em meios MSFV e RPMI 1640</b> .....	57
6.7	<b>Efeito dos hormônios progesterona e <math>\beta</math>-estradiol sobre os biofilmes de <i>Candida</i> spp. em BMi e BMo</b> .....	58

6.8	Recuperação de células persistentes a partir de biofilmes de <i>Candida</i> spp. em BMi e BMo .....	58
6.9	Efeito dos hormônios progesterona e $\beta$ -estradiol na recuperação de células persistentes a partir de BMi e BMo de <i>Candida</i> spp.....	59
6.10	Sensibilidade planctônica de <i>Candida albicans</i> isoladas das secreções vaginais em MSFV e RPMI 1640.....	59
6.11	Efeito dos hormônios progesterona e $\beta$ -estradiol na sensibilidade planctônica de <i>Candida albicans</i> em MSFV e RPMI 1640 .....	60
6.12	Efeito dos hormônios progesterona e $\beta$ -estradiol na sensibilidade de biofilmes de <i>Candida albicans</i> em MSFV e RPMI 1640.....	61
6.13	Análise Estatística.....	62
7.	RESULTADOS.....	63
7.1	População de estudo.....	63
7.2	Colheita e processamento de amostras.....	63
7.3	Isolamento e identificação de <i>Candida</i> spp.....	65
7.4	Formação de biofilmes de <i>Candida</i> spp. em microcosmos (BMi) e monoespécie (BMo) em MSFV e RPMI 1640 .....	66
7.5	Efeito dos hormônios progesterona e $\beta$ -estradiol sobre os de biofilmes de <i>Candida</i> spp. em microcosmos (BMi) e monoespécie (BMo).....	69
7.6	Recuperação de células persistentes a partir de biofilmes de <i>Candida</i> spp. em microcosmos (BMi) e monoespécie (BMo) .....	75
7.7	Efeito dos hormônios progesterona e $\beta$ -estradiol na recuperação de células persistentes a partir de biofilmes de <i>Candida</i> spp. em microcosmos (BMi) e monoespécie (BMo).....	77
7.8	Sensibilidade planctônica de <i>Candida albicans</i> isoladas das secreções vaginais em MSFV e RPMI 1640 .....	82
7.9	Efeito dos hormônios progesterona e $\beta$ -estradiol na sensibilidade planctônica de <i>Candida albicans</i> em MSFV e RPMI 1640.....	85
7.10	Efeito dos hormônios progesterona e $\beta$ -estradiol na sensibilidade de biofilmes de <i>Candida albicans</i> em MSFV e RPMI 1640.....	86
8.	DISCUSSÃO	91
9.	CONCLUSÕES	97



<b>REFERÊNCIAS</b>	98
<b>APENDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)</b>	108
<b>ANEXO A - COMPONENTES DOS MEIOS DE CULTIVO MSFV E RPMI 1640</b>	110

## 1 INTRODUÇÃO

A candidíase vulvovaginal (CVV) é uma condição patológica importante causada pela proliferação de leveduras do gênero *Candida* na mucosa vaginal. A CVV ocorre muito comumente nas mulheres em idade reprodutiva. Estima-se que até 75% da população feminina sofrerá com algum episódio de CVV pelo menos uma vez na vida (SOBEL, 2014). A maioria delas terão a infecção em sua forma descomplicada (um a três episódios ao ano). No entanto, em aproximadamente 8% das mulheres que sofrem com CVV a terão em sua forma de recorrência (quando há mais de quatro episódios no período de um ano) (DENNING et al., 2018; SOBEL, 2016). A prevalência da CVV é de aproximadamente 25% na população em geral. Ela ocupa do segundo lugar dentre as infecções cérvico-vaginais, precedida apenas pela vaginose de etiologia bacteriana (DENNING et al., 2018; SOBEL, 2007).

Os sintomas mais comuns da CVV incluem prurido, leucorreia, dispareunia, disuria e edema vulvar (FARR et al., 2021; SOBEL, 2007). Acredita-se que a CVV seja uma condição imunopatológica (WILLENS et al., 2020), e fatores endógenos relacionados ao hospedeiro podem estar envolvidos, como diabetes mellitus, gravidez, imunossupressão e elevada concentração de glicogênio do meio vaginal (diminuindo o pH local) e altos níveis de produção de hormônios sexuais (JAFARZADEH et al., 2022). Além de fatores exógenos como o uso de contraceptivos orais, antimicrobianos e dispositivos intrauterinos (FARR et al., 2021). O aparecimento dos sintomas da CVV pode estar correlacionado à fase lútea do ciclo menstrual, em que ocorrem os picos de concentração de hormônios esteroides. De fato, vários estudos relatam a influência da presença de estrogênio e progesterona na adesão, crescimento e formação de tubo germinativo em *C. albicans* (HE et al., 2021).

Tem-se estudado de forma mais acentuada os efeitos dos hormônios sexuais femininos sobre a patogênese de *Candida* spp. na CVV, porém os mecanismos envolvidos ainda não estão claros. Acredita-se que progesterona e  $\beta$ -estradiol podem inibir, estimular ou mesmo não afetar o crescimento e filamentação de *Candida* spp. e essa resposta é dependente de cepa (GONÇALVES et al., 2020; GONÇALVES et al., 2019; ALVES et al., 2014). No entanto, já foi demonstrado que esses hormônios induzem a expressão de genes relacionados ao estresse, que podem reduzir a sensibilidade aos azóis. (HE et al., 2021; PRASAD et al., 2012;)

*Candida albicans* é o agente etiológico prevalente na CVV. Essa levedura faz parte da microbiota do trato gastrointestinal e genito-urinário de até 70% dos humanos, mantendo-se como um organismo comensal (BITEW; ABEBAW, 2018). A microbiota em equilíbrio,

predominante em lactobacilos, promove uma barreira protetora à proliferação de *Candida* através da competição por nutrientes e receptores no epitélio vaginal, além da produção de bacteriocinas com propriedades antifúngicas, evitando a ocorrência de infecções, como a CVV (AURIEMMA et al., 2021). No entanto, quando há alteração na homeostase, gerando uma disbiose, a levedura consegue subverter a resposta do hospedeiro, tornando-se patogênica e expressando diversos fatores de virulência simultaneamente (MAKANJUOLA et al., 2018). *Candida* spp. podem causar infecções sintomáticas na mucosa vaginal, primariamente pelo elevado número de blastoconídeos presentes, depois pela capacidade de penetração das hifas no epitélio e, pela expressão de fatores de virulência que determinam sua patogenicidade (WILLENS et al., 2020; ACHKAR; FRIES, 2010).

Os fatores de virulência mais comuns que estão envolvidos na patogênese de *Candida* spp. na CVV são transição morfológica de blastoconídeo para hifa, capacidade de adesão a células epiteliais vaginais, produção de fosfolipases e proteinases como aspartil proteases (Saps), presença de candidalísina (Ece1), que é uma toxina peptídica citolítica, e a capacidade de adesão a superfícies abióticas ou bióticas para a formação de biofilmes (CZECHOWICZ et al., 2022). Estes últimos, por sua vez, são definidos como comunidades microbianas sésseis aderidas a superfícies bióticas ou abióticas, que produzem uma matriz extracelular exopolimérica (WALL et al., 2019; TOURNU; VAND DIJCK, 2012).

Diversos mecanismos estão envolvidos na maior tolerância dos biofilmes de *Candida* à ação dos antifúngicos, como a expressão de bombas de efluxo, sequestro da droga por componentes da matriz exopolimérica, alta impermeabilidade da matriz, que impede a penetração das drogas e a presença de células persistentes (ou dormentes) que sobrevivem à altas concentrações dos antifúngicos (POLKE; HUBE; JACOBSAN, 2015). As células persistentes são geneticamente iguais as outras células dos biofilmes, mas expressam o fenótipo de tolerarem altas concentrações de drogas antifúngicas. Essa característica é importante nos biofilmes, pois ao se reativarem, essas células podem recolonizar sítios do hospedeiro ou colonizar novos ambientes, podendo ocasionar a recidiva de infecções e o desenvolvimento de infecções crônicas. (WU et al., 2020; DENEGA et al., 2019; LA FLEUR, 2006).

A formação de biofilme de *C. albicans* no epitélio vaginal foi demonstrada pela primeira vez por Harriot e colaboradores (2010) em um estudo *in vivo*; segundo os autores, este é um fator crucial no estabelecimento da CVV. (WILLIAMS et al., 2013; HARRIOTT et al., 2010). Apesar de distantes do ambiente complexo encontrado na infecção natural, muito

do conhecimento sobre biofilmes fúngicos advém de estudos *in vitro*. O modelo de biofilme *in vitro em* Microcosmos incluem um maior número de parâmetros ambientais e levam em consideração a complexidade do inóculo iniciador do biofilme em condições naturais (LEBEAUX et al., 2013). Estudo recente demonstra que esse modelo é adequado ao estudo em sítios anatômicos com microbiota complexa, como o ambiente vaginal (CORDEIRO et al., 2020)

Assim, esse trabalho objetiva avaliar a influência dos hormônios sexuais femininos no desenvolvimento de biofilmes de *Candida* spp. derivadas de CVV e quais mecanismos microbiológicos podem estar envolvidos no aumento da tolerância aos antifúngicos e refratariedade da doença.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

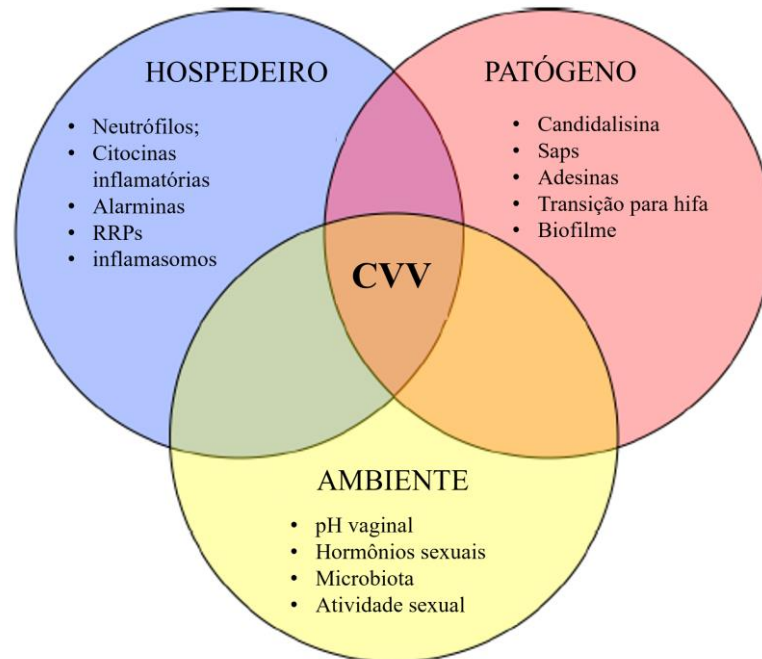
### 2.1 Candidíase Vulvovaginal (CVV)

A CVV é uma doença oportunística caracterizada pelo crescimento exacerbado de leveduras do gênero *Candida* spp. na mucosa do trato reprodutivo inferior feminino, ocasionando sintomas clínicos que provocam desconforto e irritação locais (JAFARZADEH et al., 2022; WILLENS et al., 2022; BRADFORD; RAVEL, 2017). A CVV é definida como a presença de sinais e sintomas relacionados à inflamação vulvar e vaginal com a presença de *Candida* spp. e ausência de outros agentes infecciosos (SARDI et al., 2021; ACHKAR; FRIES, 2010).

A CVV afeta mulheres em idade reprodutiva, e até 75% dessa população será acometida da doença pelo menos uma vez na vida. É a segunda infecção vaginal mais relatada, sendo precedida apenas pela vaginose de origem bacteriana (BRADFORD; RAVEL, 2017; CHEW; THAN, 2016; SOBEL, 2007). De 75% das mulheres que sofreram ou sofrerão de CVV alguma vez na vida, pelo menos 50% delas terão um segundo episódio, e de 5 a 8% terão a doença em sua forma recorrente, quando ocorre quatro ou mais episódios ao longo do ano (DENING et al., 2018; ACHKAR; FRIES, 2010). A CVV afeta milhões de mulheres todos os anos e é considerada um importante problema de saúde pública. Embora não esteja associada a mortalidade, mas a morbidade da doença é uma das principais causas de dor, desconfortos, alterações de autoestima e angústia, prejudicando o desempenho no trabalho e interferindo nas relações afetivas e sexuais das mulheres (GONÇALVES et al., 2016).

A CVV é uma doença multifatorial (figura 1). O reconhecimento da CVV como uma imunopatologia é considerado uma mudança de paradigma que não pode ser superestimada. Ainda que já tenham sido compreendidas os fatores do hospedeiro e do fungo que conduzem a patogênese da doença, muito ainda há para se descobrir (WILLEMS et al., 2020). Além da virulência do patógeno, a patogênese da CVV depende da predisposição do indivíduo e dos seus mecanismos de defesa (FARR et al., 2021). Os sintomas da doença podem ser modulados pela interseção entre os aspectos fisiológicos do hospedeiro e sua resposta imunológica, e a biologia do fungo (WILLEMS et al., 2020).

**Figura 1 - A CVV como uma doença multifatorial. Diversos fatores inerentes ao hospedeiro (círculo azul), ao ambiente (círculo amarelo) e ao patógeno (círculo róseo) são necessários para impulsionar o estabelecimento da doença.**



Fonte: Traduzido de Willems et al. (2020).

Nota: CVV: candidíase vulvovaginal; RRP: receptores de reconhecimento padrão.; Saps: aspartil proteinases

### 2.1.1 Etiologia

A espécie mais comum associada a CVV é *C. albicans* sendo reportada em até 90% dos casos (JAFARZADEH et al., 2022; CHEW; THAN, 2016). No entanto, outras espécies de *Candida* podem estar associadas à doença, como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. *C. glabrata* é a segunda espécie mais isolada de CVV, respondendo por até 20% dos casos, seguida por *C. tropicalis* (MAKANJUOLA et al., 2018; GONÇALVES et al., 2016). Além disso, ocasionalmente (em 1-10% dos casos) podem ser isolados mais de uma espécie de *Candida*, o que se denomina por infecções mistas. Normalmente, esse é um achado de casos que apresentam recorrência ou refratariedade (JAFARZADEH et al., 2022; GONÇALVES et al., 2016).

As vaginites ocasionadas por espécies não-albicans apresentam-se com quadros mais leves, em pacientes com condições médicas crônicas, tais como diabetes mellitus, mas tendem

a ser mais recorrentes ou recidivantes quando comparadas às vaginites ocasionadas por *C. albicans*. A falha no tratamento é comum em CVV por espécies não-albicans. Esse fato é devido a algumas espécies, como *C. krusei* e *C. glabrata*, serem intrinsecamente resistentes ou ter baixa sensibilidade aos principais antifúngicos usados para o tratamento da doença (SARDI et al., 2021; MAKANJUOLA et al., 2018). De fato, espécies de *Candida* não-albicans têm sido mais frequentemente isoladas de CVV recorrente do que de pacientes com a CVV esporádica. Possivelmente, isso é devido ao uso generalizado e maiores exposições aos antifúngicos em pacientes com a RCVV. Há também maior associação de isolamento de *Candida* não-albicans, especialmente *C. glabrata*, em pacientes com fatores predisponentes à doença, como diabetes e HIV positivas, o que pode estar atrelado as mudanças fisiológicas da paciente, que diminuem a capacidade de resposta do sistema imune (GONÇALVES et al., 2016).

### **2.1.2 O papel da microbiota na CVV**

A vagina humana é um ecossistema dinâmico composta de microrganismos comensais, simbióticos e patogênicos, que habitam sua mucosa e, ao mesmo tempo, mantém sua homeostasia por meio de relações mutualísticas com o hospedeiro (AURIEMMA et al., 2021). O habitat vaginal geralmente é dominado por bactérias produtoras de ácido lático. A presença dos lactobacilos promove um ambiente protetivo contra patógenos, pois estes produzem peróxido de hidrogênio, além de ácido lático, que gera um microambiente ácido, em resposta as variações dos níveis de estrogênio no sangue. *Lactobacillus* spp. também se aderem ao epitélio vaginal, promovendo uma competição pelos sítios de ligação à essas células e restringindo o crescimento de potenciais patógenos (AURIEMMA et al., 2021).

A microbiota vaginal pode ser classificada em cinco tipos de comunidades, quatro delas são dominadas por espécies do gênero *Lactobacillus* spp. (*L. crispatus*, *L. gasseri*, *L. iners* ou *L. jensenii*) e a última é descrita como “diversa”, por ter poucos lactobacilos e apresentar maior domínio de bactérias anaeróbicas. O predomínio de cada tipo de comunidade microbiana está associado a raça e etnia das mulheres (AURIEMMA et al., 2021; TORTELLI et al., 2019). *Candida* spp. comumente faz parte da microbiota vaginal, em um consórcio com outros tipos microbianos, principalmente do gênero *Lactobacillus*, podendo ser encontrada na microbiota de aproximadamente 30% das mulheres (GONÇALVES et al., 2016).

Diversos estudos têm associado a ocorrência da CVV à disbiose no ambiente vaginal. A disbiose é um termo utilizado para descrever mudanças na composição e função da microbiota de um nicho do corpo humano. A microbiota vaginal em disbiose, por sua vez, pode ser influenciada ativamente no seu nicho de localização, alterando funções na resposta imune do hospedeiro e favorecendo o acometimento de diversas doenças como as vaginites (WILLEMS et al., 2020). Segundo Wijgert e Jaspers (2017) a disbiose no ambiente vaginal é caracterizada por uma microbiota não dominada por *Lactobacillus* spp. Estados disbióticos na vagina podem ser descritos como aqueles encontrados quando há vaginose bacteriana (microbiota mista e anaeróbica), além de outros como a abundância de estreptococos, estafilococos ou enterobactérias, ou em condições de infecções por *Candida* spp. e *Trichomonas vaginalis*. (LEVY et al., 2017; WIJGERT; JESPERS, 2017)

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. Porém, 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 (TORTELLI et al., 2019; CECCARANI et al., 2019). Contudo, uma limitação importante desses estudos foi não definir a ocorrência simultânea de *Candida* com os lactobacilos a nível de espécie. Tortelli e colaboradores (2019) relataram que domínio de *L. iners*, em particular, suporta mais a ocorrência simultânea com *Candida*, principalmente, se comparado com *L. crispatus*, que *in vitro*, produziu maiores concentrações de ácido láctico e promoveu uma inibição de crescimento de *Candida* spp. relacionadas ao pH ainda mais baixo (TORTELLI et al., 2019).

### **2.1.3 Aspectos gerais da fisiopatologia da CVV**

Entre 10 e 50% das mulheres em idade fértil são colonizadas por organismos do gênero *Candida* como componente da microbiota vaginal. Essas leveduras acessam o trato reprodutor inferior feminino através da área perianal. É o balanço entre a levedura e os mecanismos de defesa do organismo, como a presença de lactobacilos e a ação do sistema



imune na mucosa vaginal, que mantém *Candida* spp. como um comensal (MAKANJUOLA et al., 2018; GONÇALVES et al., 2016).

Os mecanismos responsáveis pela transição de *Candida* spp. como um organismo comensal para patogênico ainda não são completamente compreendidos. Porém, este aspecto pode estar associado ao equilíbrio entre microbiota dominante de *Lactobacillus* spp., que dispõe fatores protetivos ao ambiente vaginal, e *Candida* spp., na mucosa vaginal (JAFARZADEH et al., 2022). Usualmente, A CVV ocorre devido ao desequilíbrio entre fatores de proteção da vagina juntamente com a expressão de fatores de virulência do fungo. A manutenção da integridade das barreiras da mucosa, a microbiota em eubiose e o bom funcionamento do sistema imunológico, dentre outros aspectos, protegem o organismo e evitam um processo infeccioso fúngico (MAKANJUOLA et al., 2018).

As etapas que induzem *Candida* spp. a causarem a infecção vão desde a adesão ao epitélio vaginal, seguida de invasão ao tecido do hospedeiro e a inflamação gerada pelos fatores de virulência expressos pelo fungo (proteases, lipases, candidalisina etc). A formação de hifas e pseudo-hifas estimulam a quimiotaxia agressiva de neutrófilos que, posteriormente, causam a inflamação. A candidalisina também desempenha um papel citotóxico sobre as células do hospedeiro, além de promover a invasão e recrutamento de leucócitos para o local da lesão (FARR et al., 2021).

A capacidade de adesão de *Candida* spp. ao epitélio vaginal é o passo inicial que distingue a colonização da infecção. O reconhecimento da levedura pelo sistema imunológico ocorre, principalmente, através dos componentes glicosídicos de sua parede celular, que atuam como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ligados aos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) na célula do hospedeiro. Os mecanismos que facilitam a aderência de *Candida* spp. à mucosa da vagina são cruciais no estabelecimento da colonização, bem como da infecção. As adesinas desempenham papel fundamental no reconhecimento dos receptores nas células epiteliais e promove a adesão a superfícies (FARR et al., 2021; MAKANJUOLA et al., 2018).

Após a colonização, vários mecanismos estão envolvidos nas interações de *Candida* spp. com o epitélio vaginal, que incluem a infiltração e invasão, endocitose induzida, secreção de citocinas pró-inflamatórias e enzimas hidrolíticas, danos epiteliais e redução da função de barreira mucosa. Diversas enzimas são produzidas e secretadas pela levedura, estando envolvidas na degradação dos tecidos e na clivagem de proteínas do sistema imune. Isso aumenta a aquisição de nutrientes, a capacidade de invasão do fungo e a evasão de *Candida*

spp. do reconhecimento do sistema imune inato (FARR et al., 2021; MAKANJUOLA et al., 2018).

A habilidade de *Candida* spp. de modificar sua morfologia de levedura para hifa é crucial em sua virulência. Essa morfogênese é controlada por sensores ambientais e fatores de transcrição regulatórios. Um dos elementos que promove sua transição morfológica é a presença de estrogênio. Quando os receptores de estrogênio no citoplasma da célula fúngica são estimulados, a patogenicidade e virulência de *Candida* spp. aumentam (FARR et al., 2021; MAKANJUOLA et al., 2018). Outros fatores incluem a tolerância ao pH ácido e a presença de enzimas que permitem que *Candida* spp. sobrevivam dentro dos macrófagos. Componentes da parede fúngica, como glucanos, quitina, mananas podem se ligar a receptores específicos nos macrófagos e estimularem a produção de citocinas pró-inflamatórias. Isso leva a ativação da resposta imune inata e inflamassoma NLRP3, importante na resposta imune da CVV. A formação dos biofilmes por *Candida* spp. no ambiente vaginal também é uma estratégia importante que confere maior tolerância ao tratamento fúngico e possibilita a ocorrência de episódios de recidiva da doença (FARR et al., 2021).

#### **2.1.4 Aspectos clínicos, diagnóstico e tratamento**

Os sinais e sintomas mais comuns na CVV incluem prurido, leucorreia, disúria, dispareunia, vermelhidão na vulva e vagina (figura 2). A apresentação clínica da CVV varia desde casos esporádicos e de sintomas leves até episódios de sintomas intensos e frequentes (MAKANJUOLA et al., 2018; SOBEL, 2007).

A CVV pode ser classificada em não-complicada e complicada (ACHKAR; FRIES, 2010; SOBEL et al., 1998). Os casos não-complicados, geralmente são causados por *C. albicans* e afetam, em geral, mulheres saudáveis. Apresentam-se como episódios esporádicos (até quatro por ano) de baixa ou média intensidade, podendo ser controlados com curto tratamento de antifúngicos. Os complicados podem estar associados à etiologia de espécies de *Candida* não-albicans, particularmente *C. glabrata*, ou casos severos causados por qualquer espécie de *Candida*. Em geral, são episódios recorrentes e de grande intensidade, ademais não podem ser controlados em um curto período de tratamento antifúngico (JAFARZADEH et al., 2022; MAKANJUOLA et al., 2018; GONÇALVES et al., 2016). Comumente, a CVV é

descrita em casos agudos isolados, com frequência de até quatro vezes ao ano, intercalando os episódios a períodos assintomáticos. Contrariamente, a CVV também pode apresentar-se como uma manifestação persistente e cíclica, definida como CVV crônica (JAFARZADEH et al., 2022; HONG et al., 2013).

**Figura 2 - Irritação vulvar e leucorreia característica de CVV.**



Fonte: Vieira-Baptista e Bornstein (2019); Sobel (2014).

A candidíase de recorrência (RCVV) é uma forma de CVV complicada e definida como a ocorrência de quatro ou mais episódios no período de um ano. Estima-se que entre 5 e 8% das mulheres são mais propensas a RCVV. As causas da recorrência são, frequentemente, relacionadas aos fatores predisponentes da doença (gravidez, diabetes, imunossupressão etc). Esses casos requerem tratamentos de manutenção com uso de antifúngicos por longo prazo, durante meses ou mais, para evitar a recorrência (YANO et al., 2019; MAKANJUOLA et al., 2018; GONÇALVES et al., 2016)

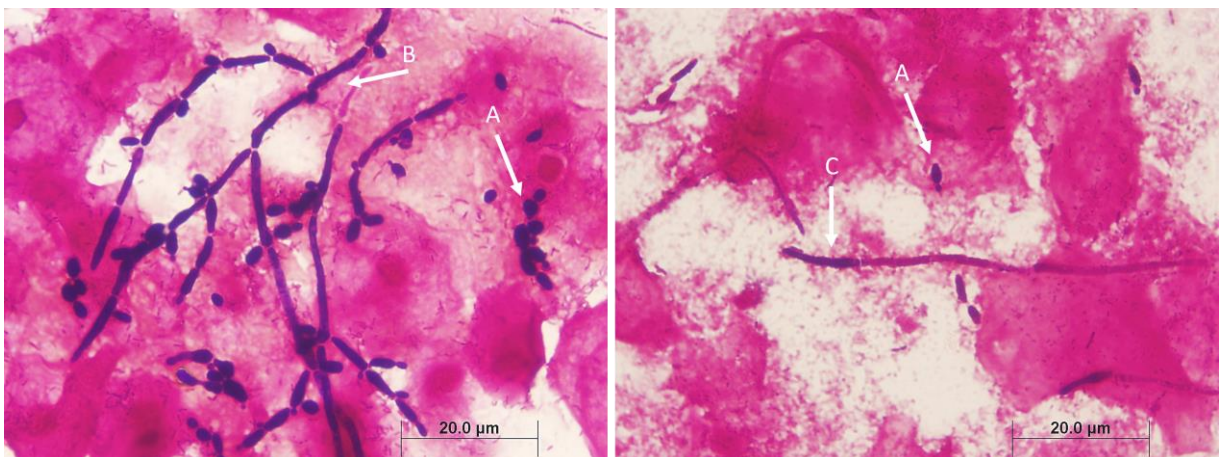
O sintoma mais comum da CVV é o prurido vulvar, que está presente entre 60 e 90% dos casos. A leucorreia também é um sinal bastante associado a doença, estando presente entre 72 e 87% dos casos. O muco da leucorreia é característico, podendo ser descrito com um aspecto de “leite talhado”, mas pode apresentar-se mais mucoide, e não possui odor. Entre 25 e 50% dos casos, há queixas de sintomas no trato urinário, como a disúria. Outros sintomas como a ardência, dor, vermelhidão e dispareunia também são relatados. Os casos de CVV também são relacionados à fase lútea do ciclo menstrual, agravando-se nos dias imediatamente anteriores à menstruação (JAFARZADEH et al., 2022; SARDI et al., 2021). Ao exame físico, a leucorreia e a inflamação da mucosa da vulva e vagina são visíveis. A leucorreia pode ser notada em até 94% dos casos, e os eritemas de vulva e vagina em até 54%

e 86% dos casos, respectivamente, ao exame pélvico. Edema vulvar também pode estar presente, em até 17% dos casos (JAFARZADEH et al., 2022).

Estudos mostram que a associação dos sintomas como prurido, leucorreia e edema vulvar com a cultura positiva para *Candida* spp. aconteceram em apenas 54% dos casos. Portanto, o diagnóstico da CVV não deve ser realizado apenas observando as características clínicas, pois a maioria de sinais e sintomas relatados são compartilhados com outras infecções como a vaginose bacteriana, tricomoníase e gonorreia (JAFARZADEH et al., 2022; SARDI et al., 2021; ABBOTT, 1995). O diagnóstico da CVV consiste em, associados à sinais ou sintomas na paciente, visualizar em microscópio óptico a presença de hifas, pseudo-hifas e blastoconídeos (figura 3), e polimorfonucleares do hospedeiro, na preparação de lâmina com salina e KOH (10%) (FARR et al., 2021; SARDI et al., 2021).

Mesmo correlacionando a apresentação clínica com a visualização microscópica, cerca de 1/5 de pacientes com queixas vaginais ainda não são diagnosticados. Nesses casos, faz-se necessário cultivo do micro-organismo. A combinação de características clínicas, microscopia e cultura de *Candida* spp. em meios seletivos ou diferenciais pode chegar até 90% de precisão no diagnóstico da CVV (JAFARZADEH et al., 2022; MAKANJUOLA et al., 2018; ECKERT et al., 1998).

**Figura 3 - Visualização de esfregaço de amostra vaginal de pacientes com quadro característico de CVV corado pelo método de Gram.**



Fonte: A autora (2023).

Nota: Setas indicam a presença dos morfotipos de *Candida* spp. observados ao diagnóstico laboratorial. A: blastoconídeos. B: pseudo-hifas C: hifas verdadeiras. Aumento: 1000x.

O tratamento para a CVV é realizado, prioritariamente, com derivados azólicos, e alternativamente, com poliênicos, como a nistatina (SOBEL, 2014). As drogas antifúngicas da

classe dos azólicos são um grupo de compostos sintéticos e podem ser divididos em triazóis, como o fluconazol, itraconazol e voriconazol; e os imidazóis, como o clotrimazol, miconazol e tioconazol. Ambos os grupos interferem na síntese do ergosterol, ao bloquear a enzima 14- $\alpha$ - demetilase, no citocromo p450 do fungo. Dessa forma, não há a conversão do lanosterol em ergosterol. Os triazóis são metabolizados mais lentamente no organismo e podem ter um menor efeito sob a síntese dos ergosteróis em humanos. As taxas de cura clínica podem chegar até 90%, independente da terapia ser oral (triazóis) ou tópica (imidazóis). As drogas antifúngicas do grupo dos macrolídeos poliênicos, como a nistatina, atuam na alteração da permeabilidade da membrana plasmática do fungo. Eles formam poros ao ligarem-se ao ergosterol da membrana, o que altera a homeostase da célula. O uso da nistatina no tratamento da CVV é feito de forma tópica, com taxa de cura clínica de até 80% (FARR et al., 2021; SOBEL, 2014; SIDRIM; ROCHA, 2004).

Drogas antifúngicas de uso tópico e terapia orais são os mais indicados para o tratamento da CVV não-complicada. O tratamento tópico com os imidazóis é o indicado como primeira escolha, na forma de cremes ou supositórios vaginais. Alternativamente, pode ser feita a terapia oral com triazóis, ou a terapia tópica com a nistatina. O tratamento oral possui taxa de cura micológica comparável as dos agentes tópicos, e maioria dos pacientes prefere a conveniência do tratamento com antifúngicos orais (FARR et al., 2021; GONÇALVES et al., 2016). Além disso, tanto derivados azólicos orais ou tópicos possuem baixa efetividade contra a CVV causada por *C. glabrata*, em comparação a *C. albicans*. Alternativamente, para o tratamento de CVV causada por *C. glabrata*, pode usar ácido bórico ou flucitosina, que têm se mostrado efetivos no tratamento causado por espécies de *Candida* não-albicans (GONÇALVES et al., 2016).

### **2.1.5 Epidemiologia**

A CVV não é uma doença de notificação obrigatória aos órgãos e instituições de saúde, logo as informações sobre sua incidência são incompletas e baseadas em estudos epidemiológicos, que muitas vezes, são dificultados por diagnósticos imprecisos e populações não-representativas (GONÇALVES et al., 2016). A alta morbidade e o sofrimento clínico que afeta as mulheres em idade reprodutiva, tanto na CVV descomplicada como na complicada acarretam enormes custos para os pacientes e para o sistema de saúde. A

população total anual de mulheres afetadas pela RCVV é de 138 milhões e pode chegar até 158 milhões de mulheres até 2030 (JAFARZADEH et al., 2022; YANO et al., 2019). Nos EUA, o ônus para a economia devido a perda de produtividade pelo afastamento ao trabalho chega a R\$ 14 bilhões de dólares, anualmente (SOBEL, 2014).

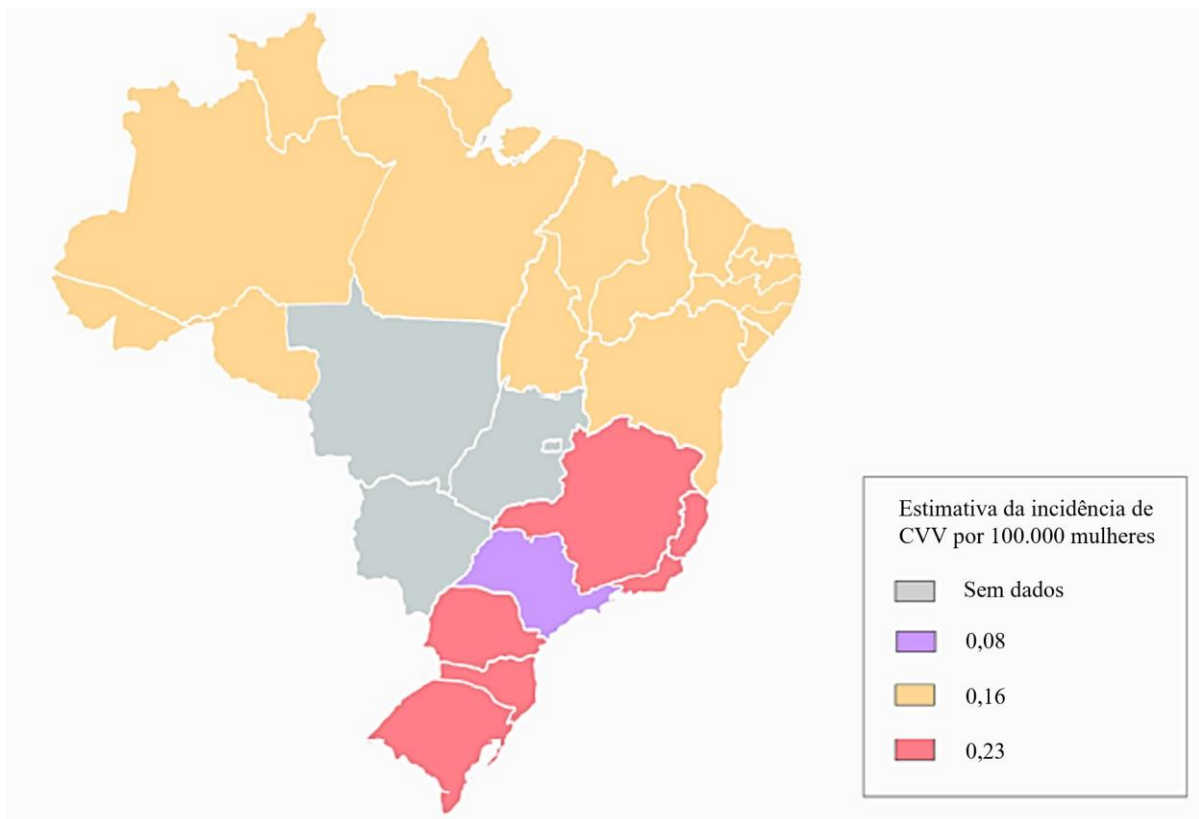
*C. albicans* é o agente etiológico prevalente na CVV no mundo todo, sendo reportada em até 90% dos casos (JAFARZADEH et al., 2022; CHEW; THAN, 2016). A distribuição das espécies de *Candida* que causam CVV varia amplamente, a depender da localização geográfica e do perfil das populações de estudo. Em diversos países, a prevalência de espécies de *Candida* não-*albicans* está aumentando, especialmente *C. glabrata*, que já é responsável por até 20% dos casos de CVV. Espécies de *Candida* não-*albicans* como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* já são apontadas como predominantes em estudos de diversos países da América do Norte, Europa, África e Ásia (JAFARZADEH et al., 2022; SARDI et al., 2021). A maior incidência de *C. albicans* na CVV foi relatada em estudos epidemiológicos do Brasil (92,3%), seguido de Argentina (85,95%) e Paquistão (47,7%). (SARDI et al., 2021).

A prevalência estimada de CVV no Brasil é de 18% (CARVALHO et al., 2021). Na revisão sistemática, baseada em pesquisas epidemiológicas realizadas no país, Carvalho et al. (2021) mostraram que os estados do Sul e Sudeste apresentaram maior prevalência da CVV que os estados do Norte e Nordeste (0,23 e 0,16 por 100.000 mulheres, respectivamente). Atribui-se a isso a subnotificação e ausência de estudos direcionados à essas regiões. Ainda, não foram encontrados dados da região Centro-Oeste do Brasil (CARVALHO et al., 2021). (Figura 4)

Dos estudos avaliados por Carvalho et al. (2021), três deles foram conduzidos na região Nordeste. Um na cidade de Natal (RN), um em Salvador (BA), um na cidade de Pacoti (CE). O estudo realizado por Brandão e colaboradores (2018), no Rio Grande do Norte, mostrou uma incidência de 48,78% de casos CVV entre pacientes grávidas sintomáticas atendidas na Maternidade Escola Januário Cicco. *C. albicans* foi isolada em 95% das amostras e *C. glabrata* em 5% das amostras positivas (BRANDÃO et al., 2018). O segundo estudo, realizado por Mascarenhas et al. (2012), em Salvador (BA), mostrou uma prevalência de CVV de 22% entre uma população de 100 adolescentes atendidas no Serviço de Ginecologia da Infância e Adolescência da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Nesse estudo não houve a diferenciação entre as espécies de *Candida* isoladas. A leucorreia foi o sinal/sintoma mais observado no grupo de pacientes positivas (68,2%), seguido pelo

edema vaginal (13,3%) e prurido (9,1%) (MASCARENHAS et al., 2012). O terceiro estudo foi realizado por Oliveira et al. (2007), na cidade de Pacoti (CE) com 592 pacientes em idade reprodutiva e sexualmente ativas, com média de idade 31 anos. A prevalência para a CVV nesse grupo de pacientes foi de 12,5%. Nesse estudo também não houve diferenciação entre as espécies de *Candida* isoladas. Os sintomas mais relatados foram a leucorreia (56,8%), dor abdominal pélvica (50%) e prurido (47,3%) (OLIVEIRA et al, 2007).

**Figura 4 - Prevalência de CVV no Brasil por região demográfica.**



Fonte: Traduzido de Carvalho et al. (2021)

### **2.1.6 Fatores predisponentes**

Mulheres saudáveis desenvolvem a CVV esporadicamente, porém a ocorrência da infecção pode ser atribuída a presença de fatores associados ao hospedeiro ou ao ambiente, que perturbam o equilíbrio da microbiota do hospedeiro. Gravidez, tratamento com antibióticos de amplo espectro, imunossupressão, altos níveis de glicogênio no ambiente vaginal, elevadas concentrações dos hormônios sexuais femininos, uso de contraceptivos orais



ou dispositivos intrauterinos, higiene e frequência sexual, diabetes não controlada e estresse podem facilitar o desenvolvimento da doença (JAFARZADEH et al., 2022; SARDI et al., 2021; YANO et al., 2019).

A gravidez é um importante fator predisponentes para a CVV devido ao aumento dos níveis hormonais, principalmente a progesterona, e pelo aumento de secreção de glicogênio, que favorece a acidificação do ambiente vaginal, reduzindo a população bacteriana e favorecendo a proliferação fúngica. O estrogênio na gravidez, aumenta a avidez do epitélio vaginal para a adesão de *Candida* spp. e sua morfogênese de blastoconídeo para hifa (SARDI et al., 2021; MAKANJUOLA et al., 2018). O uso de contraceptivos orais com progesterona e estradiol favorecem o acometimento da CVV pelos mesmos motivos, mas também promovem o crescimento fúngico. O uso de dispositivos intrauterinos (DIU's) aumenta os riscos de ocorrência da CVV devido a habilidade de *Candida* spp. em aderir a dispositivos médicos e formar biofilmes, contribuindo na colonização, redução da sensibilidade aos antifúngicos e recidivas da doença (FARR et al., 2021; SARDI et al., 2021). O diabetes não controlado, por sua vez, aumenta as taxas de açúcar disponíveis no sangue, que aumentam a disponibilidade de glicose e glicogênio no ambiente vaginal, favorecendo a acidificação do epitélio e proliferação da levedura. O uso de antibióticos de amplo espectro também é considerado um importante fator predisponente para a CVV, pois reduzem a microbiota vaginal normal, particularmente bactérias do gênero *Bacillus* sp., que reduz a competição por nutrientes e facilita a proliferação de *Candida* (FARR et al., 2021; SARDI et al., 2021; MAKANJUOLA et al., 2018).

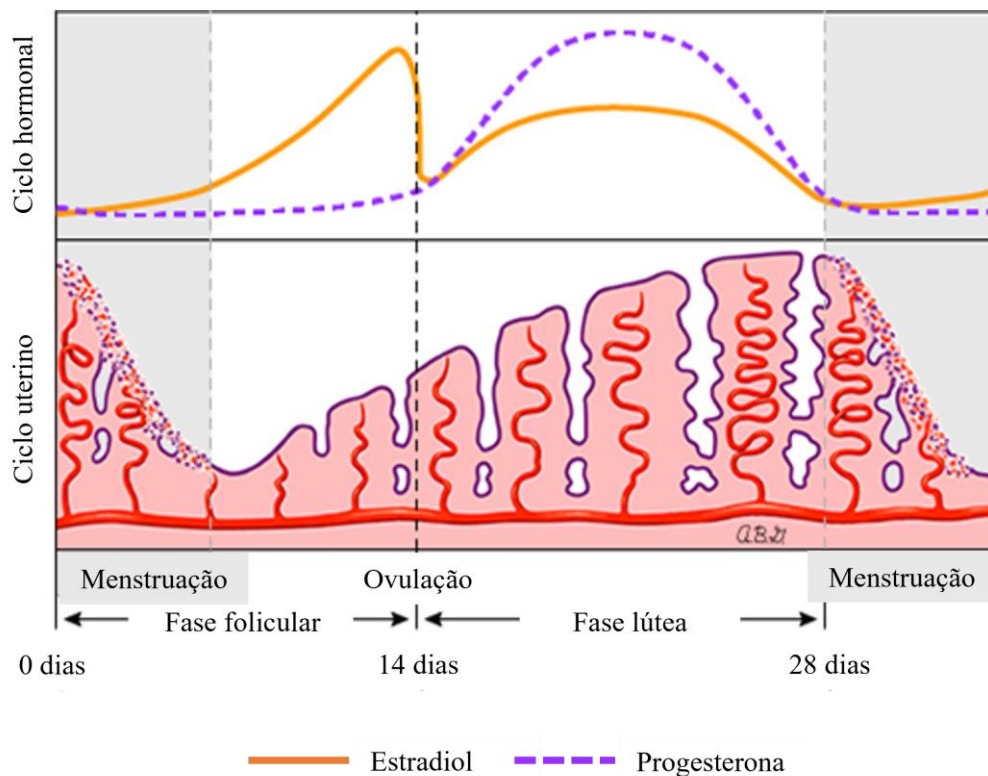
#### 2.1.6.1 Ação dos hormônios esteroides sobre *Candida* spp. na CVV

A dependência hormonal da CVV é suportada pelo fato da quase exclusividade da doença ocorrer em mulheres em idade reprodutiva, raramente acontecendo nas fases pré-menarca e pós-menopausa (HE et al., 2021; SPACEK et al., 2007; KINSMAN et al., 1988). A CVV é comum na gravidez, principalmente no terceiro trimestre; em mulheres que usam contraceptivos orais que incluem os estrogênios, ou em terapias de reposição hormonal (HE et al., 2021; FARR et al., 2021; KINSMAN et al., 1988;). Além do mais, em pacientes sem nenhuma dessas condições predisponentes, os episódios de CVV ocorrem com maior frequência no período pré-menstrual, que corresponde a fase lútea do ciclo menstrual (HE et al., 2021; FARR et al., 2021; FILDEL JR et al., 2000; KINSMAN et al., 1988).



O ciclo menstrual feminino é dividido em duas fases, a primeira é a fase folicular que, inicialmente apresenta baixos níveis hormonais de estrogênio e progesterona. A maturação do folículo ovariano provoca aumentos graduais nas concentrações de estrogênio, que promove o espessamento do endométrio. Na ovulação, há um pico de concentração de estrogênio, que logo decresce, mas volta a níveis maiores na fase lútea do ciclo. Após a ovulação inicia-se a fase lútea, caracterizada pelos níveis elevados dos hormônios estrogênio e progesterona. Esses hormônios aumentam devido à presença do corpo lúteo que liberou o óvulo. Na fase lútea tardia há uma redução dos níveis desses hormônios devido à degradação do corpo lúteo. Se não há um óvulo fecundado, ocorre a redução de suprimento sanguíneo para o endométrio, que inicia sua descamação e início da menstruação (figura 5) (HE et al., 2021; SILVERTHON, 2017)

**Figura 5 - Ciclo menstrual normal**



Fonte: Traduzido de Up to Date. ([uptodate.com/normal-menstrual-cycle](https://uptodate.com/normal-menstrual-cycle)).

Os papéis dos hormônios esteroides como a progesterona e estrogênio na CVV não são completamente esclarecidos. Contudo, há mais estudos no entendimento da relevância do estrogênio sobre o ambiente vaginal e sobre o fungo. Poucos estudos elucidam o papel da progesterona, ademais, muitos deles contradizem-se entre si. O fato é que a condição hormonal

atua diretamente sobre a resposta imunológica do hospedeiro à infecção, sua microbiota e sobre a patogenicidade de *Candida* (FARR et al., 2021; TANEJA, 2018;).

O estrogênio tem um papel crucial na composição da microbiota e no epitélio vaginal. (HE et al., 2021). Assim que a idade reprodutiva começa, o aumento de estrogênio promove a hiperplasia do epitélio da mucosa vaginal e aumenta o conteúdo de glicogênio dentro das células. Este é metabolizado pelos lactobacilos, produzindo ácido lático, e por consequência, caracterizando o pH vaginal como um ambiente ácido (SARDI et al., 2021). Estudos mostram que a presença de estrogênio provoca anergia leucocitária. Ademais, altos níveis do hormônio estimulam as células epiteliais a produzirem inibidores, como o sulfato de heparam, que impedem que os receptores dos neutrófilos interajam com seus respectivos ligantes na célula da levedura (KUMWENDA et al., 2022; FARR et al., 2021; HE et al., 2021). A presença de estrogênio no pico da fase folicular do ciclo, reduz a migração de neutrófilos para o lúmen vaginal (LASARTE et al., 2013). Ainda, a presença de estrogênio favorece o escape de *Candida* do sistema imune inato pela inibição da opsonofagocitose, através da aquisição da proteína H (reguladora do sistema complemento) na superfície do fungo (KUMWENDA et al., 2022).

Os níveis de progesterona na fase lútea do ciclo promovem o gradiente de migração de neutrófilos para o lúmen vaginal, reduzindo a quantidade de micro-organismo da microbiota vaginal e favorecendo colonização de patógenos como *Candida* spp. (LASARTE et al., 2013). Além disso, a progesterona atua na supressão da atividade anti-*Candida* dos neutrófilos na resposta imune, criando uma janela de vulnerabilidade após a ovulação, que também pode oferecer a oportunidade de patógenos invadirem o trato reprodutor feminino (HE et al., 2021; SPACEK et al., 2007).

Os hormônios esteroides humanos afetam o crescimento, morfogênese, sensibilidade a drogas, e perfil de expressão de diversos genes e proteínas em células fúngicas (HE et al., 2021; PRASAD et al., 2012). Estudos em modelos murinos, sob elevadas concentrações hormonais, como as encontradas na gestação, mostraram que o estrogênio e progesterona afetam a formação de tubo germinativo em *Candida* e aumentam o crescimento das hifas. Outrossim, estrogênio como o  $\beta$ -estradiol, e a progesterona possuem sítios de ligação na superfície de *Candida*, que são os *estrogen-binding protein* (EBP) e *progesterone-binding protein* (PBP) que favorecem sua interação (HE et al., 2021; PRASAD et al., 2012; FILDEL JR et al., 2000).

Foi demonstrado que os esteroides funcionam como sinais ambientais para a transição morfogênica de *C. albicans* e que progesterona e  $\beta$ -estradiol promovem a aderência de *Candida* ao epitélio vaginal (LUAN et al., 2020). A presença de progesterona e  $\beta$ -estradiol promovem uma regulação nos genes associados ao desenvolvimento de hifas, e influenciando a expressão de diversos genes envolvidos na transição para o estado hifálico (BATAINEH et al., 2022; HE et al., 2021; PRASAD et al., 2012). Os esteroides podem ser percebidos pelas leveduras como estresse, os quais levam a ativação de respostas ao estresse, como proteínas de choque térmico, reguladores de ciclo celular, transportadores MDR etc. (PRASAD et al., 2012). Ainda, a presença de progesterona e  $\beta$ -estradiol podem reduzir a sensibilidade ou promover uma resistência transitória em *C. albicans* frente a derivados azólicos, como o fluconazol (HE et al., 2021; PRASAD et al., 2012)

Diversos estudos evidenciam os efeitos do  $\beta$ -estradiol sobre as células de *Candida*. Zhang et al. (2000) e Tarry et al. (2005) mostraram que  $\beta$ -estradiol estimula o crescimento, produção de toxinas e formação de tubo germinativo; além do estímulo ao crescimento e tolerância a altas temperaturas. A exposição de *Candida* ao  $\beta$ -estradiol também estimulou a expressão do gene *CDR1* (*Candida multidrug resistance*) e do gene *HSP90*, relacionado a proteínas do choque térmico (TARRY et al, 2005; ZHANG et al., 2000). Ademais,  $\beta$ -estradiol estimulou a colonização, crescimento e persistência de *Candida* em modelos murinos (HAMAD et al., 2004). Cheng et al. (2006) demonstraram que a presença de  $\beta$ -estradiol aumentou o número de células formando tubo germinativo e aumentou o tamanho desses tubos germinativos, de maneira dose e cepa dependente. Porém a exposição ao hormônio não influenciou na biomassa de culturas de *Candida*. A presença do estrogênio também aumentou a expressão dos genes *CRI* e *CRD2*, mostrando que esses genes são os mais responsivos à exposição com estrogênio (HE et al., 2021; PRASAD et al., 2012; CHENG et al., 2006). Hormônios esteroides, como o  $\beta$ -estradiol, agem como substratos das proteínas ABC (bombas de efluxo de drogas), se ligando a transportadores de efluxo de drogas na membrana das células fúngicas (HE et al., 2021)

A ação da progesterona diretamente sobre *Candida* foi demonstrada pela modulação da formação do biofilme de *C. albicans*. Alves et al. (2014) e Gonçalves et al. (2020) demonstraram que progesterona em níveis elevados foi capaz de reduzir o número de células, biomassa e produção de hifas em biofilmes de *Candida*. Além disso, a presença do hormônio reduziu a expressão dos genes *BCR1* e *HWP1*, relacionados à adesão e formação de biofilmes, (ALVES et al., 2014).

## 2.2 *Candida* spp.

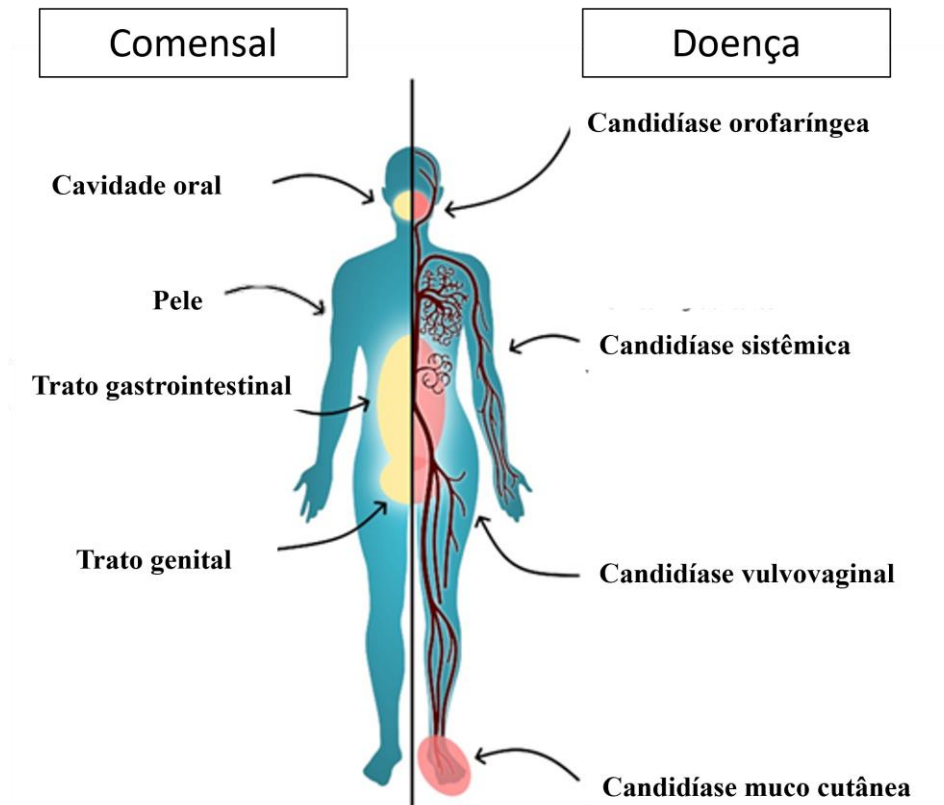
O gênero *Candida* pertence ao filo Ascomycota, classe Saccharomycetes, ordem Saccharomycetales e família Saccharomycetacea (CHAY et al., 2010). São organismos heterotróficos, aeróbios e fermentadores, podendo desenvolver-se também em condições de microaerofilia (SCHULZE; SONNENBORN, 2009). Mais de 200 espécies já foram catalogadas como pertencentes ao gênero *Candida*, e pelo menos 30 espécies são reconhecidas como causas de infecção (MERSEGUÉL et al., 2015; BRANDT; LOCKHART, 2012).

*Candida* spp. estão presentes em até 70% dos indivíduos como organismo comensal, sendo encontrados principalmente em mucosas da cavidade oral, trato gastrointestinal, genito-urinário e pele (figura 6) (D'ENFERT et al., 2021; CAUCHIE et al., 2017; UNDERHILL; ILIEV, 2014).

O primeiro relato ocorrido de infecções causadas por leveduras é datado do século V A.C., quando o médico grego Hipócrates relatou, pela primeira vez, a presença de placas esbranquiçadas na cavidade oral de um recém-nascido. Relatórios clínicos indicando ligação entre doença e o isolamento de *Candida* sp. são do ano de 1839, quando Langenbeck isolou e descreveu o gênero *Candida*. A partir daí, *C. albicans* tem sido relatada como o principal agente etiológico de candidíases e outras doenças de mucosas (CZECHOWICZ et al., 2022; 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).

**Figura 6 - Sítios de colonização de *Candida* spp. no corpo humano e principais sítios de acometimento de doenças oportunistas causadas por espécies de *Candida*.**

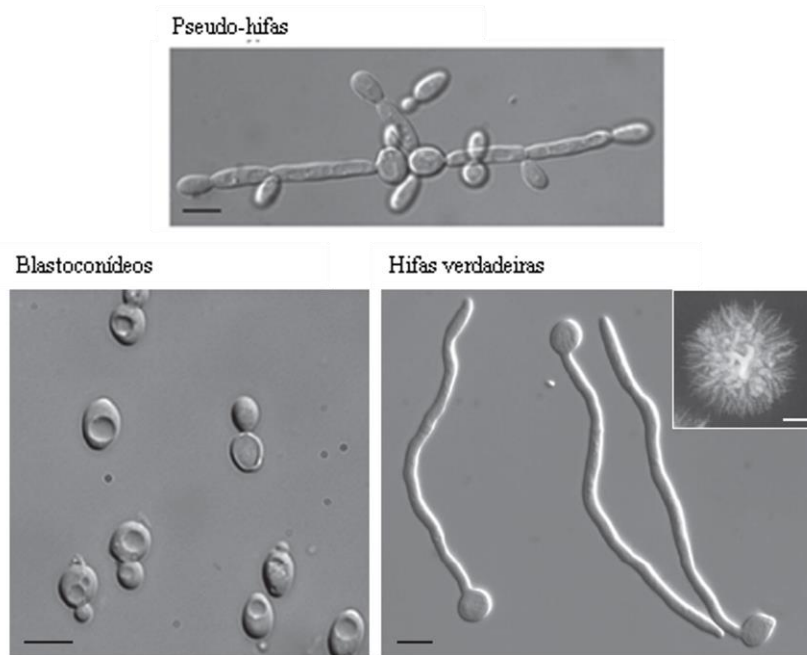


Fonte: Traduzido de D'ENFERT et al. (2021).

### **2.2.1 Aspectos morfológicos e identificação laboratorial**

Os micro-organismos do gênero *Candida* são organismos pleomórficos, que podem apresentar-se morfológicamente em blastoconídeos, pseudo-hifas e hifas verdadeiras (figura 7). Os blastoconídeos consistem em estruturas arredondadas, unicelulares, que podem se dividir por brotamento simples ou fissão binária. As pseudo-hifas são estruturas tubulares, formadas a partir de brotamento simples, que alteraram características dos polissacarídeos de parede, conferindo-lhes o aspecto alongado das células. Quando estas assemelham-se bastante às hifas verdadeiras, podem ser diferenciadas pela presença de constrictões que são formadas antes de cada novo brotamento. As hifas, por sua vez, são estruturas filamentosas que não possuem paredes transversais que separam as células. Os septos presentes nas hifas possuem poros para passagem de material citoplasmático e até núcleo entre as células. O crescimento das hifas ocorre de forma apical (SUDBERY, 2011; SIDRIM; ROCHA, 2004).

**Figura 7 - Morfotipos encontrados no gênero *Candida*. Pseudo-hifas, blastoconídeos e hifas verdadeiras.**



Fonte: Traduzido de Sudbery (2011)

Colônias de *Candida* crescem bem em temperatura ambiente (28 -30 °C) em até 72 horas. Em meio Sabouraud ou Ágar Batata Dextrose, apresentam colônias de textura glabra e relevo convexo, com algumas variações cerebriformes ou rugosas. A coloração, em geral, é leitosa e pode variar de branco a amarelado (figura 8) (SIDRIM; ROCHA, 2004).

**Figura 8 - Colônias de *Candida albicans* em Ágar Sabouraud Dextrose**



Fonte: A autora (2023)

A identificação fenotípica do gênero *Candida* é baseada em testes que analisam critérios macroscópicos e microscópicos da colônia, como a observação das características do crescimento da colônia, o uso de meios de cultivo diferenciais como o *ChromAgar Candida*, o teste do tubo germinativo e microcultivo; além de características bioquímicas da célula, como assimilação de carboidratos e nitrogênio, fermentação de carboidratos e detecção da produção de urease (SIDRIM; ROCHA, 2004).

Ademais, métodos moleculares fazem-se necessários para a confirmação da identificação presuntiva de *Candida*. O uso da região ITS (*internal transcribed spacers*) e as regiões do DNA ribossomal (28S e 18S) são largamente usadas em pesquisa micológica (UNDERHILL; ILIEV, 2014). A espectrometria de massa por tempo de voo - MALDI-TOF MS, está entre as descobertas das novas técnicas de identificação de espécies de *Candida*, pois promove uma identificação confiável e rápida. Esse método de identificação caracteriza as moléculas pela medida da relação massa/carga de espécies ionizadas em fase gasosa e fornece um perfil proteômico de cada espécie que é confrontado com uma base de dados, que viabiliza a identificação e diferenciação das espécies de *Candida*. (LIMA-NETO et al., 2014).

### **2.3 Patogenicidade e fatores de virulência de *Candida* spp. na CVV**

Fungos do gênero *Candida* geralmente são conhecidos como organismos não patogênicos em pessoas hígdas. Porém, quando há perturbação na homeostase do hospedeiro, emergem como patógenos oportunistas. A incidência de doenças causadas por *Candida* spp., principalmente as candidemias, tem aumentado em todo o mundo, com taxa de mortalidade que chegam até 70% em determinados grupos de pacientes, como prematuros, neutropênicos, pacientes em terapias imunossupressoras, portadores de HIV e pacientes hospitalizados por longos períodos (LOPES; LIONAKIS, 2022; CZECHOWICZ et al., 2022).

A capacidade de *Candida* spp. em colonizar ou infectar sítios no corpo humano depende dos fatores de virulência que esta pode expressar. *Candida* spp. possuem uma grande habilidade de adaptar-se a nichos ambientais distintos e isso permite o estilo de vida dualístico entre comensal e patógeno oportunista. Essa característica está integrada à sua competência na transição morfológica de blastoconídios para hifa, fator de extrema importância na sua patogenicidade. Além disso, outros fatores como a expressão de adesinas e invasinas, a produção de toxinas, como a candidalisina, a secreção de enzimas hidrolíticas, adaptação a

condições ambientais com baixo pH, e a capacidade de formação de biofilmes são cruciais no contexto da CVV (LOPES; LIONAKIS, 2022; CZECHOWICZ et al., 2022; CASSONE, 2014).

### **2.3.1 Transição morfogênica**

A habilidade de *Candida* spp. de modificar sua morfologia da forma de blastoconídeo para hifa e assim romper as barreiras da mucosa é especialmente importante na patogênese da CVV. Comumente encontrado associado ao comensalismo, os blastoconídeos de *Candida* spp. permitem a colonização e disseminação assintomática. Contrariamente, a presença de hifas é especialmente direcionada para a forma invasiva, permitindo que o fungo ultrapasse as barreiras do hospedeiro e acesse tecidos mais profundos. A mudança desses estados morfológicos é mediada por diversos estímulos ambientais, como temperatura do hospedeiro, pH, disponibilidade de nutrientes ou mesmo por *quorum sensing* (LOPES; LIONAKIS, 2022; RODRIGUEZ-CERDEIRA et al., 2020).

A transição de blastoconídeo para hifa é um fator chave na defesa de *C. albicans* do ataque das células fagocíticas do hospedeiro, pois o fagossoma estimula a formação de hifas dos blastoconídeos fagocitados, que podem perfurar os macrófagos, provocando a lise dessas células e a evasão do sistema fagocítico (CAUCHIE et al., 2017). Contudo, deve-se ressaltar que a transição morfogênica de levedura para hifa tem um caráter de maior relevância na patogênese de *C. albicans* que em outras espécies que não possuem essa capacidade de formar pseudo-hifas e hifas verdadeiras, como *C. glabrata*. Apesar disso, *C. glabrata* tem sucesso na capacidade de causar infecções, isso pode indicar que a expressão desse fator de virulência pode não ser um pré-requisito para a patogênese de algumas espécies de *Candida* (LOPES; LIONAKIS, 2022).

### **2.3.2 Adesão, invasão e danos ao tecido do hospedeiro**

A habilidade de aderir a superfícies, sejam elas bióticas, como as mucosas, ou abióticas, como dispositivos médicos, é um fator chave na virulência de *Candida* spp. A adesão de *Candida* spp. ao epitélio vaginal é um processo complexo, multifatorial e dinâmico, que é definido pela relação entre os componentes da parede celular fúngica e as proteínas da superfície do epitélio do hospedeiro. Fatores físico-químicos, como as interações



hidrofóbicas, e a presença de receptores específicos na parede da célula fúngica, chamadas adesinas, são essenciais a esse processo (figura 9) (CZECHOWICZ et al., 2022; RODRIGUEZ-CERDEIRA et al., 2020; RICHARDSON et al., 2018).

Os estágios iniciais do processo de adesão constituem-se pela interação da célula da levedura com a superfície por interações não-específicas, associadas primariamente a sua hidrofobicidade e forças eletrostáticas. A magnitude da adesão depende do micro-organismo, da resposta do hospedeiro à presença deste e da composição e estrutura da superfície. As fases posteriores da adesão estão relacionadas à expressão de adesinas, pela parede celular da levedura. Essa adesão “tardia” ocorre pelo reconhecimento de ligantes específicos na célula epitelial do hospedeiro (fibronectina, colágeno, proteínas complemento etc.) (CZECHOWICZ et al., 2022; RODRIGUEZ-CERDEIRA et al., 2020)

O grupo de adesinas melhor caracterizado é o das Als proteínas (glicoproteínas da superfície celular), codificadas pelo grupo dos genes *ALS* (*agglutinin like-sequence*). Esse grupo compreende oito proteínas ligadas ao glicosilfosfatilinositol (GPI) (Als 1 - Als 7 e Als 9). Particularmente, Als 1 e Als 3 são descritas como cruciais no processo de adesão celular de *C. albicans*, sendo que Als3 exerce função de adesina e invasina (CZECHOWICZ et al., 2022; RODRIGUEZ-CERDEIRA et al., 2020). Uma variedade de genes está relacionada à capacidade de adesão da parede celular do fungo, como o grupo de proteínas Hwp1 (*hyphal wall protein 1*), que constituem a parede celular da forma de hifa e tubos germinativos, sendo também responsável na pela formação de biofilmes. A expressão dos genes *HWPI*, que codificam a proteína Hwp1 é um fator chave para adesão e invasão fúngica no tecido do hospedeiro (CZECHOWICZ et al., 2022; RODRIGUEZ-CERDEIRA et al., 2020). A exclusão de Hwp1 está associada na redução de adesão e da virulência em modelo de candidíase em murinos. A Als3, por sua vez, é uma importante adesina que é regulada positivamente durante a infecção em mucosas e o rompimento do gene *ALS3*, reduz a adesão epitelial *in vitro* (RICHARDSON et al., 2018).

Durante a infecção, a interação entre as células epiteliais e os ligantes da parede celular fúngica ativam o processo da endocitose e penetração ativa de *Candida*. As invasinas podem desencadear o processo de endocitose induzida. As invasinas cruciais para esse processo são Als3p, Ssa1p, que se ligam a E-caderina, receptor epitelial na célula do hospedeiro. A interação recepção-ligante promove o acúmulo e a ativação de proteínas que conduzem o remodelamento do citoesqueleto de actina, e fagocitam o fungo. Outras invasinas são importantes para mediar a penetração ativa das hifas no epitélio das mucosas, como as

Ssap5p e Ssap2p. Essas proteínas degradam a membrana plasmática das células epiteliais das camadas mais superficiais para invasão ao epitélio mais profundo da mucosa. A penetração ativa ocorre em momentos posteriores da 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 (figura 9) (LOPES; LIONAKIS, 2022; RICHARDSON et al., 2018).

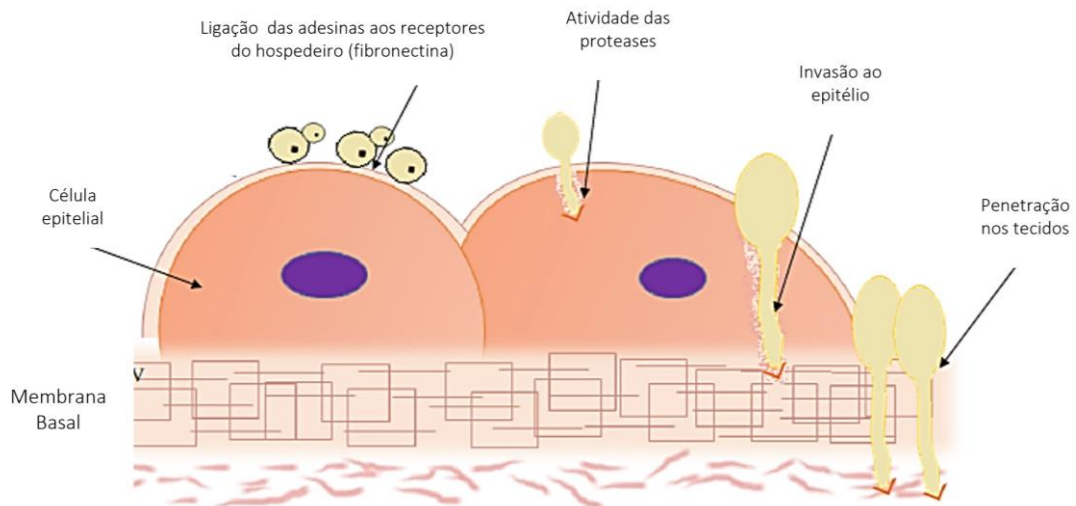
A formação de hifas é acompanhada pela expressão de enzimas hidrolíticas associadas a danos no tecido e ativação do sistema imune (figura 9). Além do mais, a secreção de hidrolases facilita a penetração ativa das hifas no epitélio, ajudando na aquisição de nutrientes extracelulares e digestão de diversas moléculas. Diferentes hidrolases são secretadas por *C. albicans*. Dentre elas estão as proteinases, fosfolipases, lipases e hemolisinas. As aspartil - proteinases (Saps), são uma família de 10 enzimas homólogas, que estão associadas à função de quebrar as proteínas do epitélio do hospedeiro, causando dano tecidual, além de facilitar o desenvolvimento da hifa e modular mudanças na resposta imune, como o recrutamento de neutrófilos de indução de respostas pro-inflamatórias e degradação de proteínas como imunoglobulinas e proteínas do sistema complemento. 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 (LOPES; LIONAKIS, 2022; CZECHOWICZ et al., 2022; RICHARDSON et al., 2018).

As fosfolipases são enzimas que atuam na destruição das membranas celulares do hospedeiro. Elas hidrolisam os fosfolipídios de membranas, contribuindo com a lises das células, causando danos ao tecido e facilitando a penetração das hifas no epitélio. São quatro classes de fosfolipases, A, B, C e D. Espécies de *Candida* não-*albicans* são capazes de produzir quantidades bem maiores de fosfolipases que *C. albicans*. (LOPES; LIONAKIS, 2022; CZECHOWICZ et al., 2022). As lipases estão envolvidas na hidrólise e síntese de triacilgliceróis, que contribui para o aumento da adesão e penetração nos tecidos, bem como a sobrevivência dentro nos macrófagos. As hemolisinas são necessárias na aquisição de ferro e sobrevivência dentro do organismo do hospedeiro (CZECHOWICZ et al., 2022).

A candidalisina (Ece1p) é uma toxina peptídica secretada, recentemente descoberta, que demonstrou ser um fator de virulência de *C. albicans* determinante na CVV. A candidalisina forma estruturas semelhantes a poros ao interagir com as membranas celulares. Os poros causam o influxo de cálcio e estresse oxidativo induzido na célula hospedeira, resultando em morte celular. Além disso, a presença de candidalisina ativa o NLRP3

inflamasoma, essencial na resposta imune relacionada a CVV (LOPES; LIONAKIS, 2022; CZECHOWICZ et al., 2022).

**Figura 9 - Adesão, invasão ao epitélio e penetração nos tecidos por *Candida***



Fonte: adaptado de SARDI et al. (2021).

### 2.3.3 Plasticidade metabólica

Em grande parte dos ambientes, a glicose é a fonte de carbono preferível para *C. albicans*, no entanto, em determinados locais que a levedura coloniza, o crescimento ocorre sob condições limitadas de fonte de glicose. Nessas circunstâncias, *C. albicans* consegue adaptar-se ao ambiente utilizando múltiplas fontes de carbono presentes no hospedeiro e esta capacidade está direcionada à promoção de interações comensais ou patogênicas (LOPES; LIONAKIS, 2022; MIRAMÓN; LORENZ, 2017).

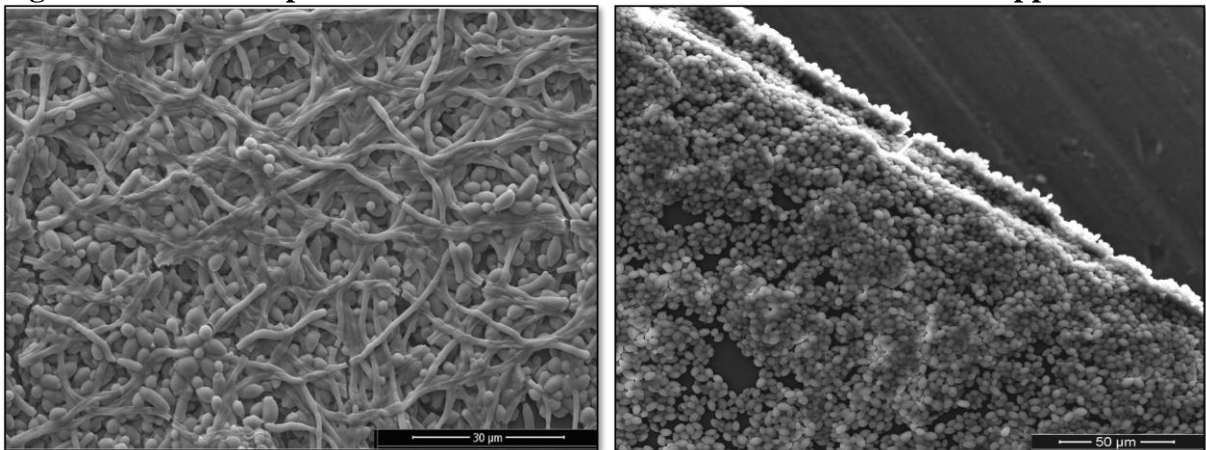
*C. albicans* se prolifera em diversos nichos do hospedeiro, e uma das condições mais importantes que varia entre os ambientes é o pH. Sua capacidade de crescimento varia em pH de 2,0 a 10,0. A levedura já foi isolada de ambientes como mucosa oral (pH 6,0), vaginal (pH 4,5) e estômago (pH 2,0). Além de sua capacidade de proliferação nesses nichos, sabe-se que as infecções por *Candida* spp. na vagina ocorrem mesmo em pH baixo (SHERRINGTON et al., 2017). Sherrington et al. (2017) mostram que o crescimento em locais com pH mais baixo, como o da vagina, promove o remodelamento da parede celular fúngica, expondo mais quitina e beta-glucanos presentes na parede. Isso estimula o reconhecimento do sistema imune inato, favorecendo o estabelecimento de infecções sintomáticas. Por sua vez, Sun et al. (2015)

revelaram a influência do pH no *switching* fenotípico de espécies *Candida* e que a filamentação é estimulada em pH mais próximo ao neutro que em pH mais ácido (SUN et al., 2015; HUANG, 2012).

### 2.3.4 Biofilmes

Agregados celulares semelhantes aos biofilmes têm sido relatados desde Antonie van Leeuwenhoek (1632 – 1723), que observou micróbios aderidos no “espaço entre os dentes” e de “partículas arrancadas da língua” (CONSTERTON, 1978). Consterton (1978) foi o primeiro pesquisador a definir o termo “Biofilmes” para a área médica. Segundo o autor, Biofilme consiste em uma comunidade complexa e estruturada de micro-organismos, envoltos por uma matriz extracelular autoproduzida e aderidos a uma superfície biótica ou abiótica (CONSTERTON, 1978). Ao longo dos anos e do advento de novas técnicas de pesquisa, essa definição foi atualizada. Biofilmes, hoje, são caracterizados como comunidades sesses heterogêneas e dinâmicas, compostas por uma única espécie ou polimicrobianas, altamente organizadas que se aderem a superfícies, e estão envolvidas por matriz extracelular exopolimérica autoproduzida (figura 10) (WALL et al., 2019; TOURNU; VAND DIJCK, 2012). Os componentes dos biofilmes conferem a eles grande capacidade de tolerância aos antimicrobianos e são os maiores responsáveis pela causa de redução da sensibilidade e aumento da propagação da resistência antimicrobiana (MUZNY et al., 2015).

**Figura 10 - Microscopia eletrônica de varredura de biofilmes de *Candida* spp.**



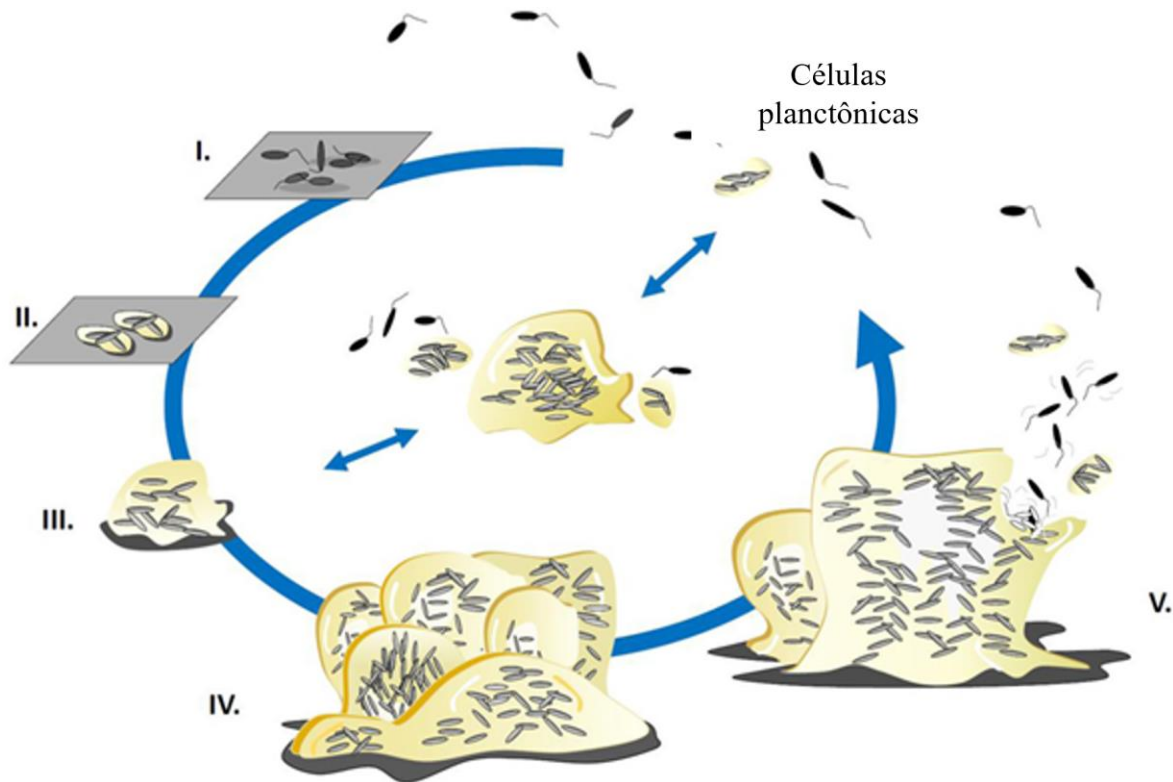
Fonte: A autora (2014).

Nota: À esquerda, biofilme maduro de *C. albicans* formado sobre lâmina de Thermanox®. Aumento:3.500x. À direita, Biofilme maduro de *C. tropicalis* formado sobre lâmina de Thermanox®. Aumento:1.164x

O desenvolvimento dos biofilmes (figura 11) é um processo cíclico que ocorre de forma progressiva e em estágios específicos. A formação deles é iniciada após o contato superficial das células planctônicas individuais a superfícies favoráveis à adesão, bióticas ou abióticas. O primeiro passo é o da adesão reversível, seguido da adesão irreversível, a fase de maturação, e por fim, a dispersão do biofilme (RUMBAUHG; SAUER, 2020).

Na adesão inicial (fig. 11 - etapa I), os micro-organismos se fixam ao substrato e interagem com a superfície de forma instável, por meio de ligações eletrostáticas e hidrofóbicas. A adesão irreversível (fig. 11 - etapa II) é mediada por receptores da superfície celular, como proteínas da parede e adesinas, como as da família Als, em *Candida* spp. As interações intercelulares mediadas por adesinas e proteínas da parede celular levam as células a se agruparem, formando microcolônias. Os aglomerados amadurecem e são incorporados na matriz exopolimérica, que está sendo produzida (fig. 11 - etapa III). Os biofilmes estão totalmente maduros, quando estes aglomerados atingem sua espessura máxima (fig. 11 - etapa IV). O ciclo de vida do biofilme se completa quando se inicia a dispersão. Nesse estágio há a liberação das células das porções internas do biofilme, formando espaços vazios (fig. 11 - etapa V) (RODRIGUEZ-CERDEIRA et al., 2020; RUMBAUHG; SAUER, 2020; ARCIOLA et al., 2018; FLEMING et al., 2016).

**Figura 11 - etapas de desenvolvimento dos biofilmes microbianos**



Fonte: Traduzido de Rumbaugh e Sauer (2020).

Hoje é completamente elucidada a habilidade de *Candida* spp. em formar biofilmes e a maioria das infecções causadas por esse gênero estão associadas à formação de biofilmes em superfícies biológicas ou artificiais (WALL et al., 2019). Inúmeros estudos têm sido realizados com o objetivo de caracterizar a formação de biofilmes e a tolerância aos antifúngicos em isolados provenientes de CVV (RODRIGUEZ-CERDEIRA et al., 2019).

De fato, os biofilmes são altamente resistentes aos antimicrobianos e ao sistema imunológico do hospedeiro por mecanismos que são inerentes à essa forma de vida, em grande parte devido à presença da matriz exopolimérica. Os mecanismos envolvidos na resiliência dos biofilmes são: alta impermeabilidade e impenetrabilidade da matriz; sequestro de antifúngicos; neutralização de neutrófilos e células de defesa do organismo por componentes da matriz; mudanças fisiológicas no microambiente do biofilme, gerando um gradiente de disponibilidade de nutrientes; mudança da expressão de genes relacionados à resistência; super expressão de bombas de efluxo, que remove as moléculas de antimicrobianos do interior das células; a presença de células persistentes (ou dormentes), uma subpopulação das células do biofilme que possuem o fenótipo de sobreviver mesmo

sendo expostas a níveis elevados de concentração de antifúngicos (figura 12) (RODRIGUEZ-CERDEIRA et al., 2019; POLKE; HUBE; JACOBSEN, 2015; MUZNY et al., 2015).

As células persistentes são uma pequena população dentro dos biofilmes fúngicos que expressam um caráter fenotípico distinto das demais células, o que lhes confere alta resistência em elevadas concentrações de antifúngicos e podem, assim, contribuir para a recidivas e recalcitrâncias de infecções causadas por biofilmes. Quando desafiados com altas concentrações de antifúngicos, boa parte da população dos biofilmes não sobrevive, porém parte dessa população permanece viva e, quando reativadas, são capazes de colonizar novos sítios e formar novos biofilmes (WUYTS et al., 2018).

A primeira evidência de células persistentes ocorreu aproximadamente há 80 anos, quando Joseph Bigger demonstrou que algumas células de *Staphylococcus aureus* eram capazes de expressar o fenótipo de resistência a elevadas concentrações de antibióticos. Até os anos 90, as pesquisas eram fortemente direcionadas a elucidar fenômenos da resistência pelas mudanças genóticas nas células, então Harris Moyed abordou novamente a características de células dormentes, que possuem o fenótipo da resistência, porém esse não é hereditável, uma vez que, ao serem reativadas, em sua forma de vida livre, permanecem sensíveis (WAINWRIGHT et al., 2021; WUYTS et al., 2018). Os fenômenos químicos que conduzem o fenótipo dormente das células persistentes ainda não foram completamente elucidados, porém é atribuído, dentre outros, à níveis reduzidos de ATP e a ativação de vias de resposta ao estresse causado por condições ambientais adversas (WAINWRIGHT et al., 2021).

#### 2.3.4.1 Modelos de estudo dos biofilmes

Biofilmes de *Candida* spp. têm sido caracterizados em diversos modelos de estudo. Os métodos abrangem desde modelos *in vitro* até modelos mais complexos de estudos *in vivo*. Os modelos de estudo dos biofilmes contribuem para o entendimento da sua fisiologia, bem como a interação destes com o hospedeiro. Embora distantes de elucidar completamente os diferentes elementos que coordenam estas interações, estudar os biofilmes, especialmente em modelos que mimetizam ou simulam o cenário real da infecção, contribui para o desenvolvimento de estratégias de controle das infecções associadas a eles (CASTELO-BRANCO et al., 2020).





necessitarem de habilidades técnicas especializadas e a regulamentação do uso de animais por comitês de ética (GABRILSKA; RUMBAUGH, 2015; TOURNU; VAN DIJCK, 2012).

Modelos de estudo *in vitro* são fundamentais no entendimento de questões elementares sobre a formação, fisiologia e arquitetura dos biofilmes. Além disso, são amplamente usados no estudo do papel de diversos genes envolvidos na regulação dos biofilmes e mecanismos de tolerância aos antifúngicos (TOURNU; VAN DIJCK, 2012). Esse tipo de modelo propicia diversas vantagens: como baixo custo; possibilidade de realização de testes simultâneos; 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 e não estão sujeitos a regulações legais dos comitês de ética institucionais. Porém, desconsideram parâmetros essenciais como os fatores ambientais, relacionados ao hospedeiro ou mesmo outros elementos bióticos (LEBEAUX et al., 2013).

Estudos de biofilmes *in vitro* podem ser classificados basicamente em três tipos. Nos modelos fechados ou estáticos os nutrientes e aeração são limitados; são os mais utilizados, como os modelos elaborados em placas de microtitulação; permitem a quantificação direta de componentes dos biofilmes como ensaio de biomassa e células viáveis. Nos sistemas abertos ou dinâmicos o meio de cultura e elementos como metabólitos, células dispersas etc. são constantemente substituídos por meio fresco; há controle de parâmetros ambientais e são largamente estudados para avaliar a resistência física e química dos biofilmes; exigem equipamentos e habilidades técnicas especializados. Já os modelos em microcosmos são modelos mais complexos, que objetivam mimetizar as condições *in situ*; incluem diversos tipos microbianos e utilizam o material do ambiente estudado; englobam mais parâmetros ambientais e consideram a heterogeneidade dos ambientes naturais (CASTELO-BRANCO et al., 2020; LEBEAUX et al., 2013; TOURNU; VAN DIJCK, 2012).

Modelos de estudo de biofilmes em microcosmos tem o objetivo que criar um microambiente similar ao do hospedeiro, usando fontes de nutrientes, elementos e superfícies que se aproximem do local da infecção. No uso de modelos em microcosmos representam-se as condições *in situ* em um ambiente de estudo *in vitro*. Esse modelo utiliza amostras provenientes do hospedeiro, como fluidos e espécimes clínicos (CASTELO-BRANCO et al., 2020; LEBEAUX et al., 2013). Biofilmes microcosmos podem ser classificados em naturais, artificiais ou mistos. Os naturais usam os fluidos naturais do indivíduo, que contém microorganismos e elementos químicos característicos do microambiente. Os artificiais são aqueles que contém o meio de cultura que simula as condições orgânicas, mas não utiliza amostras do

sítio de infecção. Já os mistos contêm amostras e fluidos do ambiente a ser estudado, mas usam um meio de cultivo artificial (CASTELO-BRANCO et al., 2020; VERARDI et al., 2016; RUDNEY et al., 2012).

A formação de biofilme de *C. albicans* no epitélio vaginal foi demonstrada pela primeira vez por Harriot e colaboradores (2010) em um estudo *in vivo* utilizando a mucosa vaginal de ratas. Segundo os autores, a formação de biofilmes é um fator crucial no desenvolvimento da CVV (HARRIOTT et al., 2010). Pesquisa recente de Cordeiro et al. (2020) propôs o estudo de biofilmes de *Candida* spp. em modelo microcosmos para aprofundar o conhecimento da CVV, mostrando que esse modelo é adequado ao estudo em sítios anatômicos com microbiota complexa, como o ambiente vaginal. Estudos associados à formação de biofilmes a partir de microcosmos vaginais podem fornecer informações valiosas relacionadas ao ambiente *in vivo* durante o processo infeccioso (CORDEIRO et al., 2020).

### 3. HIPÓTESES

1. Biofilmes de *C. albicans* em modelo microcosmos apresentam número de células viáveis e biomassa distintos dos biofilmes monoespécie produzidos pelo mesmo isolado de *C. albicans* cultivados em meio simulador de fluido vaginal e RPMI 1640;

2. Os biofilmes de *C. albicans* em modelo microcosmos são mais sensíveis à modulação de progesterona e  $\beta$ -estradiol, quando comparados aos biofilmes monoespécie produzidos pelo mesmo isolado de *C. albicans* cultivados em meio simulador de fluido vaginal e RPMI 1640;

3. Biofilmes de *Candida* spp. em modelo microcosmos são capazes de produzir células persistentes. A exposição dos biofilmes microcosmos aos hormônios progesterona e  $\beta$ -estradiol aumenta a produção de células persistentes;

4. Células planctônicas e biofilmes de *C. albicans* cultivados em meio simulador de fluido vaginal apresentam-se mais tolerantes à ação dos antifúngos que as células cultivadas em meio RPMI 1640. A exposição de células planctônicas e biofilmes de *C. albicans* aos hormônios progesterona e  $\beta$ -estradiol aumenta a tolerância aos antifúngicos.

#### 4. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência de progesterona e  $\beta$ -estradiol no número de células viáveis, biomassa e produção de células persistentes em biofilmes de *Candida* spp. em modelo microcosmo e compará-la aos seus respectivos biofilmes monoespécie cultivados em meio simulador de fluido vaginal e RPMI 1640. Além de verificar o efeito de progesterona e  $\beta$ -estradiol sobre perfil de sensibilidade de isolados de *C. albicans* cultivados em meio simulador de fluido vaginal e RPMI 1640.

#### 5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar se há diferença na produção de células viáveis e biomassa dos biofilmes de *Candida* spp. em microcosmos em comparação aos seus respectivos biofilmes monoespécie cultivados em meio simulador de fluido vaginal e RPMI 1640;
2. Investigar se há mudança na produção de células viáveis e biomassa dos biofilmes de *Candida* spp. em microcosmos na presença de progesterona e  $\beta$ -estradiol e comparar com seus respectivos biofilmes monoespécie cultivados em meio simulador de fluido vaginal e RPMI 1640;
3. Avaliar a capacidade de produção de células persistentes em biofilmes de *Candida* spp. em microcosmos (formados a partir de amostra clínica de pacientes com candidíase vulvovaginal) e monoespécie (formados com isolados clínicos de *Candida* spp. oriundos de candidíase vulvovaginal) cultivados em meio simulador de fluido vaginal e RPMI 1640;
4. Avaliar o efeito da exposição à progesterona e  $\beta$ -estradiol na produção de células persistentes dos biofilmes de *Candida* spp. em microcosmos e monoespécie cultivados em meio simulador de fluido vaginal e RPMI 1640;
5. Verificar o perfil de sensibilidade planctônica de *C. albicans* oriundas de CVV cultivadas em meio simulador de fluido vaginal e RPMI 1640 frente aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, itraconazol, voriconazol, tioconazol, clotrimazol, miconazol e nistatina;
6. Verificar o perfil de sensibilidade de células planctônicas e biofilmes monoespécie de *C. albicans* cultivados em meio simulador de fluido vaginal e RPMI 1640 na presença progesterona e  $\beta$ -estradiol frente aos antifúngicos fluconazol e clotrimazol.

## 6. MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 População de Estudo

Foram incluídas no estudo mulheres entre 18 e 55 anos, com quadros clínicos sugestivos de vulvovaginites por *Candida* spp. apresentando sinais ou sintomas como prurido, e/ou corrimento, e/ou dispareunia, e/ou vulvite (SOBEL, 1998; SOBEL, 2007), atendidas no Instituto de Prevenção do Câncer do Estado do Ceará, Brasil. Foram excluídas do estudo gestantes, pacientes com doenças autoimunes, pacientes com diabetes, que tenham feito uso de antimicrobianos há pelo menos três meses, ou em uso de corticoides. As voluntárias que aceitaram participar da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A). 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.

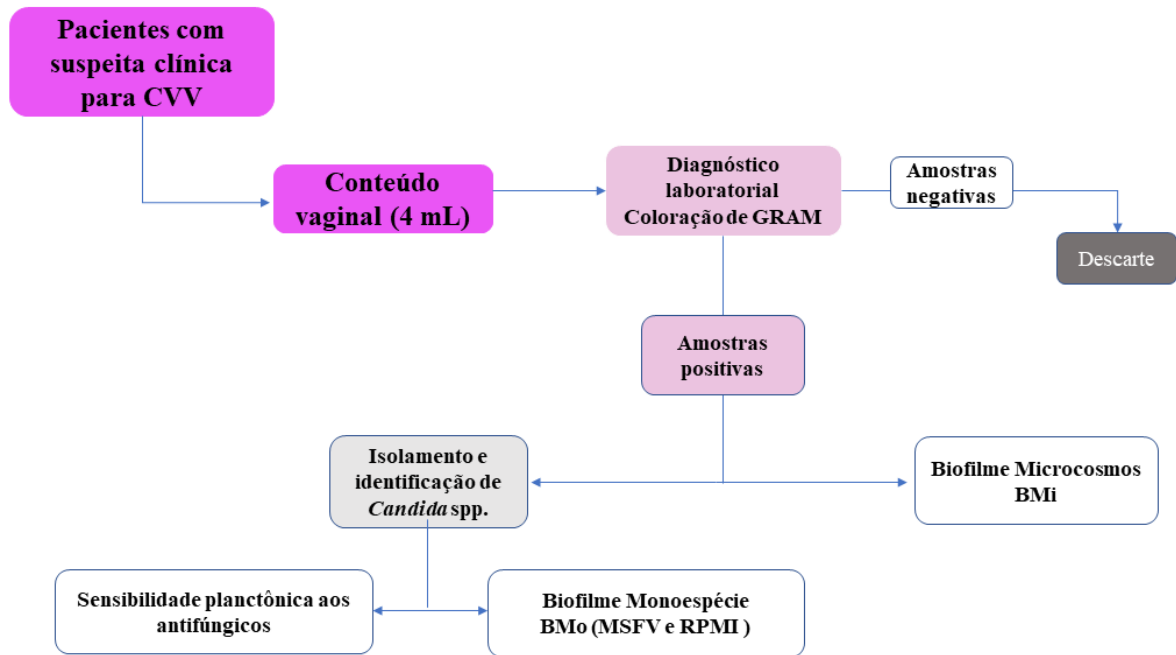
### 6.2 Colheita e processamento de amostras

O conteúdo vaginal foi colhido das paredes e fórnice vaginal da paciente, com escova ginecológica estéril pelo profissional enfermeiro no atendimento ambulatorial. O material foi armazenado em 4 mL de salina tamponada estéril pH 7,4 (PBS), a 28 °C por até 2h e transportado ao laboratório. A confirmação laboratorial de candidíase foi realizada por teste duplo cego, com dois observadores independentes, por meio da visualização de 20 campos distintos de esfregaços corados pela coloração de Gram. As amostras foram consideradas positivas quando permitiram observar a presença de blastoconídios; pseudo-hifas e/ou hifas sugestivas de *Candida* spp., livres ou aderidas às células epiteliais. O volume de um microlitro da amostra vaginal foi então semeado com alça calibrada estéril em meio cromogênico diferencial ChromAgar *Candida* (BD Diagnostic Systems-França) para a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/ $\mu$ L) provenientes de cada amostra.

A partir das amostras positivas, foram realizados os testes para formação de biofilmes em modelo microcosmos (BMi). A partir do isolamento de *Candida* spp. foram realizados os testes de formação dos biofilmes monoespécie (BMo) e testes de sensibilidade aos

antifúngicos. A figura 13 mostra o fluxograma de processamento das amostras e definição das aplicações experimentais dadas a partir delas.

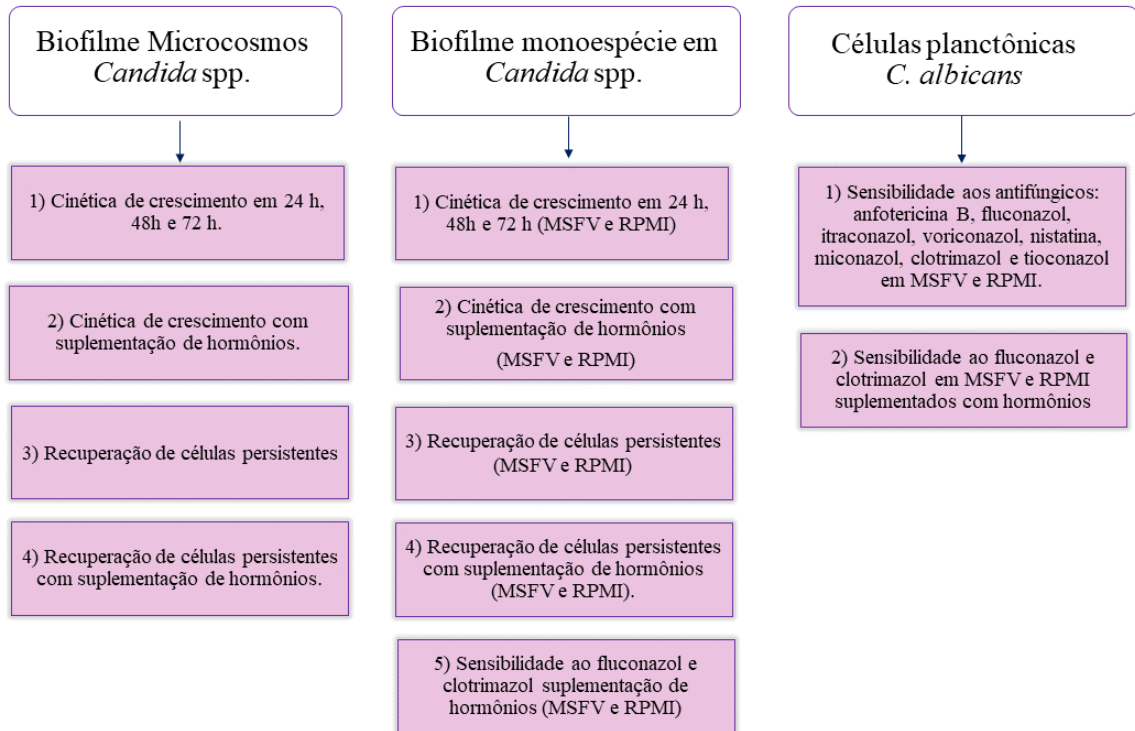
**Figura 13 - Fluxograma do processamento e destinação das amostras colhidas para o estudo.**



### 6.3 Desenho experimental

A partir da colheita, as amostras positivas para *Candida* spp. foram processadas, identificadas e testadas seguindo o desenho experimental abaixo (figura 14). Os biofilmes em modelos microcosmos de *C. albicans* (BMi) foram testados quanto à cinética de crescimento e produção de células persistentes, com e sem suplementação de hormônios. Os biofilmes monoespécie (BMo) correspondentes foram testados quanto à cinética de crescimento e produção de células persistentes - com e sem suplementação de hormônios - além da sensibilidade ao fluconazol e clotrimazol. As células planctônicas de *C. albicans* foram avaliadas quanto ao seu perfil de sensibilidade aos antifúngicos em meio simulador de fluido vaginal e RPMI 1640, com e sem suplementação hormonal.

**Figura 14 - 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.**



#### 6.4 Isolamento e identificação 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., bem como a formação de biofilme microcosmos e posterior formação de biofilme monoespécie.

A identificação presuntiva das amostras foi realizada por meio da análise macromorfológica das colônias após crescimento por 72 h a 35 °C em ChromAgar *Candida* (BD Diagnostic Systems-França). A identificação definitiva foi realizada por meio de análise proteômica com *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* MALDI-TOF (Autoflex III, Bruker Daltonics Inc., USA / Germany). Para isso, uma alíquota de 10<sup>6</sup> células/ mL foi transferida para 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 em MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics Inc., EUA / Alemanha). Os espectros obtidos no equipamento 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  $\geq 2$  (LIMANETO et al., 2014).

### **6.5 Formação de biofilmes de *Candida* spp. em microcosmos (BMi)**

Para a formação do biofilme microcosmos, 60  $\mu\text{L}$  da amostra clínica foi adicionada em microplaca de 96 poços juntamente com o mesmo volume de Meio Simulador de Fluido Vaginal – MSFV (adaptado de Tomás e Nader-Macías, 2007). Em seguida, foi incubado por até 72h, a 35 °C, sob atmosfera de microaerofilia. Para gerar a atmosfera de microaerofilia foi utilizada jarra reguladora de atmosfera com vela. A cada 24 horas, as células não aderidas foram aspiradas e os poços repletos com 200  $\mu\text{L}$  do MSFV (CORDEIRO et al., 2020). Os biofilmes de *Candida* spp. foram analisados quanto à contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) e biomassa, durante os períodos de 24 h, 48 h e 72 h.

Para a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL), após os períodos de incubação de 24h, 48h e 72h, os sobrenadantes foram aspirados, desprezados e os poços repletos com 200  $\mu\text{L}$  de PBS estéril. Os biofilmes foram raspados com ponteira estéril, ressuspensos em PBS e homogeneizados em vórtex por 30 segundos. Foram feitas diluições seriadas em NaCl (0,9%) estéril na proporção de 1:10 até a diluição  $10^{-3}$ . Posteriormente, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram semeadas, por espalhamento, em placas de petri contendo Ágar Sabouraud com Cloranfenicol (KASVI, Itália) em duplicata. As placas foram incubadas por 48 h a 35 °C (CORDEIRO et al., 2015).

A análise da biomassa dos biofilmes, após os períodos de incubação de 24 h, 48 h e 72 h, 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. Posteriormente, os biofilmes foram descorados com ácido acético a 33%, o sobrenadante foi transferido para outra placa de 96 poços de fundo chato e analisado colorimetricamente, por espectrofotômetro, no comprimento de onda de 590 nm, em duplicata (PEETERS et al., 2008).



## 6.6 Formação de biofilmes monoespécie (BMo) de *Candida* spp. em meios MSFV e RPMI 1640

Após o isolamento e a identificação de *Candida* spp. a partir das amostras positivas ao exame laboratorial, os BMo foram formados com um inóculo inicial de 1 a  $2,5 \times 10^6$  células/mL em PBS (pH 7,4) (SHERRY et al., 2017). Igualmente ao BMi, 60  $\mu$ L do inóculo formado foi adicionado em microplaca de 96 poços juntamente com o mesmo volume de meio de cultivo, MSFV (pH 4,2 - 4,5) ou RPMI 1640 tamponado com MOPS (pH 7,0). Os cultivos foram mantidos a 35 °C até 72 horas sob atmosfera de microaerofilia. Para gerar a atmosfera de microaerofilia foi utilizada jarra reguladora de atmosfera com vela. A cada 24 horas, as células não aderidas foram aspiradas e os poços preenchidos novamente com 200  $\mu$ L do meio de cultivo (CORDEIRO et al., 2020). Os biofilmes de *Candida* spp. foram analisados quanto a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) e biomassa, nos períodos de 24 h, 48 h e 72 h.

Para a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL), após os períodos de incubação de 24 h, 48 h e 72 h, os sobrenadantes foram aspirados, desprezados e os poços repleenidos com 200  $\mu$ L de PBS estéril. Os biofilmes foram raspados com ponteira estéril, ressuspendidos em PBS e homogeneizados em vórtex por 30 segundos. Foram feitas diluições seriadas em NaCl (0,9%) estéril na proporção de 1:10 até a diluição  $10^{-4}$ . Posteriormente, alíquotas de 100  $\mu$ L foram semeadas, por espalhamento, em placas Ágar Dextrose Batata (KASVI, Itália), em duplicata. As placas foram incubadas por 48 h a 35 °C (CORDEIRO et al., 2015).

A biomassa do biofilme, após os períodos de incubação de 24 h, 48 h e 72 h, 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. Após, foram descorados com ácido acético a 33%. A análise foi realizada colorimetricamente, em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 590 nm, em duplicata (PEETERS et al., 2008).

### **6.7 Efeito dos hormônios progesterona e $\beta$ -estradiol sobre os biofilmes de *Candida* spp. em BMi e BMo**

O estudo foi conduzido utilizando a maior concentração hormonal encontrada no ciclo menstrual feminino: Progesterona [P2, 7.5  $\mu\text{g/L}$ ] e  $\beta$ -estradiol [E4, 700 ng/L] (GONÇALVES et al., 2020; GONÇALVES et al., 2019). Para tanto, os hormônios foram diluídos em etanol PA na concentração de 10mM e então, diluídos novamente em água miliQ estéril até a concentração de trabalho (KINSMAN et al., 1988). Para a formação dos biofilmes, foram avaliadas as seguintes condições de cultivo: Meio de cultivo + P2; Meio de cultivo + E4; e Meio de cultivo + P2 + E4. Os hormônios foram acrescentados aos meios de cultivo desde o início da formação dos biofilmes e então, os biofilmes foram cultivados como descrito acima (itens 6.5 e 6.6). Os cultivos foram mantidos a 35 °C por até 72 h sob atmosfera de microaerofilia. A cada 24 horas, as células não aderidas foram aspiradas e os poços repletos com 200  $\mu\text{L}$  do meio de cultivo. A cada tempo foram avaliadas a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) de *Candida* spp., e quantificação de biomassa, como descrito anteriormente.

### **6.8 Recuperação de células persistentes a partir de biofilmes de *Candida* spp. em BMi e BMo**

Os biofilmes foram cultivados como descrito anteriormente (itens 6.5 e 6.6). Os cultivos foram mantidos a 35 °C por até 72 h sob atmosfera de microaerofilia. A cada 24 horas, as células não aderidas foram aspiradas e os poços repletos com 200  $\mu\text{L}$  do meio de crescimento. Após o tempo de maturação dos biofilmes, anfotericina B (AMB) na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  foi acrescentada aos poços e incubados por mais 24 horas nas mesmas condições descritas acima (LAFLEUR, 2006). Nos poços de controle de crescimento, apenas houve a troca do meio de cultivo e nova incubação por mais 24 horas.

Após o período de ação da droga, os sobrenadantes foram aspirados, desprezados e os poços preenchidos com 200  $\mu\text{L}$  de PBS estéril. Os biofilmes foram raspados vigorosamente com ponteira estéril, ressuspendidos e homogeneizados por agitação intensa em vórtex por 1 minuto. Quando necessário, foram feitas diluições seriadas em NaCl (0,9%) estéril na proporção de 1:10 até a diluição  $10^{-2}$ . Posteriormente, alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  foram semeadas, por espalhamento, em placas com Ágar Sabouraud com Cloranfenicol para os biofilmes BMi

e Ágar Dextrose Batata para biofilmes BMo, em duplicata. As placas foram incubadas por 48h a 35 °C e então as colônias crescidas foram contadas (CORDEIRO et al., 2015).

### **6.9 Efeito dos hormônios progesterona e $\beta$ -estradiol na recuperação de células persistentes a partir de BMi e BMo de *Candida* spp.**

BMi e BMo, em MSFV e RPMI 1640, foram cultivados na presença dos hormônios Progesterona [P2, 7.5  $\mu\text{g/L}$ ] e  $\beta$ -estradiol [E4, 700 ng/L] desde o início da formação dos biofilmes, como descrito no item 6.7. Foram avaliadas as seguintes condições de cultivo: Meio de cultivo + P2; Meio de cultivo + E4; e Meio de cultivo + P2 + E4. Após o tempo de maturação dos biofilmes, anfotericina B (AMB) na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  foi acrescida, e os poços incubados por mais 24 horas nas mesmas condições descritas anteriormente (LAFLEUR, 2006). Nos poços de controle de crescimento, apenas houve a troca do meio de cultivo e nova incubação por mais 24 horas.

A análise da quantidade de células persistentes recuperadas após o tratamento com AMB [100  $\mu\text{g/mL}$ ] ocorreu conforme descrito no item 6.10

### **6.10 Sensibilidade planctônica de *Candida albicans* isoladas das secreções vaginais em MSFV e RPMI 1640.**

Na primeira parte, foi estabelecido o perfil de sensibilidade em crescimento planctônico em 25 cepas de *C. albicans* oriundas de pacientes com CVV e isoladas previamente a este estudo. O teste foi feito pela técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as diretrizes do documento (M27-A3) do *Clinical & Laboratory Standards Institute - CLSI* (2008) nos meios RPMI 1640 1640, tamponado com 0,165 M de MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS; Sigma Chemical Co., EUA) a pH 7,0) e Meio Simulador de Fluido Vaginal (MSFV) (pH 4.2-4.5) adaptado de Tomás e Nader-Macías (2007). (ANEXO A)

A sensibilidade antifúngica foi avaliada para as drogas anfotericina B (AMB; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), fluconazol (FLC; Merck KGaA, Darmstadt, Germany), voriconazol (VRC; Sigma Chemical Co; St. Louis, MO, EUA), itraconazol (ITC; Merck

KGaA, Darmstadt, Germany), tioconazol (TIC; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), clotrimazol (CLO; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), miconazol (MIC; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) e nistatina (NIS; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). As concentrações testadas para cada droga foram 0,125-64 µg/mL para fluconazol e 0,0313- 16 µg/mL para as demais drogas.

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) de AMB e NIS foram definidas como as menores concentrações capazes de inibir 100% do crescimento, quando comparado ao controle livre de drogas. Para as demais drogas, as CIMs foram definidas como as menores concentrações capazes de inibir 50% do crescimento quando comparado ao controle livre de drogas. Para os cultivos feito em RPMI 1640, a leitura das CIMs realizou-se após o período de 24 horas. Para cultivos feitos em MSFV, a leitura realizou-se após o período de 48 horas. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e cepa padrão *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi incluída como controle de qualidade para cada teste.

Com o objetivo de comparar os resultados encontrados a partir da leitura visual da sensibilidade em meio simulador de fluido vaginal (MSFV), realizou-se a contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) no poço da CIM, e seus poços imediatamente posteriores e anteriores. Esse teste foi realizado com duas drogas: AMB e FLC, nas concentrações já descritas anteriormente, e três isolados de *C. albicans*. Para isso, após o período de cultivo, 100 µL do volume do poço foi transferido para microtubos contendo 900 µL de NaCl (0,9%) estéril e foi realizada a diluição seriada na proporção de 1:10 até a diluição  $10^{-3}$ . Após, alíquotas de 100 µL foram semeadas, por espalhamento, em placas de petri contendo Ágar Dextrose Batata (KASVI, Itália), em duplicata. As placas foram incubadas por 48h a 35 °C. Posteriormente, foi feita a contagem das unidades formadoras de colônia (CORDEIRO et al., 2015).

### **6.11 Efeito dos hormônios progesterona e β-estradiol na sensibilidade planctônica de *Candida albicans* em MSFV e RPMI 1640**

A segunda parte foi realizada com objetivo de verificar a influência dos hormônios progesterona β-estradiol na sensibilidade aos antifúngicos fluconazol (FLC) e clotrimazol (CLO) em meios MSFV e RPMI 1640. O estudo foi conduzido utilizando a maior concentração hormonal encontrada no ciclo menstrual feminino: Progesterona [P2, 7.5 µg/L]

e  $\beta$ -estradiol [E4, 700 ng/L] (GONÇALVES et al., 2019; GONÇALVES et al., 2020). Para tanto, os hormônios foram diluídos em etanol PA na concentração de 10mM e então, diluídos novamente em água miliQ estéril até a concentração de trabalho (KINSMAN et al., 1988). Foram avaliadas as seguintes condições de cultivo: Meio de cultivo + P2; Meio de cultivo + E4; e Meio de cultivo + P2 + E4. Os hormônios foram acrescidos aos meios de cultivo e foi realizado o teste de sensibilidade, de acordo com as diretrizes do documento (M27-A3) do *Clinical & Laboratory Standards Institute - CLSI* (2008), como descrito anteriormente.

Quatro isolados de *C. albicans* oriundos de pacientes com CVV foram utilizados nos testes. As concentrações de drogas usadas foram: 0,125-64  $\mu\text{g/mL}$  para FLC e 0,0313- 16  $\mu\text{g/mL}$  para CLO. As CIMs foram definidas como as menores concentrações capazes de inibir 50% do crescimento, quando comparado ao controle livre de drogas. Para o RPMI 1640, leitura das CIMs realizou-se após o período de 24 horas. Para o MSFV, a leitura realizou-se após o período de 48 horas. Todos os ensaios foram realizados em duplicata e cepa padrão *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi incluída como controle de qualidade para cada teste.

#### **6.12 Efeito dos hormônios progesterona e $\beta$ -estradiol na sensibilidade de biofilmes de *Candida albicans* em MSFV e RPMI 1640**

Quatro isolados de *C. albicans* oriundos de pacientes com CVV foram utilizados nos testes para a formação dos biofilmes. Estes foram crescidos como descrito no item 6.8 e 6.9, na presença de hormônios. Os cultivos foram então mantidos a 35 °C por até 72 h sob atmosfera de microaerofilia. A cada 24 horas, as células não aderidas foram aspiradas e os poços repletos com 200  $\mu\text{L}$  do meio de crescimento. Após o período de maturação dos biofilmes, FLC [256  $\mu\text{g/mL}$ ] (KUHN et al., 2002) e CLO [12,5  $\mu\text{g/mL}$ ] (SPITIZER et al., 2018) foram adicionados aos poços e estes foram incubados novamente pelo período de 24 horas. Ao final, os biofilmes de *Candida* spp. foram avaliados quanto à contagem de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) e biomassa, como descrito acima (item 6.8).

### **6.13 Análise Estatística**

Os dados obtidos foram avaliados no teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Sua significância foi calculada por teste T de Student, usando o método de Holm-Sidak, com valores de  $p < 0.05$ . A variância foi examinada por Two-way-anova, seguido pelo teste post-hoc de Tukey. O teste de Kruskal-Wallis (One-way anova) também foi utilizado para o tratamento dos dados não paramétricos. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes. A análise estatística foi realizada com o software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, CA, EUA).

## 7. RESULTADOS

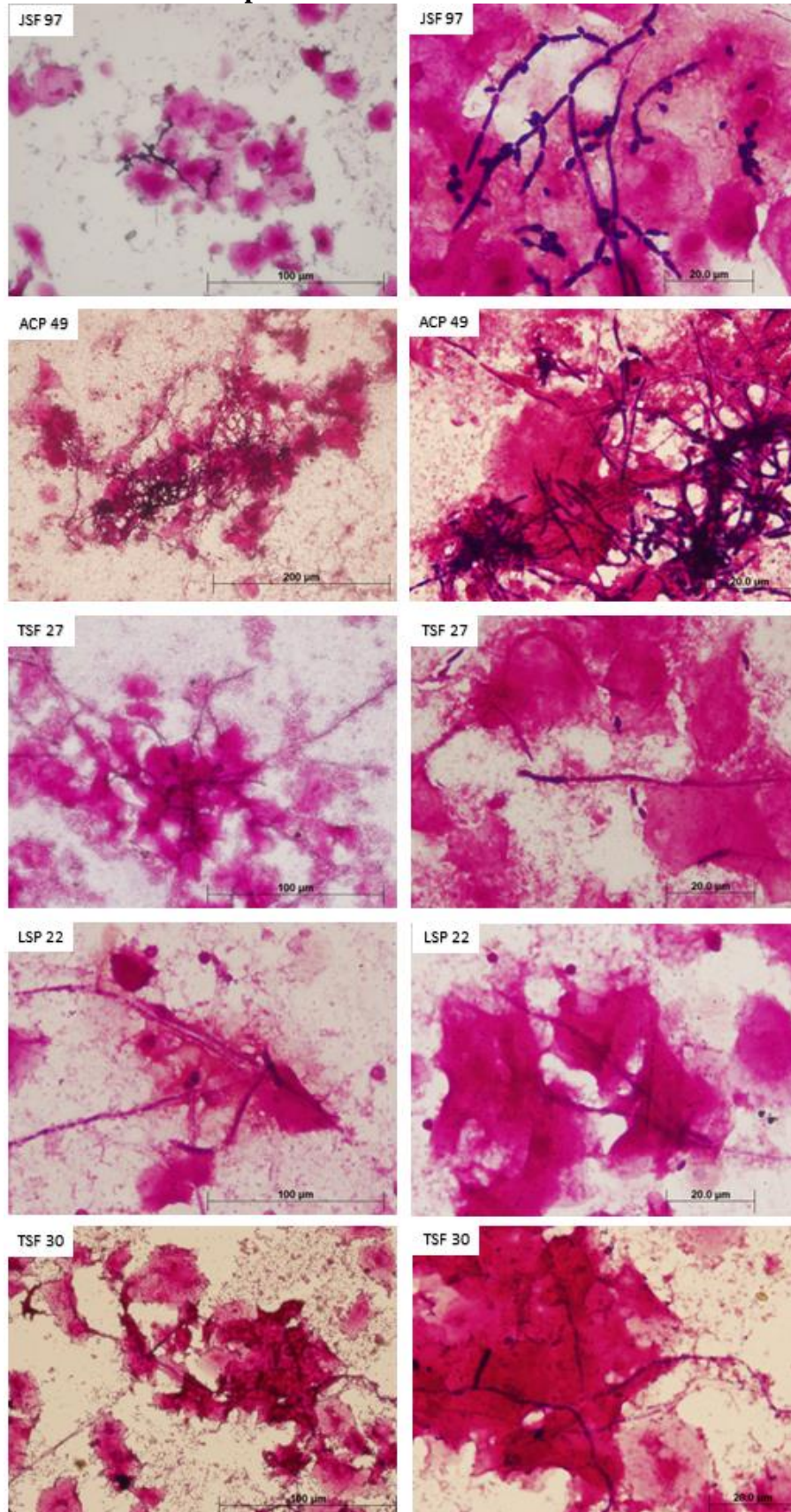
### 7.1 População de Estudo

No período de outubro de 2021 a julho de 2022 foram analisadas 83 amostras clínicas de pacientes que possuíam sinais e/ou sintomas sugestivos de CVV no momento do exame ginecológico. A média de idade das mulheres incluídas no estudo foi de 33,7 anos. Dentre os sinais e sintomas mais relatados, o prurido foi o prevalente (n=25; 30%), seguido de corrimento (n=12; 14,5%).

### 7.2 Colheita e processamento de amostras

Das 83 amostras colhidas, 21 (25,3%) foram positivas ao exame microscópico ao apresentarem 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 polimorfonucleares, sugerindo um processo inflamatório local. Além disso, exibiram crescimento em *ChromAgar Candida*. A figura 15 mostra os esfregaços das amostras de *C. albicans* usadas nos testes de biofilmes microcosmos e monoespécie. *C. albicans* foi o agente prevalente (n = 18; 90% dos isolados), seguido de *C. glabrata* (n = 2; 10%). Na amostra ACP 49 foi verificada a ocorrência de infecção mista (*C. albicans* e *C. glabrata*). De 21 amostras obtidas no processamento, dez delas foram usadas em testes preliminares e onze foram empregadas nos testes descritos no presente trabalho.

**Figura 15 -** Esfregaços provenientes de amostras clínicas de pacientes com CVV visualizadas em lâmina corada pelo método de Gram.



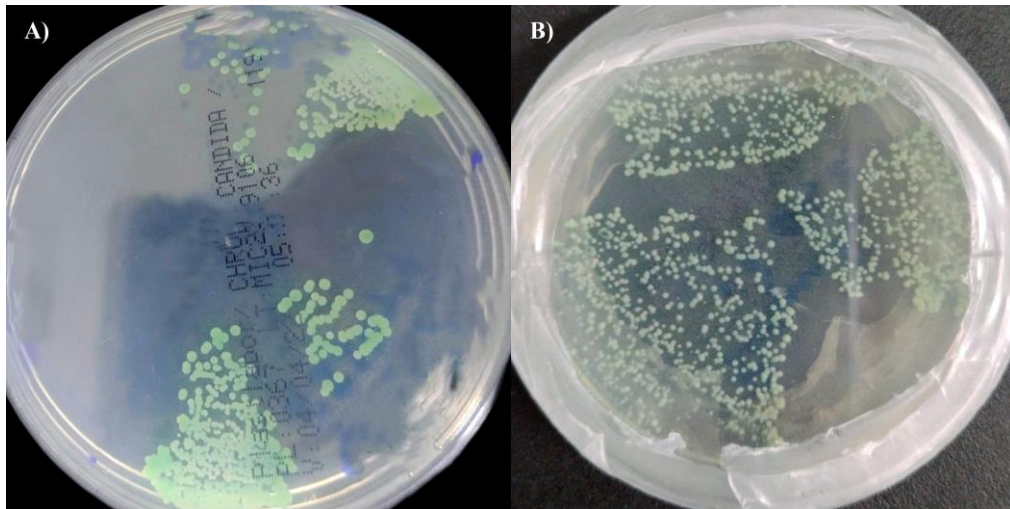
Nota: Visualização em aumento de 400x (à esquerda) e 1000x (à direita), em microscópio óptico.



### 7.3 Isolamento e identificação de *Candida* spp.

A identificação presuntiva das cepas foi realizada por crescimento em ágar cromogênico *ChromAgar Candida* (BD Diagnostic Systems-França). As colônias de *C. albicans* apresentaram-se esverdeadas. Já as colônias de *C. glabrata* apresentaram-se com colônias rosa claro a médio (figura 16).

**Figura 16 - Crescimento de *C. albicans* em meio cromogênico *Chromagar Candida*. As colônias exibiram a cor esverdeada após 48h de incubação, a 35 °C.**



Nota: A) verso das colônias. B) reverso das colônias.

A identificação definitiva das cepas de *Candida* isoladas das amostras foi feita por *proteomic analysis by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry* (Tabela 1). Cada inóculo iniciador oriundo de pacientes sintomáticas para CVV apresentou diferentes densidades de *Candida* spp., entre 31 e >300 UFC/ $\mu$ L, como revelado pela contagem do número de UFC/ $\mu$ L em *ChromAgar Candida* (Tabela 1).

**Tabela 1 - Identificação proteômica das cepas a partir das amostras colhidas de pacientes com CVV e contagem do número de células fúngicas (UFC/ $\mu$ L) em cada amostra empregada nos testes descritos neste trabalho.**

AMOSTRA	Espécie	CFU/ $\mu$ L
JSF 97	<i>Candida albicans</i>	>300
ACP 49	<i>Candida albicans</i> <i>Candida glabrata</i>	>300
TSF 27	<i>Candida albicans</i>	>300
LSP 22	<i>Candida albicans</i>	31
TSF 30	<i>Candida albicans</i>	39
2311	<i>Candida albicans</i>	>300
1 FOSS	<i>Candida albicans</i>	113
MRC 51	<i>Candida albicans</i>	108
CCF 80	<i>Candida albicans</i>	208
RSS 47	<i>Candida glabrata</i>	>300
MID 37	<i>Candida glabrata</i>	>300

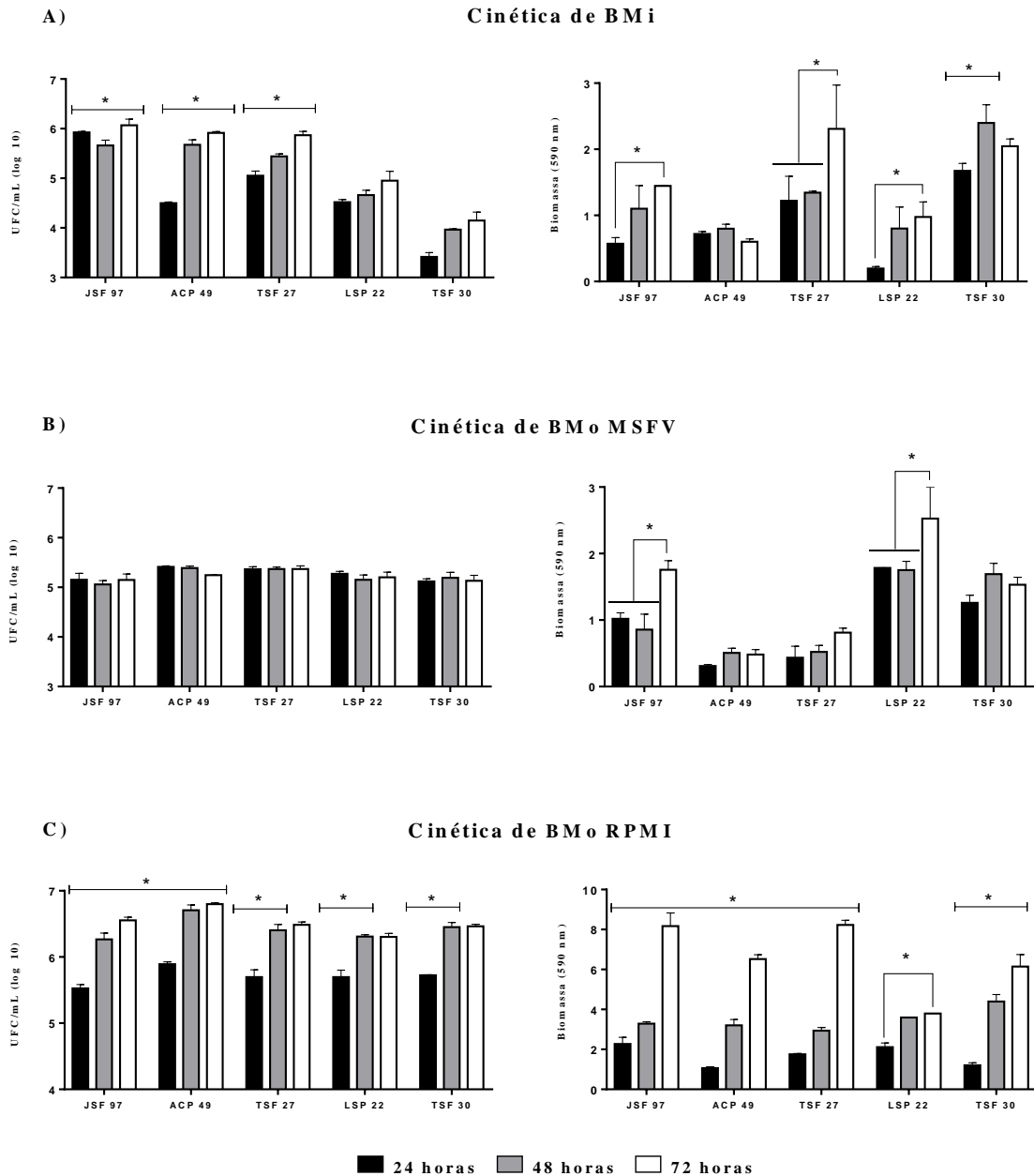
#### 7.4 Formação de biofilmes de *Candida* spp. em microcosmos (BMi) e monoespécie (BMo) em MSFV e RPMI 1640

Os resultados a seguir mostram o crescimento dos biofilmes BMi formados em MSFV e BMo formados em MSFV e RPMI 1640 (Figura 18). Foram analisadas as unidades formadoras de colônia (UFC/mL) e quantificação de biomassa ao longo do desenvolvimento dos biofilmes, nos períodos de 24 h, 48 h e 72 h. Nos biofilmes em modelo microcosmos (BMi) (figura 18A) observou-se um crescimento exponencial no número de células a partir do inóculo iniciador (vide tabela 1 – amostras JSF 97, ACP 49, TSF 27, LSP 22 e TSF 30) para a quantidade de UFC/mL observada em 24 horas de crescimento do biofilme (entre  $10^4$  e  $10^6$  células). Ainda, houve aumento significativo no número células ao longo do desenvolvimento do biofilme em 3/5 amostras (JSF 97, ACP 49, TSF 27). Quanto à biomassa, observou-se uma variação amostra-dependente. Em 3/5 amostras (JSF 97, LSP 22, TSF 30) houve aumento da biomassa entre 24 h e 48 h, mas não se observou nos tempos de 48 h para 72 h. Apenas na amostra TSF 27 houve aumento de biomassa dos períodos de 48 para 72 h e em ACP 49 não houve diferença estatisticamente significativa entre os tempos de cultivo.

Quanto aos resultados obtidos em biofilme modelo monoespécie cultivados em MSFV (BMo-MSFV) (figura 18B), observou-se que o número de células viáveis manteve-se constante ao longo do desenvolvimento do biofilme. Em relação à quantificação de biomassa, houve aumento significativo da biomassa no tempo de 72 h apenas em 2/5 cepas (JSF 97 e LSP 22). Nas outras três cepas testadas não foram observadas diferenças significativas.

Já em biofilme monoespécie cultivado em RPMI 1640 (BMo-RPMI 1640) (figura 18C) houve aumento significativo de UFC/mL ao longo do desenvolvimento do biofilme em 2/5 cepas (JSF 97 e ACP 49). No restante (TSF 27, LSP 22 e TSF 30), o aumento foi observado apenas entre 24 h e 48 h de crescimento. Em 4/ 5 cepas (JSF 97, ACP 49, TSF 27 e TSF 30) houve aumento significativo da biomassa ao longo dos períodos avaliados. Apenas em LSP 22 não houve aumento entre os períodos de 48 h e 72 h.

**Figura 17 - Desenvolvimento dos biofilmes de *Candida* spp. em microcosmos (BMi) e monoespécie (BMo – MSFV e BMO – RPMI 1640) ao longo dos tempos de 24 h, 48 h e 72 h.**



Legenda: Em A, resultados expressos em UFC/mL e biomassa expressa em absorbância (590 nm) para os biofilmes microcosmos (BMi). Em B, resultados expressos em UFC/mL e biomassa expressa em absorbância (590 nm) para os biofilmes monoespécie (BMo) cultivados em MSFV. Em C, resultados expressos em UFC/mL e biomassa expressa em absorbância (590 nm) para os biofilmes monoespécie (BMo) cultivados em RPMI 1640. Barras pretas representam os biofilmes no tempo de 24 horas. Barras cinza claro representam biofilmes no período de 48 horas. Barras brancas representam biofilmes em 72 horas. \* diferenças estatisticamente significativa quando comparadas entre si. ( $p < 0.05$ ).

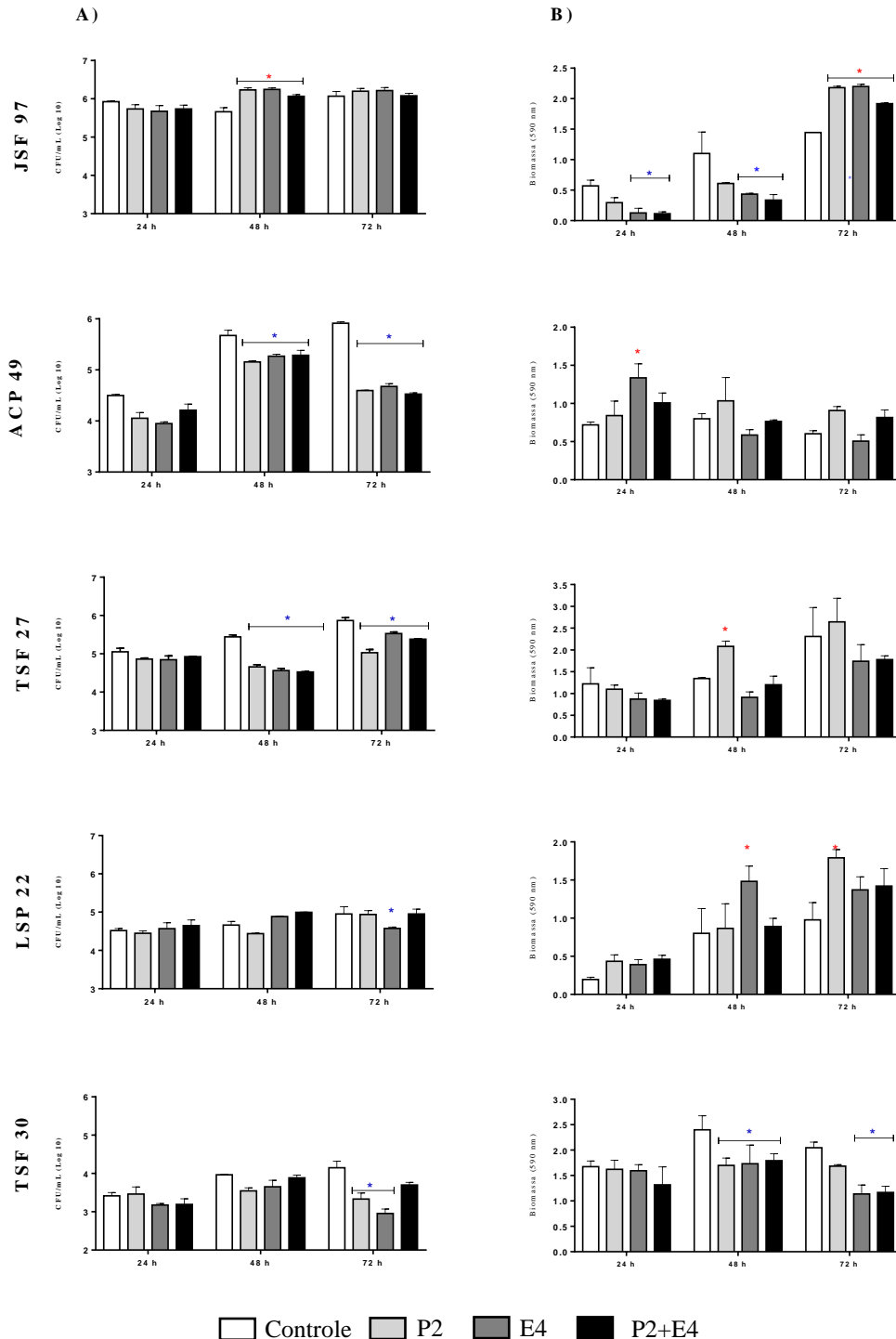
### **7.5 Efeito dos hormônios progesterona e $\beta$ -estradiol sobre os de biofilmes de *Candida* spp. em microcosmos (BMi) e monoespécie (BMo)**

Essa fase do estudo foi conduzida com o objetivo de observar a cinética de crescimento dos biofilmes BMi formados em MSFV e BMo formados em MSFV e RPMI 1640 suplementados com os hormônios esteroides femininos (HE) Progesterona [P2, 7.5  $\mu\text{g/L}$ ] e  $\beta$ -estradiol [E4,700 ng/L], nas concentrações fisiológicas, em cinco amostras escolhidas aleatoriamente. Os dados mostraram que a produção de células viáveis e biomassa nos modelos testados sofre influência dos hormônios desde as fases iniciais de formação dos biofilmes, sendo essa resposta dependente de cada cepa.

Em BMi, observou-se que a exposição aos HE não influenciou no número de UFC/mL na fase inicial dos biofilmes (24 horas). Contudo, a partir de 48 horas, P2, E4 e P2+E4 reduziram o número de UFC/mL, quando comparados aos seus controles sem a exposição aos hormônios. Em 4/5 amostras testadas (ACP 49, TSF 27, LSP 22 e TSF 30) houve menor número de UFC em BMi formados com hormônios, em comparação com os seus correlatos sem hormônios ao longo dos períodos de 48 h e 72 h de cultivo. Apenas a amostra JSF 97 mostrou aumento do número de células viáveis em BMi (48 h) cultivados na presença de hormônios (figura 19A).

Quanto à quantificação da biomassa em BMi (figura 19B), em 4/5 amostras testadas (JSF 97, ACP 49, TSF 27 e LSP 22), houve aumento de biomassa em ao menos uma das condições de adição de hormônios, e este ocorreu principalmente a partir de 48 horas de cultivo. Contrariamente, na amostra JSF 97 os HE agiram reduzindo a biomassa dos biofilmes em 24 h e 48 h de cultivo, mas em 72 h observou-se aumento, nas três condições com suplementação de hormônios. A amostra TSF 30 mostrou redução na biomassa de BMi cultivado com hormônios após 48 h de incubação. Assim, infere-se que os hormônios podem reduzir a produção de células viáveis e aumentar a quantificação de biomassa em BMi, principalmente em biofilmes maduros, quando comparados aos seus respectivos controles crescidos livres de hormônios.

**Figura 18 - Efeito da adição de hormônios esteroides Progesterona [P2, 7.5 µg/L] e β-estradiol [E4,700 ng/L] na produção de células viáveis e biomassa ao longo do desenvolvimento de biofilmes de *Candida* spp. em BMI.**

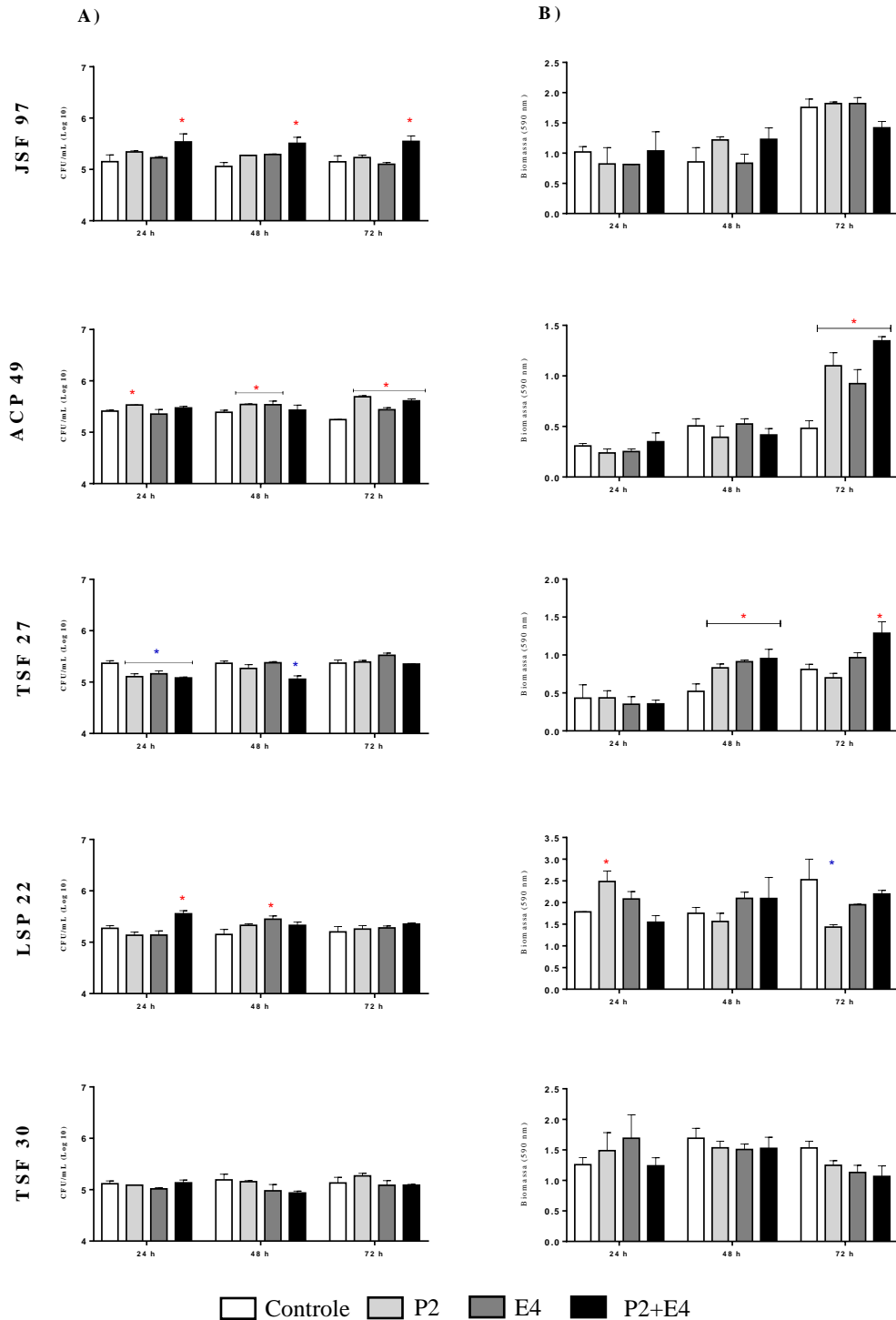


Legenda: Em A, número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Em B, quantificação de biomassa (590 nm). Barras brancas representam o controle de crescimento dos biofilmes sem a adição de hormônios esteroides. Barras cinza claro representam biofilmes adicionados de P2. Barras cinza escuro representam biofilmes adicionados de E4. Barras pretas representam biofilmes adicionados de P2+E4. \* condições em que houve redução estatisticamente significativa quando comparadas aos seus respectivos controles de crescimento. \* condições em que houve aumento estatisticamente significativo quando comparadas aos seus respectivos controles de crescimento. ( $p < 0.05$ ).

Contrariamente ao observado em BMi, em BMo MSFV os hormônios foram capazes de estimular a produção de células viáveis desde os estágios iniciais de formação dos biofilmes em 3/5 cepas avaliadas (JSF 97, ACP 49 e LSP 22) quando comparados aos seus respectivos controles de crescimento sem hormônios (figura 20A). Apenas em TSF 27 observou-se redução no número de UFC na presença de hormônios, ocorrendo principalmente na fase inicial de maturação do biofilme (24 horas). Em TSF 30 não foi observada diferença significativa entre as condições com presença de HE e seus respectivos controles de crescimento.

Os hormônios induziram ao aumento de biomassa de BMo cultivados em MSFV principalmente a partir de 48h de desenvolvimento dos biofilmes em 3/5 cepas testadas (ACP 49, TSF 27 e LSP 22) quando comparados aos seus respectivos controles de crescimento sem hormônios (figura 20B). Em duas cepas (JSF 97 e TSF 30) não foram observadas diferenças estatísticas significativas na presença dos hormônios. Na cepa LSP 22 observou-se também uma redução significativa da biomassa na presença de progesterona, no tempo de 72 h. Dessa forma, infere-se que os hormônios podem induzir ao aumento do número de células viáveis em BMo cultivados com MSFV desde o início de sua formação, ao passo que induzem ao aumento da quantificação de biomassa, principalmente nos estágios maduros do biofilme, quando comparados aos seus respectivos controles crescidos livres de hormônios.

**Figura 19 - Efeito da adição de hormônios esteroides Progesterona [P2, 7.5 µg/L] e β-estradiol [E4,700 ng/L] na produção de células viáveis e biomassa ao longo do desenvolvimento de biofilmes de *Candida* spp. em BMO – MSFV.**



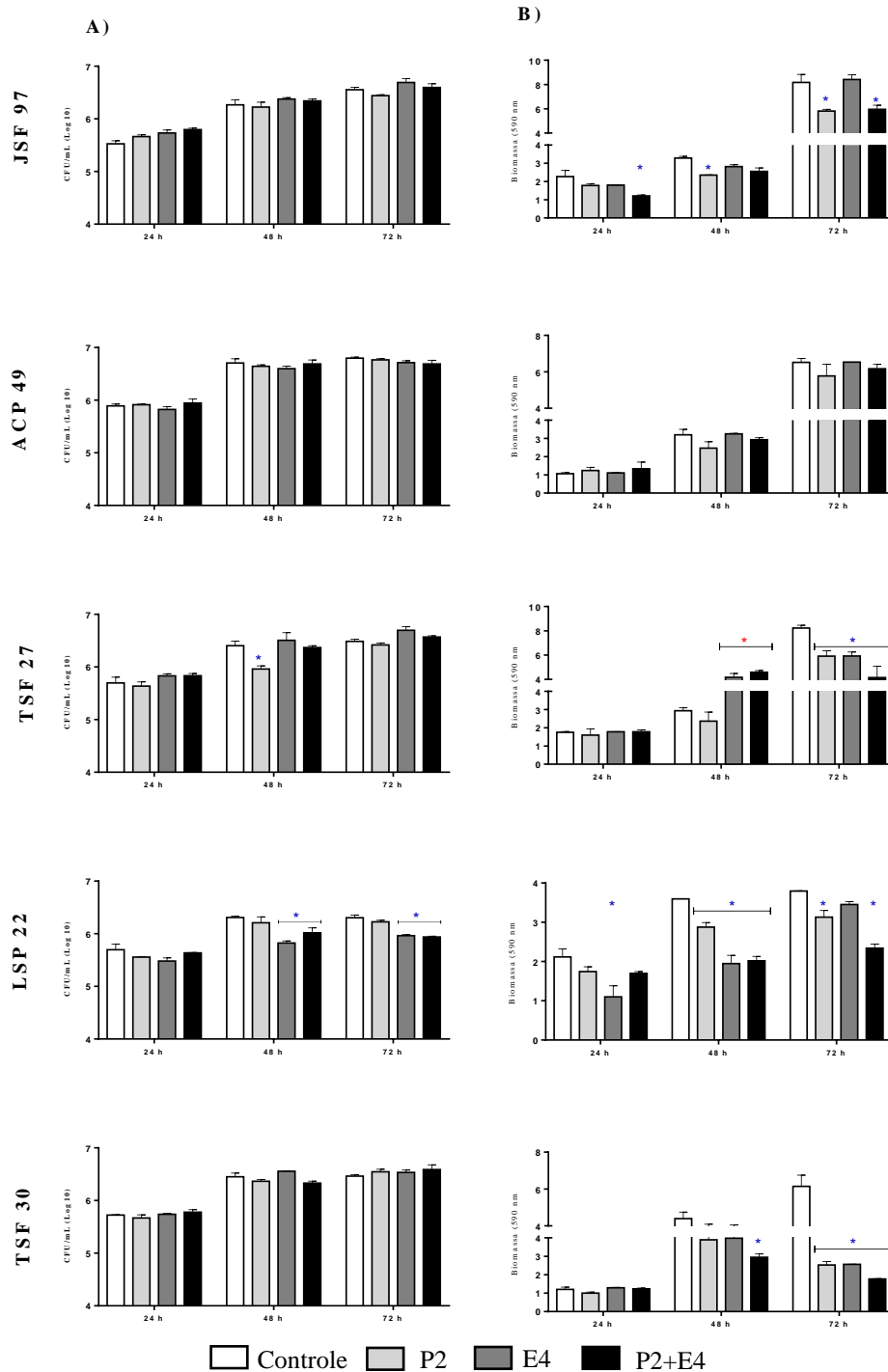
Legenda: Em A, número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Em B, quantificação de biomassa (590 nm). Barras brancas representam o controle de crescimento dos biofilmes sem a adição de hormônios esteroides. Barras cinza claro representam biofilmes adicionados de P2. Barras cinza escuro representam biofilmes adicionados de E4. Barras pretas representam biofilmes adicionados de P2+E4. \* condições em que houve redução estatisticamente significativa quando comparadas aos seus respectivos controles de crescimento. \* condições em que houve aumento estatisticamente significativo quando comparadas aos seus respectivos controles de crescimento. (p<0.05).



Por sua vez, BMo cultivados em RPMI 1640 não mostraram alteração no número de células viáveis em resposta aos hormônios em 3/5 cepas testadas (JSF 97, ACP 49 e TSF 30), quando comparados aos seus respectivos controles de crescimento sem hormônios (figura 21A). Quando houve influência dos HE, esta aconteceu nas fases mais tardias dos biofilmes, como pode ser observado em TSF 27 e LSP 22, em que houve redução de unidades formadoras de colônia quando da presença de HE.

Observou-se que os hormônios reduziram a biomassa de BMo formados em RPMI 1640 desde os estágios iniciais de maturação (figura 21B). Em 4/5 cepas avaliadas (JSF 97, TSF 27, LSP 22 e TSF 30) houve redução de biomassa em pelo menos uma das condições de adição de hormônios ao biofilme. Apenas em ACP 49 não foram observadas diferenças estatísticas significativas onde houve adição de hormônios. Em TSF 27 houve aumento de biomassa na presença de hormônios no tempo de 48h. Dessa forma, infere-se que o modelo BMo cultivado em RPMI 1640 sofre pouca influência dos hormônios sexuais femininos progesterona e  $\beta$ -estradiol quanto ao número de células viáveis; todavia, essas condições podem reduzir a quantificação de biomassa, desde os estágios iniciais desses biofilmes, quando comparados aos seus respectivos controles sem adição de hormônios.

**Figura 20 - Efeito da adição de hormônios esteroides Progesterona [P2, 7.5 µg/L] e β-estradiol [E4,700 ng/L] na produção de células viáveis e biomassa ao longo do desenvolvimento de biofilmes de *Candida* spp. em BMO – RPMI.**



Legenda: Em A, número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Em B, quantificação de biomassa (590 nm). Barras brancas representam o controle de crescimento dos biofilmes sem a adição de hormônios esteroides. Barras cinza claro representam biofilmes adicionados de P2. Barras cinza escuro representam biofilmes adicionados de E4. Barras pretas representam biofilmes adicionados de P2+E4. \* condições em que houve redução estatisticamente significativa quando comparadas aos seus respectivos controles de crescimento. \* condições em que houve aumento estatisticamente significativo quando comparadas aos seus respectivos controles de crescimento. ( $p < 0.05$ ).

## 7.6 Recuperação de células persistentes a partir de biofilmes de *Candida spp.* em microcosmos (BMi) e monoespécie (BMo)

Essa fase do estudo debruçou-se por avaliar se os BMi são capazes de produzir células persistentes. Posteriormente, os valores obtidos foram comparados com os biofilmes maduros em BMo cultivados nos meios MSFV e RPMI 1640.

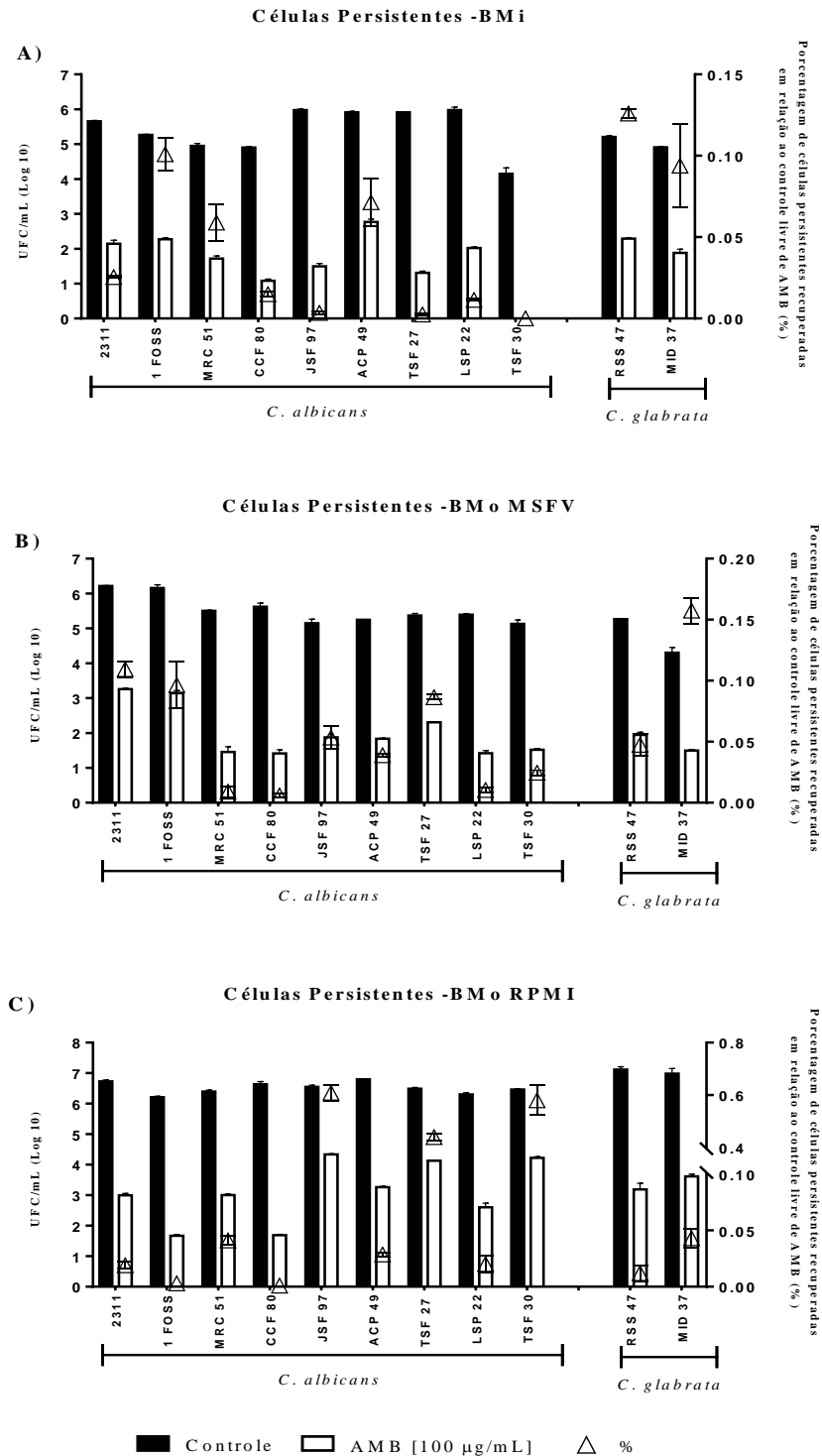
A figura 22 mostra a produção de células persistentes em 11 amostras testadas. O modelo BMi (figura 22A) permitiu a produção de células persistentes em 10 das 11 amostras. O número de células persistentes recuperadas nessas amostras foi de  $10^1$  a  $10^3$  células. A porcentagem de recuperação das células persistentes, quando comparados aos seus controles livres de droga, variou de 0,003% (amostra TSF 27) a 0,126% (amostra RSS 47). Não foi possível recuperar células persistentes apenas da amostra TSF 30.

A figura 22B mostra a produção de células persistentes em BMo cultivados em MSFV. Esse modelo de cultivo permitiu a produção de células persistentes em todas as 11 cepas testadas. O número de células persistentes recuperadas foi de  $10^1$  a  $10^3$  células. A porcentagem de recuperação das células persistentes, quando comparados aos seus controles livres de droga, variou de 0,005% (cepa CCF80) a 0,165% (cepa MID 37).

Já a figura 22C mostra a produção de células persistentes em BMo cultivados em RPMI 1640. Nesse modelo também houve a produção de células persistentes em todas as cepas testadas. O número de células persistentes recuperadas variou de  $10^2$  a  $10^4$  células. A porcentagem de recuperação das células persistentes, quando comparados aos seus controles livres de droga, variou de 0,001% (cepa CCF80) a 0,630% (cepa JSF 97).

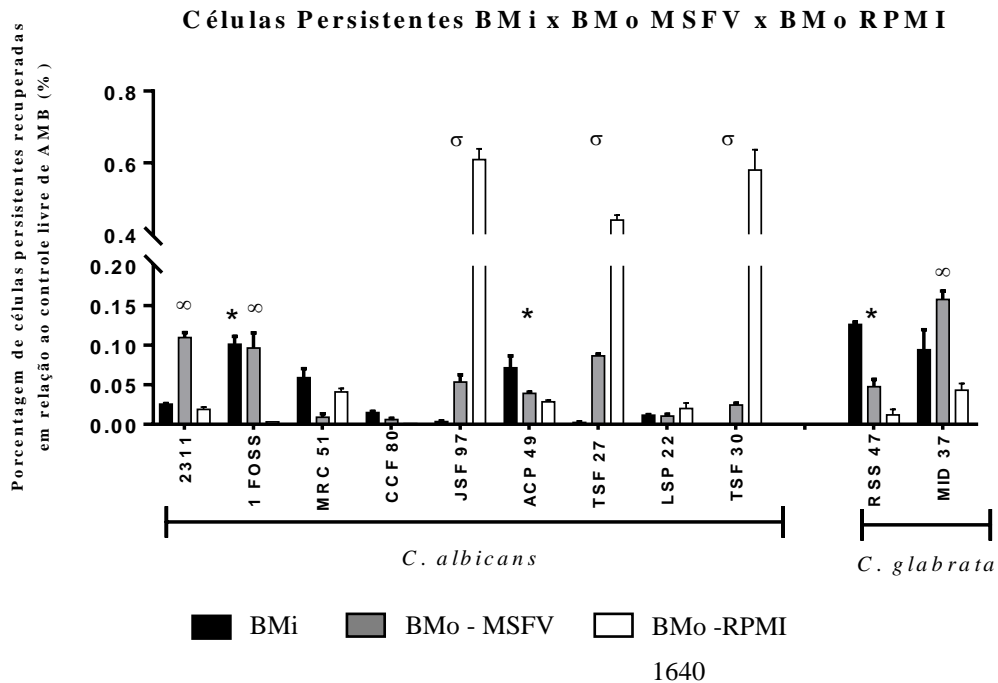
A figura 23 mostra a porcentagem de recuperação de células persistentes a partir de biofilmes maduros em BMi, BMo MSFV e BMo RPMI 1640. A proporção do número de células persistentes recuperadas, quando comparadas aos seus respectivos controles de crescimento, teve resultado amostra-dependente. Em três amostras (MRC 51, ACP 49 e RSS47) o BMi produziu mais CP que as outras condições de cultivo. E em outras duas amostras (2311 e MID 37) a porcentagem de recuperação foi maior no BMo MSFV. Em outras três amostras (JSF 97, TSF 27 e TSF 30) os BMo cultivados em RPMI 1640 produziram mais CP que seus respectivos cultivos em BMi e BMo MSFV. Em uma amostra (1 FOSS) BMi e BMo MSFV produziram CP em proporções iguais. E em duas amostras (CCF 80 e LSP 22) não houve diferença significativa entre os modelos de cultivo de biofilme.

**Figura 21 - Recuperação de células persistentes a partir de biofilmes maduros de *Candida* spp. em microcosmos (BMi) e monoespécie (Bmo – MSFV e BMo -RPMI 1640)**



Legenda: Em A, resultados expressos em UFC/mL e porcentagem (%) para as CP recuperadas dos biofilmes BMi. Em B, resultados expressos em UFC/mL e porcentagem (%) para as CP recuperadas dos biofilmes BMo em MSFV. Em C, resultados expressos em UFC/mL e porcentagem (%) para as CP recuperadas dos biofilmes BMo em RPMI 1640. Barras pretas representam o número de unidades formadoras de colônias (CFU/mL) obtidas nos controles sem o desafio com AMB [100 µg/mL]. Barras brancas representam o número de CFU/mL obtido após o desafio com AMB [100 µg/mL]. Os triângulos evidenciam a porcentagem de recuperação das células persistentes (CP) em relação aos seus controles livre de AMB.

**Figura 22 - Porcentagem de recuperação de células persistentes (%) a partir de biofilmes maduros de *Candida* spp. em microcosmos (BMi) e monoespécie (BMo – MSFV e BMo -RPMI 1640)**



Legenda: Barras pretas representam a porcentagem de recuperação das células persistentes (CP) em relação aos seus controles livre de AMB para os BMi. Barras cinzas mostram a porcentagem de CP obtidas nos BMo cultivados em MSFV. Barras brancas mostram a porcentagem de CP obtidas nos BMo cultivados em RPMI 1640. \* condições em que BMi foi maior estatisticamente que os outros modelos de cultivo. ∞ condições em que BMo - MSFV foi maior estatisticamente que os outros modelos de cultivo. σ condições em que BMo - RPMI 1640 foi maior estatisticamente que os outros modelos de cultivo ( $p < 0.05$ ).

### 7.7 Efeito dos hormônios progesterona e $\beta$ -estradiol na recuperação de células persistentes a partir de biofilmes de *Candida* spp. em microcosmos (BMi) e monoespécie (BMo)

Dentre as amostras de *Candida* spp. analisadas quanto à produção de CP escolheu-se, aleatoriamente, cinco delas para avaliar se os hormônios esteroides Progesterona [P2, 7.5  $\mu\text{g/L}$ ] e  $\beta$ -estradiol [E4, 700 ng/L], nas concentrações fisiológicas, influenciam na produção de CP em BMi, BMo em MSFV e BMo em RPMI 1640. Os resultados a seguir mostram as análises referentes à porcentagem de recuperação de CP em relação aos seus controles livres do tratamento com AMB.

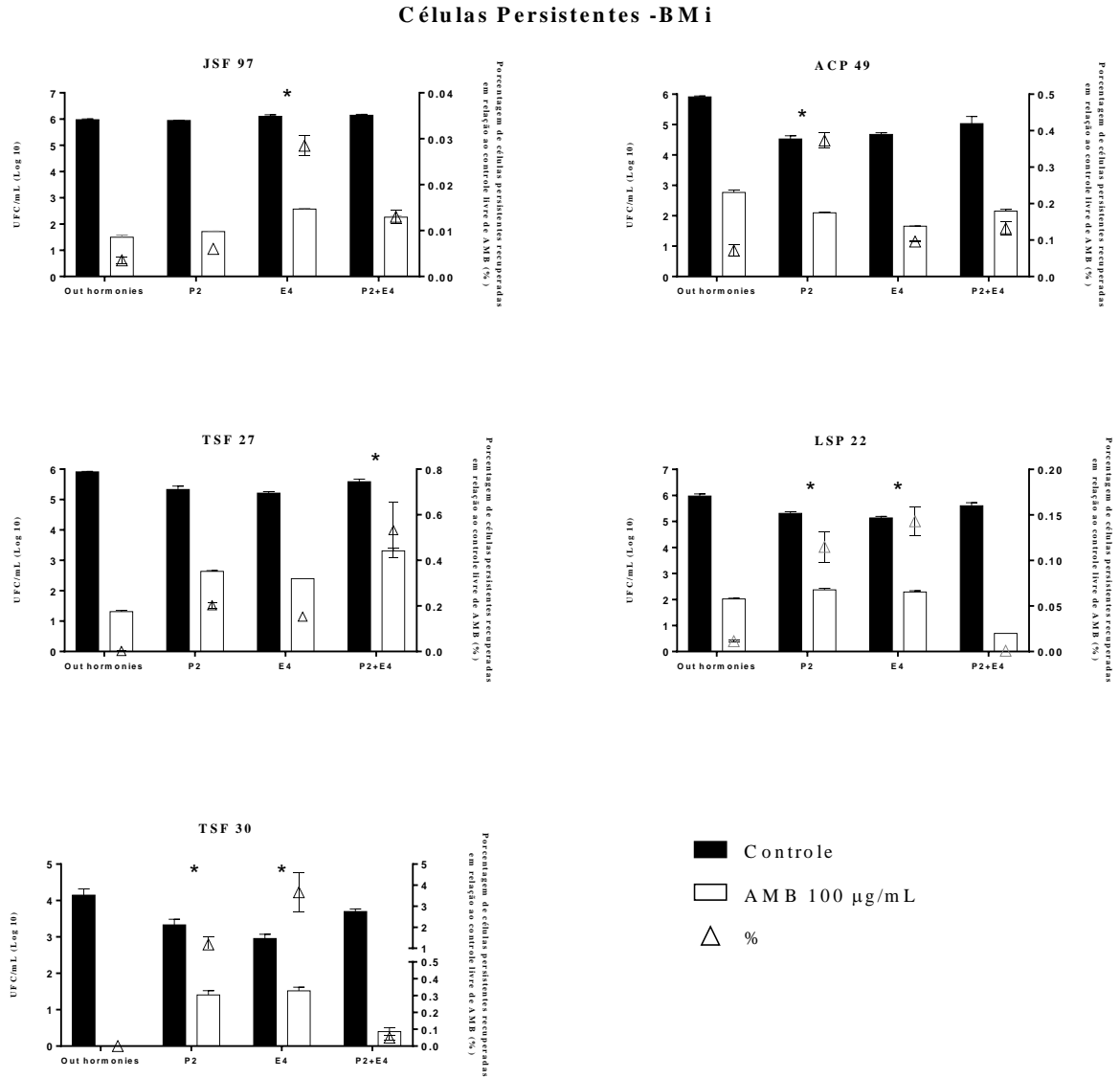
Em BMi (figura 24), observou-se que HE aumentaram a produção de CP. Em todas as amostras testadas houve aumento significativo de recuperação de CP nas condições com a

presença de hormônios, quando comparados aos seus respectivos controles cultivados na ausência destes. Em LSP 22 e TSF 30, as condições de P2 e E4 foram capazes de aumentar significativamente a produção de CP. Em ACP 49, houve aumento estatisticamente significativo na condição de P2. Já em JSF 97, foi observado o aumento na condição de E4. Em TSF 27, observou-se aumento significativo na produção de CP na condição com suplementação de P2+E4.

Em BMo-VFSM (figura 25) não foram observadas diferenças significativas entre a recuperação de CP nos controles sem a presença dos HE, e a recuperação de CP nas condições com suplementação de hormônios em 3/5 amostra testadas (TSF 27, LSP 22 e TSF 30). Em JSF 97, P2 reduziu significativamente a recuperação de CP. Enquanto em ACP 49 observou-se aumento significativo de CP com a suplementação de E4.

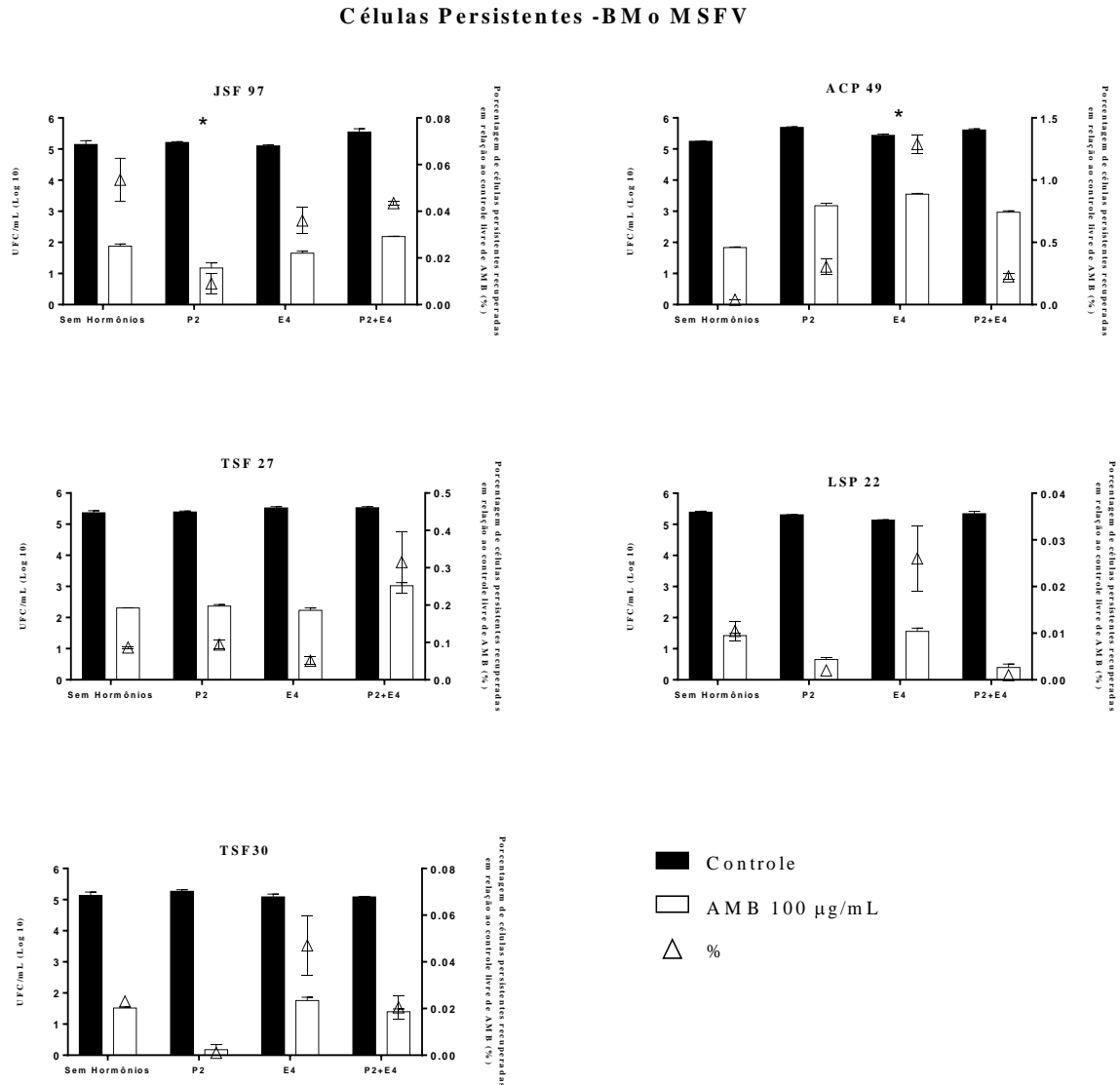
HE causaram redução do número de CP em BMo-RPMI (figura 26), quando comparado aos controles sem a adição dos hormônios em 4/ 5 amostras avaliadas (JSF 97, ACP 49, TSF 27 e TSF 30). Em JSF 97 e TSF 30, em todas as condições com presença de hormônios, houve redução significativa do número de CP recuperadas, quando comparadas aos seus respectivos controles sem a presença de hormônios. Em ACP 49, apenas a suplementação de P2 mostrou reduzir o número de CP recuperadas. Em TSF 27, apenas a suplementação de E4 mostrou reduzir o número de CP recuperadas. Contrariamente, LSP 22 apresentou maior quantidade de CP na condição P2+E4, em comparação com o seu controle sem a presença de hormônio.

**Figura 23 - Recuperação de células persistentes a partir de biofilmes maduros de *Candida* spp. em microcosmos BMi suplementados com progesterona e  $\beta$ -estradiol**



Legenda: Resultados expressos em UFC/mL e porcentagem (%) para as CP recuperadas dos biofilmes BMi. Barras pretas representam o número de unidades formadoras de colônias (CFU/mL) obtidas nos controles sem o desafio com AMB [100 µg/mL]. Barras brancas representam o número de CFU/mL obtido após o desafio com AMB [100 µg/mL]. Os triângulos evidenciam a porcentagem de recuperação das células persistentes (CP) em relação aos seus controles livre de AMB. \* condições em que houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas aos seus respectivos controles de crescimento. (p<0.05).

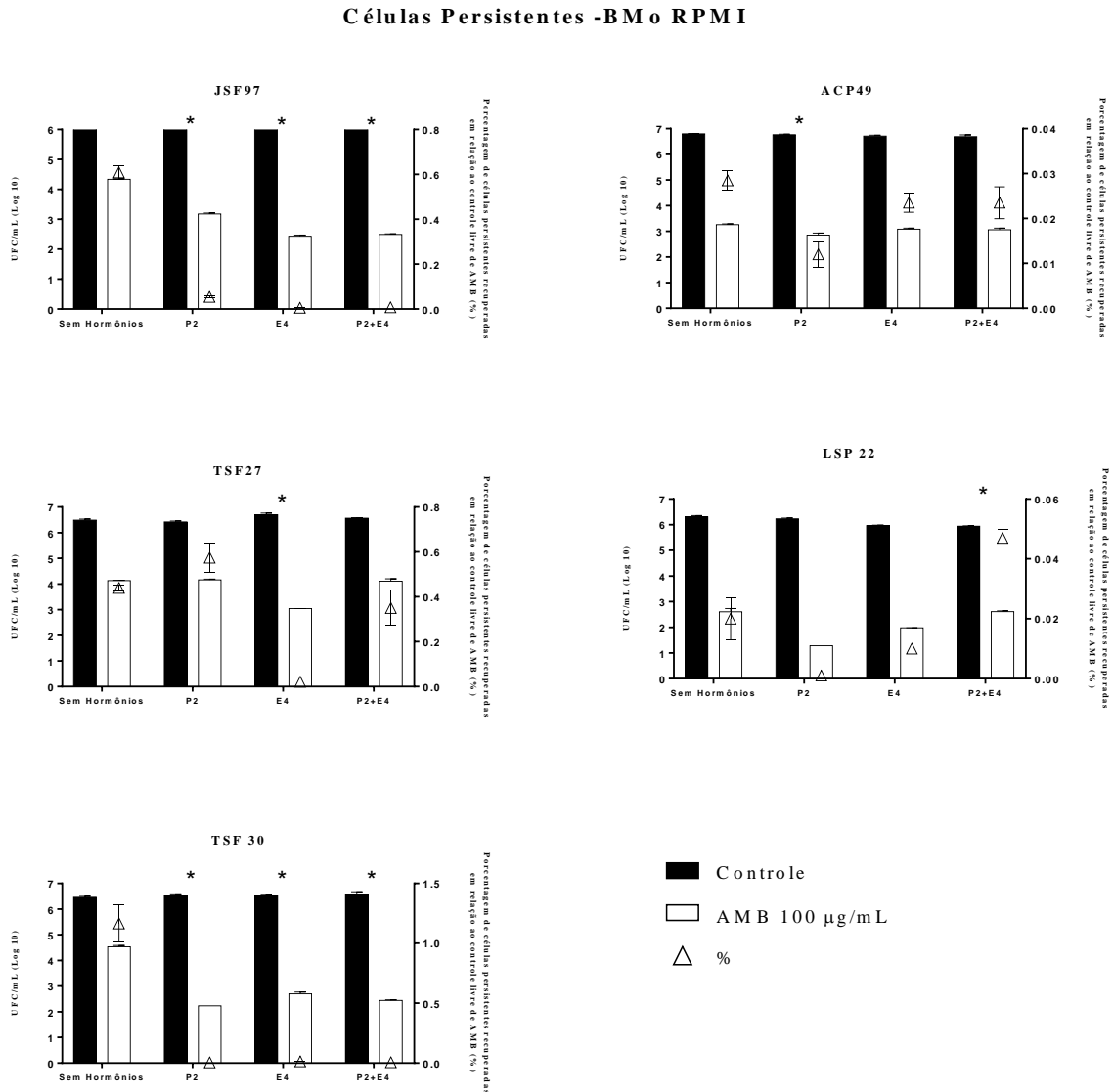
**Figura 24 - Recuperação de células persistentes a partir de biofilmes maduros de *Candida* spp. em BMO cultivados em MSFV suplementados com progesterona e  $\beta$ -estradiol**



Legenda: Resultados expressos em UFC/mL e porcentagem (%) para as CP recuperadas dos biofilmes BMO - MSFV. Barras pretas representam o número de unidades formadoras de colônias (CFU/mL) obtidas nos controles sem o desafio com AMB [100 µg/mL]. Barras brancas representam o número de CFU/mL obtido após o desafio com AMB [100 µg/mL]. Os triângulos evidenciam a porcentagem de recuperação das células persistentes (CP) em relação aos seus controles livre de AMB. \* condições em que houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas aos seus respectivos controles de crescimento. ( $p < 0.05$ ).



**Figura 25 - Recuperação de células persistentes a partir de biofilmes maduros de *Candida* spp. em BMo cultivados em RPMI 1640 suplementados com progesterona e  $\beta$ -estradiol**



Legenda: Resultados expressos em UFC/mL e porcentagem (%) para as CP recuperadas dos biofilmes BMo - RPMI 1640. Barras pretas representam o número de unidades formadoras de colônias (CFU/mL) obtidas nos controles sem o desafio com AMB [100 µg/mL]. Barras brancas representam o número de CFU/mL obtido após o desafio com AMB [100 µg/mL]. Os triângulos evidenciam a porcentagem de recuperação das células persistentes (CP) em relação aos seus controles livre de AMB. \* condições em que houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas aos seus respectivos controles de crescimento. (p<0.05).

### 7.8 Sensibilidade planctônica de *Candida albicans* isoladas das secreções vaginais em MSFV e RPMI 1640

A tabela 2 mostra os dados obtidos a partir da sensibilidade de isolados de *C. albicans* (n=25) de CVV. A média geométrica (MG) dos CIMs em meio RPMI 1640 para AMB foi 0,59 µg/mL; 0,46 µg/mL para FLC; 0,06 µg/mL para VRC, 0,05 µg/mL para ITC; 3,89 para NIS e 0,06 para MIC, CLO e TIO. Já os dados obtidos a partir da sensibilidade realizada em MSFV mostram MG de 1,89 µg/mL para AMB; 1,6 µg/mL para FLC; 0,06 µg/mL para VRC; 0,04 µg/mL para ITC; 9,19 pra NIS e 0,09 para MIC; 0,17 para CLO e 0,08 para TIO. Ao comparar esses dados, observou-se que o cultivo planctônico em MSFV favoreceu o aumento da MG dos CIMs em 3 vezes para AMB, 2,8 vezes para FLC, 2,3 vezes para NIS, 1,5 vezes para MIC e 2,8 vezes para CLO. As MG obtidas nos dois testes com meios de cultivos diferentes não tiveram aumento significativo para VRZ, ITR e TIO. (tabela 2).

Também foram avaliados os *breakpoints* de interpretação conforme CLSI (2008), que classificam as cepas em sensível e não-sensível para AMB e, sensível, sensível dose-dependente (SDD) e resistente para os derivados azólicos a partir dos CIMs obtidos (tabela 3). Observou-se que 8% das cepas cultivadas em RPMI 1640 mostraram-se não-sensíveis à AMB (CIM > 1 µg/mL). Além disso, 8% das cepas comportaram-se como resistentes ao FLC (CIM ≥ 8 µg/mL); 4% foram resistentes ao VRC (CIM ≥ 2 µg/mL) e nenhuma cepa apresentou CIM de resistência ao ITC. Já no cultivo realizado em MSFV, observou-se que 60% das cepas foram não-sensíveis à AMB (CIM >1 µg/mL) e 8% mostraram-se resistentes aos derivados azólicos. Esses dados mostram que a porcentagem de cepas que se comportaram como não-sensíveis à AMB em MSFV foi maior aproximadamente 7 vezes quando comparado ao RPMI 1640 (de 8% para 60%). Observou-se também que a porcentagem de cepas resistentes ao FLC aumentou de 8% em RPMI 1640 para 12% em MSFV, e em VRC dobrou (de 4% em RPMI 1640 para 8% em MSFV). Além disso, houve o surgimento de cepas resistentes ao ITC (8%), que não foi observado no RPMI 1640 (tabela 3).

**Tabela 2 - Sensibilidade planctônica de *C. albicans* oriundas de pacientes com CVV em RPMI 1640 e MSFV (n=25)**

MEIO RPMI 1640								
	AMB	FLC	VRC	ITC	NIS	MIC	CLO	TIO
	(0,0313-16)	(0,125-64)	(0,0313-16)	(0,0313-16)	(0,0313-16)	(0,0313-16)	(0,0313-16)	(0,0313-16)
<b>RANGE</b>	0,125 - 2	0,125 - 8	0,031-1	0,031-0,5	2 - 8	0,031 - 2	0,031 - 1	0,031 - 1
<b>M. G</b>	0,59	0,46	0,06	0,05	3,89	0,06	0,06	0,06
<b>DESV. P</b>	0,48	2,29	0,22	0,11	1,35	0,41	0,33	0,049
<b>MODA</b>	0,5	0,25	0,0313	0,0313	4	0,0313	0,0313	0,0313
MEIO SIMULADOR DE FLUIDO VAGINAL (MSFV)								
	AMB	FLC	VRC	ITC	NIS	MIC	CLO	TIO
	(0,0313-16)	(0,125-64)	(0,0313-16)	(0,0313-16)	(0,0313-16)	(0,0313-16)	(0,0313-16)	(0,0313-16)
<b>RANGE</b>	0,5 - 16	0,5 - 32	0,031 - 2	0,031 - 1	4 - >16	0,031 - 4	0,031-0,25	0,031 - 1
<b>M. G</b>	1,89	1,60	0,06	0,04	9,19	0,09	0,17	0,08
<b>DESV. P</b>	3,17	8,55	0,43	0,27	5,37	0,98	0,14	0,24
<b>MODA</b>	4	1	0,0313	0,0313	>16	0,125	0,125	0,0313

Nota: anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC), voriconazol (VRC), itraconazol (ITC), nistatina (NIS), miconazol (MIC), clotrimazol (CLO), tioconazol (TIO). Média geométrica (M.G). Desvio-padrão (Desv. P). Intervalo de concentração testado em µg/mL).

**Tabela 3 - Classificação do perfil de sensibilidade de isolados de *C. albicans* de VVC baseado nos breakpoints de interpretação do CLSI (2008)**

MEIO RPMI 1640			
	S	NS	
<b>AMB</b>	92%	8%	
	S	SDD	R
<b>FLC</b>	84%	8%	8%
<b>VRC</b>	76%	20%	4%
<b>ITC</b>	88%	12%	0%

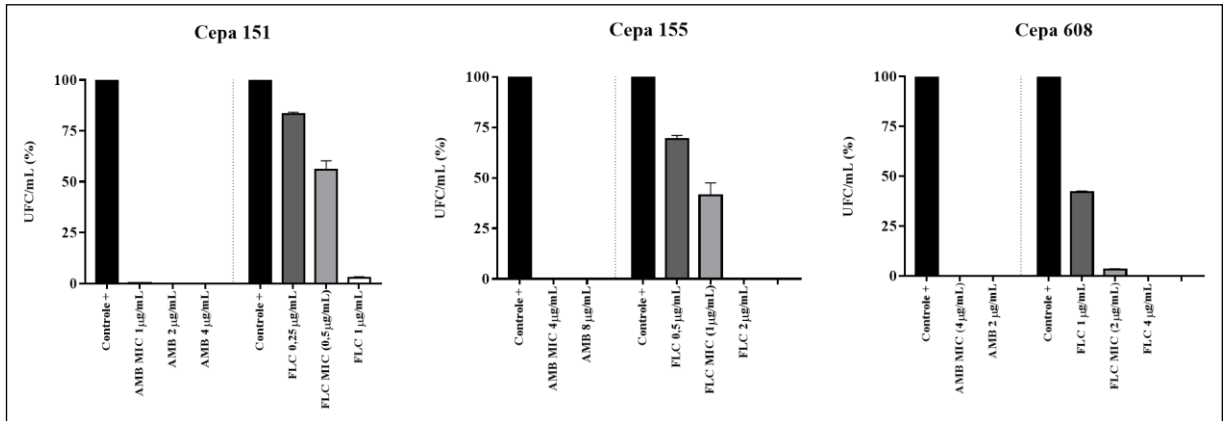
<b>MEIO SIMULADOR DE FLUIDO VAGINAL (MSFV)</b>			
	<b>S</b>		<b>NS</b>
<b>AMB</b>	40%		60%
	<b>S</b>	<b>SDD</b>	<b>R</b>
<b>FLC</b>	84%	4%	12%
<b>VRC</b>	76%	16%	8%
<b>ITC</b>	92%	0%	8%

Nota: anfotericina B (AMB), fluconazol (FLC), voriconazol (VRC) e itraconazol (ITC). S = Sensível; R = Resistente; SDD = Sensível Dose Dependente; NS = Não Sensível \* Fonte: Manual M27-A3 (CLSI, 2008).

A figura 17 mostra que houve correspondência entre as CIMs obtidas a partir da leitura visual e a redução no número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) na porcentagem estabelecida para cada droga (100% do crescimento fúngico para AMB e 50% para FLC). Na cepa 151, a CIM visual para AMB foi 1 µg/mL. Corroborando essa leitura, foi observado crescimento de apenas 0,4% de UFC/mL (comparado ao controle sem a droga) no poço da concentração de 1 µg/mL e no poço imediatamente posterior (concentração de 2 µg/mL) não houve nenhum crescimento. Já para FLC, a CIM visual foi de 0,5 µg/mL, correspondente a uma média de recuperação de 55,8% de UFC/mL, quando comparado aos seu controle de crescimento.

Para as cepas 155 e 168, os mesmos fenômenos foram observados. Em 155, a CIM visual para AMB foi de 4 µg/mL, e equiparou-se a nenhum crescimento na mesma concentração ao ser avaliado pelo número de UFC/mL. Para o FLC, a CIM obtida visualmente foi de 1 µg/mL, correspondente a uma média de recuperação de 41,35% de UFC/mL na mesma concentração testada. Em 168, a CIM visual para AMB também foi de 4 µg/mL, que correspondeu a nenhum crescimento na mesma concentração ao ser avaliado pelo número de UFC/mL. Já para FLC, a CIM visual na concentração de 2 µg/mL, equivaleu a uma recuperação de apenas 3% de UFC/mL. Porém a concentração imediatamente anterior (1 µg/mL) teve uma porcentagem de recuperação de, em média, 42% de UFC/mL quando comparado ao seu controle livre de tratamento (figura 17).

**Figura 26 - Comparação entre as CIMs obtidos pela leitura visual em MSFV e a recuperação de células (UFC/mL) nas concentrações testadas de anfotericina B e fluconazol em três isolados de *C.albicans* oriundas de pacientes com CVV.**



Nota: AMB - anfotericina B; FLC - fluconazol

### 7.9 Efeito dos hormônios progesterona e $\beta$ -estradiol na sensibilidade planctônica de *Candida albicans* em MSFV e RPMI 1640

A influência dos hormônios esteroides, em concentrações fisiológicas, na sensibilidade de isolados de *C. albicans* frente ao fluconazol e clotrimazol mostrou ser cepa dependente (tabela 4). No cultivo em meio RPMI 1640, frente ao fluconazol, apenas duas cepas (JSF 97 e TSF 30) aumentaram, em até três vezes, as CIMs com a suplementação de P2. Frente ao clotrimazol, não houve diferenças nas CIMs obtidas. No cultivo em meio MSFV apenas a cepa JSF 97 apresentou aumento, em três vezes na CIM, com a suplementação de P2+E4. Na sensibilidade frente ao clotrimazol também não houve diferenças entre as CIMs obtidas com a suplementação de hormônios dos seus controles sem hormônios.

**Tabela 4 - Sensibilidade planctônica de *C. albicans* oriundas de pacientes com CVV em RPMI 1640 e MSFV suplementados com hormônios progesterona e  $\beta$ -estradiol (n=4)**

RPMI 1640								
	FLC (0,125-64 $\mu\text{g/mL}$ )				CLO (0,0313 – 16 $\mu\text{g/mL}$ )			
	S/hormônio	P2	E4	P2 +E4	S/hormônio	P2	E4	P2+E4
<b>JSF 97</b>	0,125	1	0,5	0,25	0,0313	0,0313	0,0313	0,0313
<b>TSF 27</b>	2	2	0,5	2	0,0313	0,0313	0,0313	0,0313
<b>LSP 22</b>	0,25	0,5	0,25	0,5	0,0313	0,0313	0,0313	0,0313
<b>TSF 30</b>	0,25	1	0,25	0,5	0,0313	0,0313	0,0313	0,0313
MEIO SIMULADOR DE FLUIDO VAGINAL - MSFV								
	FLC (0,125-64 $\mu\text{g/mL}$ )				CLO (0,0313 – 16 $\mu\text{g/mL}$ )			
	S/hormônio	P2	E4	P2 +E4	S/hormônio	P2	E4	P2+E4
<b>JSF 97</b>	1	2	2	4	0,25	0,5	0,25	0,5
<b>TSF 27</b>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,25	0,25	0,25	0,25
<b>LSP 22</b>	1	1	1	1	0,25	0,5	0,25	0,5
<b>TSF 30</b>	1	0,5	1	0,5	0,25	0,25	0,25	0,125

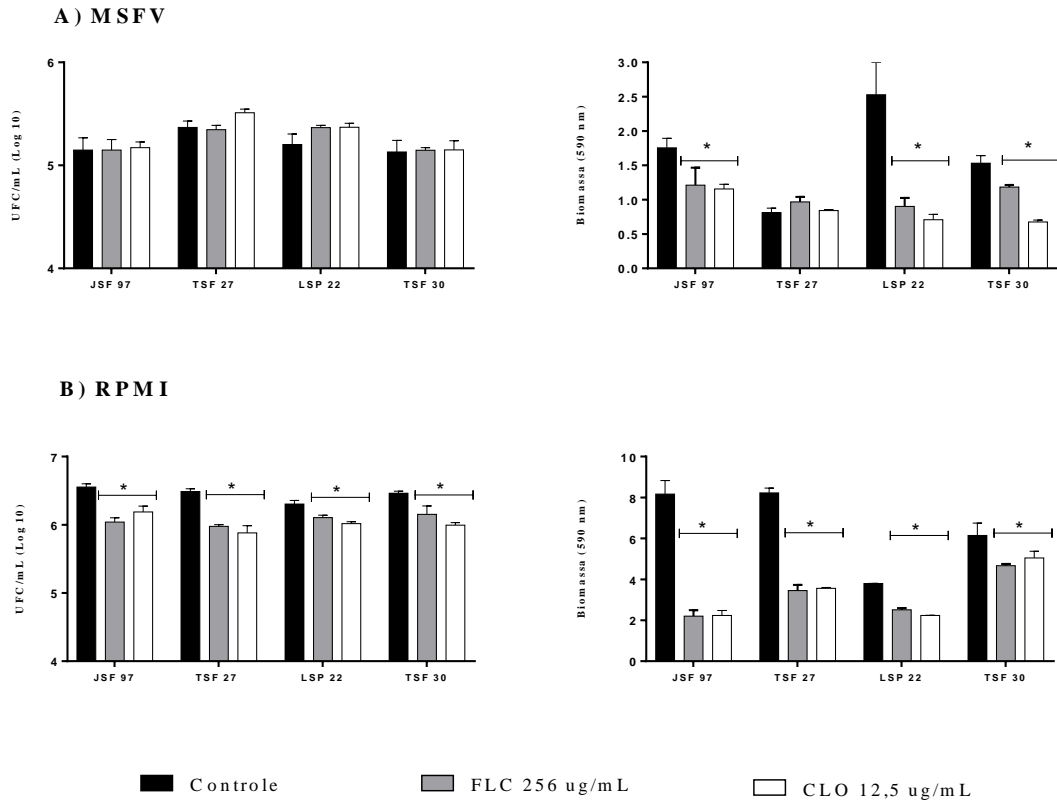
Notas: concentrações em  $\mu\text{g/mL}$ . FLC: fluconazol. CLO: clotrimazol

### 7.10 Efeito dos hormônios progesterona e $\beta$ -estradiol na sensibilidade de biofilmes de *Candida albicans* em MSFV e RPMI 1640

As cepas de *C. albicans* testadas em biofilmes suplementados com progesterona e  $\beta$ -estradiol foram verificadas quanto à influência da presença dos hormônios na tolerância dos biofilmes frente a dois antifúngicos utilizados frequentemente no tratamento da CVV. Assim, foi avaliado o número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) e quantificação de biomassa dos biofilmes maduros.

Primeiramente, foram analisados os biofilmes BMo em MSFV e BMo em RPMI 1640 sem a suplementação hormonal, a fim de verificar se os meios diferentes promoveriam resultados distintos de sensibilidade aos biofilmes (figura 27).

**Figura 27 - Sensibilidade de biofilmes monoespécie de *C. albicans* (BMo) cultivados em MSFV e RPMI 1640 frente ao fluconazol [256 µg/mL] e clotrimazol [12,5 µg/mL]**



Legenda: Em A, número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) e quantificação de biomassa (590 nm) obtidas após o tratamento com os antifúngicos FLC e CLO nos biofilmes BMo - MSFV. Em B, número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL) e quantificação de biomassa (590 nm) obtidas após o tratamento com os antifúngicos FLC e CLO nos biofilmes BMo - RPMI 1640. Barras pretas representam o controle de crescimento dos biofilmes. Barras cinzas representam biofilmes tratados com FLC [256 µg/mL]. Barras brancas representam biofilmes adicionados tratados com CLO [12,5 µg/mL]. \* condições em que houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas aos seus respectivos controles de crescimento. ( $p < 0.05$ ).

Em MSFV (figura 27), nenhuma das cepas testadas apresentou redução no número de células viáveis nas concentrações de drogas utilizadas, tendo seu número de UFC/mL equivalente aos seus respectivos controles livres de tratamento com os antifúngicos. A quantificação de biomassa, por sua vez, foi reduzida de 22 a 64% em 3/4 cepas (JSF 97, LSP 22 e TSF 30) para fluconazol, e de 34 a 71% para o clotrimazol (figura 27A). Já em RPMI 1640, houve redução no número de UFC/mL e da quantificação de biomassa nos tratamentos com as drogas antifúngicas em todas as cepas avaliadas. O número de UFC/mL foi reduzido de 36 a 69% no tratamento com fluconazol, e de 48 a 75% em clotrimazol. Quanto à quantificação de biomassa, houve redução de 23 até 73% para o fluconazol de 17 a 72% para o clotrimazol (figura 27B).

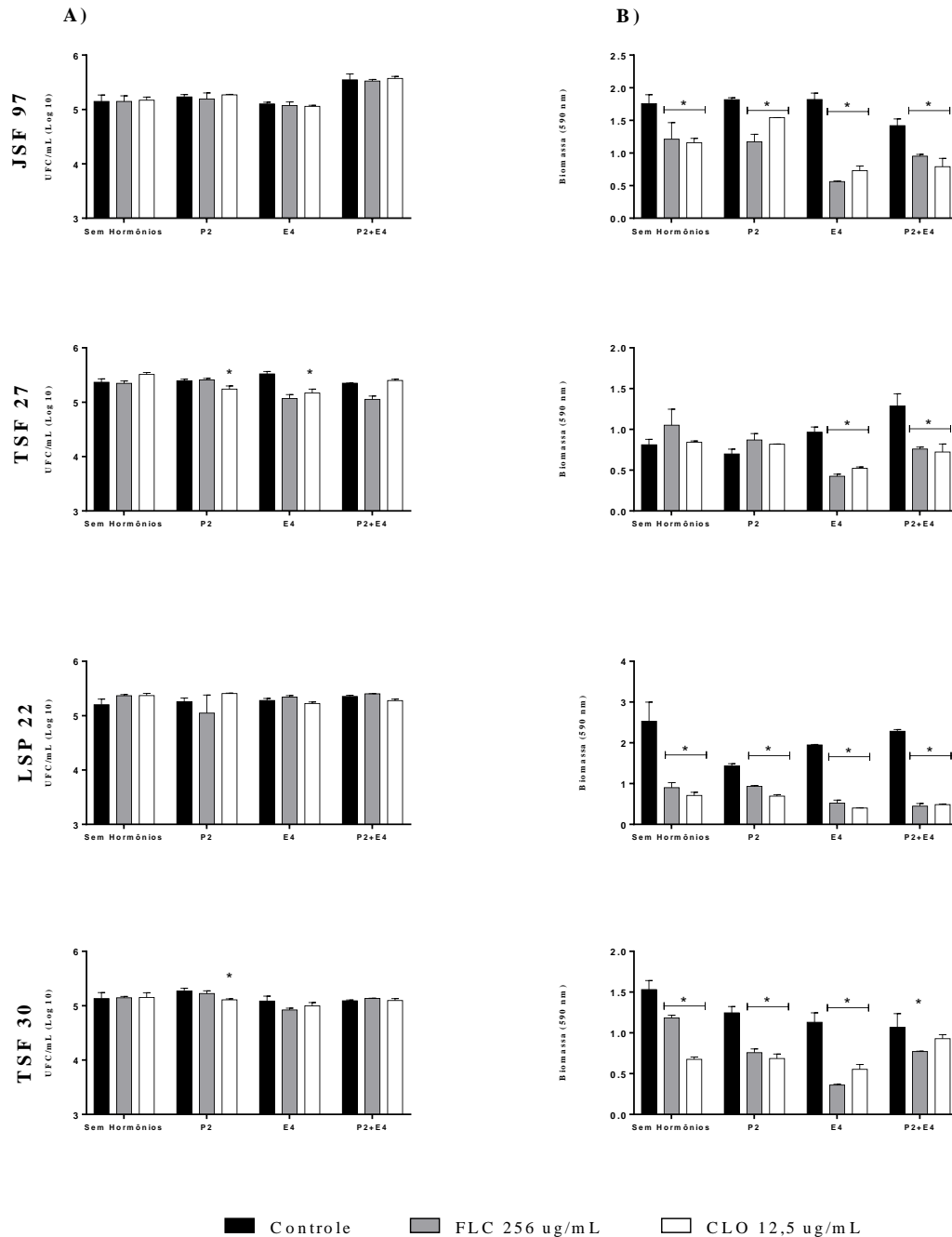
A sensibilidade frente aos antifúngicos em biofilmes monoespécie suplementados com progesterona e  $\beta$ -estradiol está apresentada nas figuras 28 e 29. Em MSFV, em 2/4 cepas testadas, não houve redução de número de células viáveis nos biofilmes suplementados com os hormônios. Em TSF 27, nas condições com a presença de P2 e E4, o tratamento com clotrimazol reduziu em 29 e 55% o número de UFC/mL dos biofilmes, respectivamente. Em TSF 30, na condição de adição de P2, o tratamento com clotrimazol reduziu em 31% o número de UFC/mL do biofilme (figura 28A).

Quanto à quantificação de biomassa em BMo - MSFV, os biofilmes suplementados com os hormônios apresentaram redução de biomassa em todas as cepas testadas. A redução variou entre 22 e 79% para fluconazol, e de 12 a 79% para clotrimazol (figura 28B). Ao comparar os resultados obtidos nas condições com a presença de HE aos resultados dos biofilmes tratados com as drogas, mas sem a suplementação hormonal, P2 apresentou redução de biomassa até 17% maior para o tratamento com FLC. Contrariamente, para CLO, observou-se que a redução da biomassa foi menor com a adição de P2, em até 20%. Em E4 a redução da biomassa foi até 55% maior para FLC que nos controles tratados e sem hormônios, ao passo que para CLO foi até 45% maior. Por fim, em P2+E4 a redução da biomassa foi até 41% maior que o controle tratado sem hormônios para o FLC, e 43% maior para CLO.

Em BMo cultivados em RPMI 1640 observou-se que todas as condições de suplementação de hormônios permitiram a redução no número de UFC/mL e na quantificação de biomassa nos tratamentos com fluconazol e clotrimazol, em todas as cepas testadas (figura 29). A redução do número de células viáveis (UFC/mL) variou entre 20 e 83% para FLC e de 44 a 89% para CLO (figura 29A). Já a quantificação de biomassa foi reduzida de 12 a 85% no tratamento com FLC e de 3 a 81% para CLO (figura 29B). Ao comparar número de UFC/mL obtidos nas condições com a presença de HE com o resultado a partir dos controles tratados com as drogas, porém sem a adição de hormônios, observou-se que na condição da presença de P2 houve redução de UFC/mL até 20% maior que seus respectivos controles. Em E4, a redução foi até 16% maior e em P2+E4, até 10% maior que os controles sem suplementação de hormônios. Quanto à quantificação de biomassa, observou-se que a adição de P2 reduziu a biomassa até 10% mais que seus controles que tiveram o tratamento com os antifúngicos, mas não foram suplementados com os hormônios. Em E4, os biofilmes reduziram a biomassa até 15% mais. E em P2+E4 não foram observadas diferenças entre os controles tratados com droga, sem hormônios, e os biofilmes tratados com droga e suplementados com hormônios.

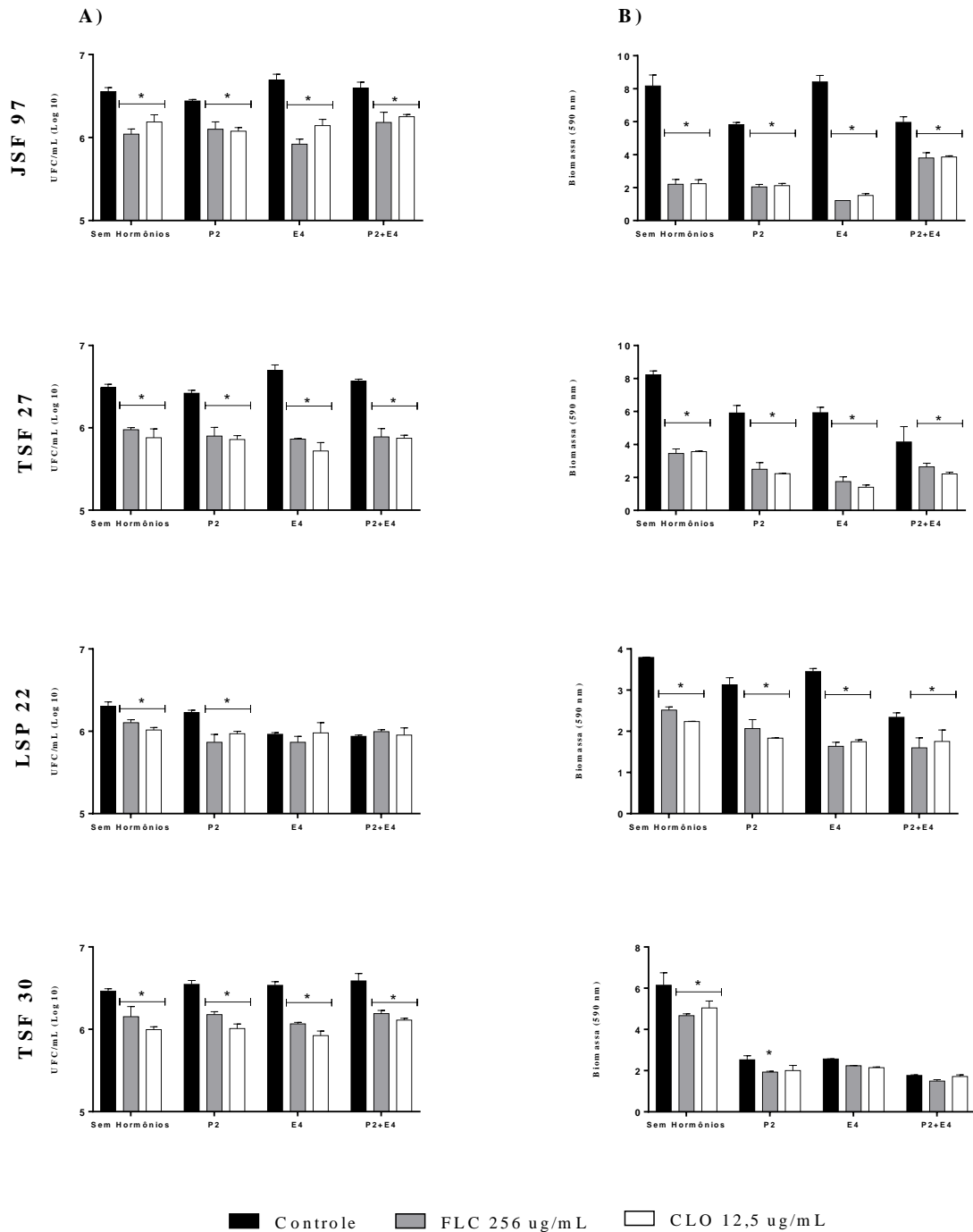


**Figura 28 - Sensibilidade de biofilmes monoespécie de *C. albicans* (BMo) cultivados em MSFV e suplementados com progesterona e  $\beta$ -estradiol frente ao fluconazol [256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] e clotrimazol [12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ].**



Legenda: Em A, número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Em B, quantificação de biomassa (590 nm) obtidas após o tratamento com os antifúngicos FLC e CLO nos biofilmes BMo - MSFV. Barras pretas representam o controle de crescimento dos biofilmes. Barras cinzas representam biofilmes tratados com FLC [256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]. Barras brancas representam biofilmes adicionados tratados com CLO [12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]. \* condições em que houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas aos seus respectivos controles de crescimento. ( $p < 0.05$ ).

**Figura 29 - Sensibilidade de biofilmes monoespécie de *C. albicans* (BMo) cultivados em RPMI 1640 e suplementados com progesterona e  $\beta$ -estradiol frente ao fluconazol [256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] e clotrimazol [12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ].**



Legenda: Em A, número de unidades formadoras de colônia (UFC/mL). Em B, quantificação de biomassa (590 nm) obtidas após o tratamento com os antifúngicos FLC e CLO nos biofilmes BMo - MSFV. Barras pretas representam o controle de crescimento dos biofilmes. Barras cinzas representam biofilmes tratados com FLC [256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]. Barras brancas representam biofilmes adicionados tratados com CLO [12,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]. \* condições em que houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas aos seus respectivos controles de crescimento. ( $p < 0.05$ ).

## 8. DISCUSSÃO

A CVV é uma importante condição patológica que afeta mulheres em idade fértil em todo o mundo. Apesar de sua frequência e do conhecimento que se tem sobre a fisiopatologia da doença, a CVV continua a ser um dos problemas mais complexos na saúde feminina (DONDEERS et al., 2018). Nos últimos anos, tem-se ressaltado o papel dos biofilmes na patogênese de *Candida* durante a CVV. Os biofilmes apresentam-se como a forma mais comum de crescimento microbiano na natureza e sua presença é fundamental no desenvolvimento da CVV e RCVV, no qual *C. albicans* continua sendo a espécie predominantemente estudada (MCKLOUD et al., 2021; RODRIGUEZ-CERDEIRA et al., 2019; MUZNY et al., 2015; HARRIOT et al., 2010).

A função dos biofilmes no desenvolvimento da candidíase está associada, principalmente, ao aumento das falhas terapêuticas e recorrência de infecções. A presença de biofilmes de *Candida* na mucosa vaginal, confere a essas comunidades impermeabilidade e resistência à maioria dos antifúngicos utilizados, além de compor um reservatório de células persistentes, que podem estar relacionadas a recorrência da infecção. Além disso, já foi comprovado que a formação de biofilme é crucial para o desenvolvimento da vaginose bacteriana, a forma mais comum de infecção vaginal (CZECHOWICZ et al., 2022; MCKLOUD et al., 2021; RODRIGUEZ - CERDEIRA et al., 2019; HARRIOT et al., 2010).

Dentre os fatores do hospedeiro que contribuem para a ocorrência da CVV, destacam-se as variações hormonais fisiológicas (ex. ciclo menstrual e gravidez), bem como aquelas induzidas por anticoncepcionais (HE et al., 2021; RODRÍGUEZ-CERDEIRA et al., 2020; GONÇALVES, et al., 2016). Sabe-se que os hormônios sexuais femininos atuam sobre a função imunológica do hospedeiro e interferem na capacidade de adesão e invasão ao tecido do hospedeiro pelo fungo (KUMWENDA et al., 2022). O estrogênio pode aumentar a virulência de *Candida* por meio do escape do sistema imunológico, impedindo a fagocitose, além de aumentar a capacidade de formação de tubo germinativo e sua adesão às células epiteliais vaginais (HE et al., 2021; LUAN et al., 2020; GONÇALVES et al., 2019). A progesterona, por sua vez, pode modular a formação do biofilme de *C. albicans*, reduzir sua capacidade de penetração no epitélio vaginal e afetar a expressão de genes, como *BCR1* e *HWPI* envolvidos na adesão e formação de biofilmes (WILLEMS et al., 2020; GONÇALVES et al., 2020; ALVES et al., 2014). Acredita-se ainda que as respostas da levedura à presença desses hormônios é dependente de cepa, podendo inibir, estimular ou

mesmo não afetar o crescimento e filamentação de *Candida* spp. (GONÇALVES et al., 2019; ALVES et al., 2014; CHENG et al., 2006).

Estudos pioneiros sobre o efeito da progesterona e  $\beta$ -estradiol sobre os biofilmes de *Candida* demonstraram que concentrações elevadas de HE em meio acidificado foram capazes de modular os biofilmes através da redução no número de células viáveis e quantificação de biomassa, bem como na alteração da ultraestrutura dos biofilmes, com menor presença de hifas. Além disso, o HE foram capazes de influenciar na expressão de genes relacionados à adesão e formação de biofilmes (GONÇALVES et al., 2020; GONÇALVES et al., 2019; ALVES et al., 2014).

Sabe-se que a capacidade de *Candida* spp. de formar biofilmes é um mecanismo de virulência relevante na patogênese da CVV (RODRIGUEZ-CERDEIRA et al., 2019; HARRIOT et al., 2010). Grande parte dos estudos de biofilmes fúngicos são realizados *in vitro* e, apesar da relevância e auxílio no esclarecimento em muitos aspectos, estes modelos não consideram parâmetros do ambiente e do hospedeiro durante sua caracterização. Por sua vez, 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 relacionadas ao ambiente *in vivo* durante o processo infeccioso (TOMÁS e NADER-MACIAS, 2007).

Pesquisa recente de Cordeiro et al. (2020) propôs o estudo de biofilmes de *Candida* em modelo microcosmos para aprofundar o conhecimento da CVV, mostrando que esse modelo é adequado ao estudo em sítios anatômicos com microbiota complexa, como o ambiente vaginal. Modelos de estudo de biofilmes que compreendem maior número de parâmetros ambientais, como o microcosmos, são bastante utilizados para estudos com a cavidade oral. Esse tipo de modelo permite a observação do papel da microbiota residente no controle dos patógenos, e a influência de condições nutritivas e físico-químicas destes ambientes, bem como o impacto destes microcosmos na virulência e resposta aos antifúngicos (KOOPMAN et al., 2015; LEBEAUX et al., 2013; COENYE; NELIS, 2010).

No presente estudo, das 83 amostras colhidas de pacientes com sinais e/ou sintomas sugestivos de CVV, aproximadamente um quarto delas foram positivas ao exame micológico. Embora os dados disponíveis sejam fragmentados e escassos, estudos prévios conduzidos no Brasil mostram que a prevalência da doença é de aproximadamente 18%, variando de 12,5 a 22% no Nordeste do país – região em que esta pesquisa foi conduzida. Outros estudos realizados no país também mostram uma prevalência que variou de 13 a 23% (CARVALHO

et al., 2021; BRANDÃO et al., 2018; BRANDOLT et al., 2017; BOATTO et al., 2016). Nesta pesquisa, *C. albicans* e *C. glabrata* foram as únicas espécies isoladas, sendo a primeira mais abundante (90%). Estes resultados corroboram com diversos estudos que mostram a superioridade da quantidade de isolados de *C. albicans* em pacientes com CVV, sendo isoladas em até 82,5% das amostras positivas para *Candida* spp. Ainda nesses estudos, a espécie *C. glabrata* foi a segunda mais isolada, responsável por até 20% dos casos. (BRANDOLT et al., 2017; BOATTO et al., 2016; FORNARI et al., 2016).

No presente estudo foram usadas concentrações fisiológicas de progesterona e estradiol encontradas no ciclo menstrual (GONÇALVES et al., 2019) sobre biofilmes e células planctônicas de *Candida* spp. Observou-se que a presença dos HE foi capaz de modular o desenvolvimento de biofilmes de *Candida* spp., afetar a produção de células persistentes a partir de biofilmes maduros de *Candida* spp., e influenciar na sensibilidade de células planctônicas e biofilmes de *C. albicans* frente ao fluconazol e clotrimazol.

Nas análises realizadas sobre o efeito do HE nos biofilmes de *Candida* spp., foram utilizados três diferentes modelos de cultivo: BMi, formado a partir da secreção vaginal e cultivado com meio que simula o ambiente vaginal; BMo-MSFV, com inóculo a partir de isolado de *Candida* spp. e formado em meio de cultura que simula o ambiente vaginal; e BMo-RPMI 1640, com inóculo a partir de isolado de *Candida* spp. e formado em meio quimicamente definido e pH 7,0. Nossos achados mostram que a presença de HE, mesmo em concentrações fisiológicas, foi capaz de modular o número células viáveis e a biomassa nos biofilmes de *Candida*, sendo esses efeitos mais detectados nos modelos mais próximos do ambiente vaginal.

Alves et al. (2014) demonstraram que progesterona (2 $\mu$ M) reduziu o número de células viáveis, a biomassa e alterou a ultraestrutura (com a redução de hifas) nos biofilmes de *Candida*. Além disso, reduziu a expressão dos genes *BCR1* e *HWPI*, relacionados à adesão e formação de biofilmes de *Candida* em modelo de estudo de epitélio vaginal reconstituído (ALVES et al., 2014). Por sua vez, Gonçalves et al. (2019) avaliaram as concentrações hormonais dos picos do ciclo menstrual e do terceiro trimestre da gravidez em biofilmes de *Candida* cultivados por 24 horas. Foram observadas reduções no número de células viáveis e na quantificação de biomassa dos biofilmes, nas concentrações mais elevadas a redução foi maior na biomassa. Não houve diferença de ação entre estradiol e progesterona. A presença dos HE reduziram a sensibilidade de *C. albicans* ao fluconazol e voriconazol, tanto em células planctônicas como em biofilmes (GONÇALVES et al., 2019).

Outro trabalho conduzido por Gonçalves e colaboradores (2020) mostrou uma análise da expressão dos genes sob da influência do pH 4,0 e da presença de progesterona (2 $\mu$ M) em biofilmes de *Candida*. A presença do hormônio reduziu a capacidade da cepa em formar biofilmes, afetando o número de células viáveis, a biomassa e reduziu a produção de hifas no biofilme. A análise transcriptômica desse estudo revelou que a redução na capacidade de formar biofilmes após a exposição a progesterona foi consistente com a transcrição reduzida de vários genes-chave necessários para a formação máxima de biofilme, incluindo a transcrição regulador Tec1 (fator de transcrição envolvido prliferação de células dos biofilmes e formação de matriz extracelular) e vários de seus genes-alvo. A exposição à progesterona também reduziu significativamente a suscetibilidade de células do biofilme ao fluconazol, atribuível ao aumento na expressão do gene *CDRI* (GONÇALVES et al., 2020).

Os resultados obtidos quanto à produção de células viáveis e biomassa, a partir dos modelos de biofilme BMi e BMo-MSFV, divergiram dos resultados observados na literatura (GONÇALVES et al., 2020; GONÇALVES et al., 2019; ALVES et al., 2014), principalmente quanto ao aumento da quantificação de biomassa nas condições de suplementação com HE. Não obstante, os resultados obtidos a partir do modelo BMo-RPMI 1640 corroboram com os dados já disponíveis da literatura, em que os HE mostram pouca influência sobre o aumento do número de células, mas reduzem a biomassa dos biofilmes de *Candida* spp. (GONÇALVES et al., 2020). Assim como observado por outros autores, a resposta a HE é cepa-dependente, sem distinção entre os efeitos produzidos por  $\beta$ -estradiol, progesterona ou ambos em combinação (GONÇALVES et al., 2020; ALVES et al., 2014).

O presente estudo também mostrou que o modelo BMi foi capaz de promover a produção de células persistentes de *C. albicans* e *C. glabrata* oriundas de CVV. As células persistentes são uma subpopulação celular nos biofilmes microbianos que, devido ao metabolismo reduzido, apresentam tolerância a altas concentrações de antimicrobianos. A partir dessa população, pode haver a colonização de outros locais, fator que pode colaborar na cronicidade das doenças mediadas por biofilmes (POLKE et al., 2015; LAFLEUR, 2006). Os fenômenos químicos que orquestram o fenótipo “dormente” ainda não foram completamente elucidados, porém é atribuído, dentre outros, à níveis reduzidos de ATP e a ativação de vias de resposta ao estresse causado por condições ambientais adversas (WAINWRIGHT; NAKOUTI, 2021). WU e colaboradores (2020) recuperaram células persistentes a partir de biofilmes da mucosa de ratas infectadas com cepas de origem CVV e demonstraram que esse pode ser um dos meios pelas quais a doença tem um caráter recalcitrante (WU et al., 2020).

Ao nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo que mostra a recuperação de células persistentes a partir de biofilmes de *Candida albicans* oriundas de CVV em modelo *in vitro*.

Também foi demonstrado no presente estudo que *C. glabrata*, oriunda de espécimes clínicos de CVV, foi capaz de produzir células persistentes em todos os modelos de cultivo avaliados. No entanto, pesquisas anteriores apresentaram que biofilmes de *C. glabrata* possuem baixa competência em produzir células persistentes (WUYTS et al., 2018; AL-DHAHERI; DOUGLAS, 2008). A capacidade de produção de células persistentes por biofilmes de *C. glabrata* relatada aqui pode estar associada à uma característica de origem da cepa. A dinâmica do ambiente vaginal (pH ácido, microbiota, presença de glicogênio e ácido láctico etc.) pode desencadear a ativação de mecanismos de estresse na célula, que responde com maior produção de células persistentes. Esse achado reforça também a conexão da presença de dessa subpopulação de células com a propriedade recalcitrante da doença e o aumento nas falhas terapêuticas (ARASTEHFAR et al., 2023; WAINWRIGHT; NAKOUTI, 2021). Contudo, essa é uma nova vertente que merece ser estudada com maior profundidade e não pôde ser totalmente explorada neste trabalho.

Foi demonstrado neste estudo também que os HE estimularam a produção de células persistentes no modelo BMi. Contrariamente, a presença dos HE reduziu a produção de células persistentes em biofilmes cultivados no modelo BMo-RPMI 1640. Os dados aqui mostrados permitem inferir que, na presença de HE, a produção de células persistentes pode estar relacionada às condições de crescimento dos biofilmes. Aparentemente, o crescimento em meio ácido complexo que simula a composição do fluido vaginal, bem como a presença de microbiota bacteriana no inóculo iniciador (BMi), parecem ter estimulado maior formação de células persistentes na presença de HE. Os mecanismos microbiológicos envolvidos nesse processo podem ser uma nova janela de conhecimento a ser explorada a partir dos achados apresentados neste estudo.

Os dados aqui mostrados permitem inferir que a magnitude de modulação dos HE sobre biofilmes de *Candida* está relacionada às condições de crescimento em que esses biofilmes foram postos. Condições em que há parâmetros ambientais similares aos encontrados no ambiente da infecção, que, por consequência, geram maior estresse às células, tornam os biofilmes mais sensíveis à influência hormonal. Ao passo que os biofilmes crescidos em condições menos estressantes (BMo -RPMI) são menos sensíveis à influência dos HE.

Ainda, os resultados obtidos neste estudo referentes à sensibilidade de *Candida albicans* em meios de cultivo com pH distintos corroboram com estudos de Spitzer et al. (2018) e Danby et al. (2012) que avaliaram a sensibilidade de *C. albicans* e *C. glabrata* oriundas de pacientes de CVV frente aos antifúngicos mais utilizados na clínica contra a candidíase. Eles demonstraram que as CIMs para todos os antifúngicos usados foram significativamente mais altos quando testados a pH 4, e concluíram que os antifúngicos têm reduzido sua potência *in vitro* quando testados a pH mais baixo (SPITIZER et al., 2018; DANBY et al., 2012). As implicações clínicas desses resultados não são claras, mas deve-se ressaltar que à medida que antifúngicos relevantes no tratamento de CVV não estão sendo testados no nível do pH vaginal, muito sobre a real eficácia dessas drogas no ambiente vaginal está sendo ignorada. Isso pode explicar por que alguns medicamentos antifúngicos podem não ser eficazes *in vivo* com um pH vaginal fisiológico mais ácido (DANBY et al., 2012).

Não houve diferenças na influência dos HE nos testes de sensibilidade realizados em células planctônicas de *C. albicans* cultivadas em MSFV ou RPMI 1640. Os dados obtidos aqui parecem correlacionar mais a modulação dos HE à cepa teste que ao meio de cultivo que fora utilizado. A suplementação com HE em níveis fisiológicos, por sua vez, reduziu o número de UFC/mL e quantificação de biomassa nos biofilmes de *C. albicans* em uma proporção maior que seus correspondentes sem suplementação hormonal. Os dados obtidos neste estudo foram divergentes ao observados na literatura. A pesquisa de Gonçalves e colaboradores (2019), ao testar concentrações fisiológicas dos HE, não encontrou diferenças significativas no perfil de sensibilidade de células planctônicas e biofilmes de *C. albicans*. Porém, em concentrações encontradas no terceiro trimestre da gravidez, houve aumento significativo na tolerância das cepas testadas frente aos antifúngicos fluconazol e voriconazol (GONÇALVES et al., 2019). Assim, pode-se associar o fenômeno de redução de sensibilidade em cepas de *C. albicans* a uma dependência dos níveis de hormônios presentes.

Nesse estudo foi mostrado que o uso de modelos de biofilmes *in vitro* que mimetizam a mucosa vaginal são determinantes nos resultados obtidos e na compreensão sobre a fisiologia e as estratégias de tolerância aos antifúngicos na CVV. Não obstante, deve-se ressaltar que o fornecimento desses elementos que reproduzem o ambiente vaginal é importante ao ponto de determinarem modulações distintas para um fator crucial na fisiopatologia da doença, que são os hormônios sexuais femininos.



## 9. CONCLUSÕES

- 1) Hormônios esteroides, em concentrações fisiológicas do ciclo menstrual, influenciam no desenvolvimento de biofilmes de *Candida* spp.
- 2) Biofilmes de *Candida* spp. em microcosmos apresentam menor número de UFC/mL, maior biomassa e células persistentes na presença de hormônios esteroides;
- 3) Biofilmes de *Candida* spp. monoespécie cultivados em MSFV apresentam maior número de UFC/mL e biomassa, mas não alteram a produção de células persistentes na presença de hormônios esteroides;
- 4) Biofilmes de *Candida* spp. monoespécie cultivados em RPMI 1640 não alteram o número de UFC/mL, mas reduzem a biomassa e produção de células persistentes na presença de hormônios esteroides;
- 5) O modelo de biofilmes em microcosmos de *Candida* spp. é capaz de produzir células persistentes;
- 6) *C. albicans* apresenta maior tolerância aos antifúngicos AMB, FLC, CLO, MIC e NIS quando cultivada em meio simulador de fluido vaginal.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT J. Clinical and microscopic diagnosis of vaginal yeast infection: a prospective analysis. **Ann Emerg Med.**, [S.L.], v.25, n. 5, p. 587–591. 1995
- ACHKAR J. M.; FRIES, B. C. *Candida* infections of the genitourinary tract. **Clin Microbiol Rev.**, [S.L.], v. 23, n.2, p. 253-273. doi: 10.1128/CMR.00076-09. 2010
- ALVES, C. T. Effect of progesterone on *Candida albicans* vaginal pathogenicity. **International Journal of Medical Microbiology**, [S.L.], v. 304, n. 8, p.1011-1017, 2014.
- AL-DHAHERI, R. S.; DOUGLAS, L. J. Absence of Amphotericin B-Tolerant Persister Cells in Biofilms of Some *Candida* Species. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 52, n. 5, p. 1884-1887, doi: 10.1128/aac.01473-07. 2008
- ARASTEHFAR, A.; DANESHNIA, F.; CABRERA, N.; PENALVA-LOPEZ, S.; SARATHY, J.; ZIMMERMAN, M.; SHOR, E.; PERLIN, D. S. Macrophage internalization creates a multidrug-tolerant fungal persister reservoir and facilitates the emergence of drug resistance. **Nature Communications**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 1183, doi: 10.1038/s41467-023-36882-6. 2023
- ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; MONTANARO, L. Implant infections: adhesion, biofilm formation and immune evasion. **Nat Rev Microbiol.**, [S.L.], v. 16, n. 7, p. 397-409. doi: 10.1038/s41579-018-0019-y. 2018
- AURIEMMA R. S., SCAIRATI R., DEL VECCHIO G., LICCARDI A., VERDE N., PIRCHIO R., PIVONELLO R., ERCOLINI D., COLAO A. The Vaginal Microbiome: A Long Urogenital Colonization Throughout Woman Life. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, [S.L.], v. 11, p. 686167. doi: 10.3389/fcimb.2021.686167. 2021
- BATAINEH, M. T. A.; CACCIATORE, S.; SEMREEN, M. H.; DASH, N. R.; SOARES, N. C.; ZHU, X.; MOUSA, M. K.; SALAM, J. S. A.; ZERBINI, L. F.; HAJJO, R. Exploring the effect of estrogen on *Candida albicans* hyphal cell wall glycans and ergosterol synthesis. **Frontiers In Cellular And Infection Microbiology**, [S.L.], v. 12, p. 1-10, 21. doi: 10.3389/fcimb.2022.977157. 2022
- BITEW A., ABEBAW Y. Vulvovaginal candidiasis: species distribution of *Candida* and their antifungal susceptibility pattern. **BMC Womens Health.**, [S.L.], v. 15, n. 18, p.94 doi: 10.1186/s12905-018-0607-z. 2018
- 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, 201.
- BRADFORD, L. L.; RAVEL, J. The vaginal mycobiome: A contemporary perspective on fungi in women's health and diseases, **Virulence**, [S.L.], v.8, n.3, p.342-351, 2017.

BRANDÃO, L. D. S.; BONIEK, D.; RESENDE, S. M. A.; DA MATA, F. M. R.; DE AZEVEDO, P. R. M.; FERNANDES, J. V.; ANDRADE, V. S. Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida* species among pregnant women attending a school maternity at Natal, Brazil. **Lett Appl Microbiol.** [S.L.], v., 67, n. 3, p. 285-291. doi: 10.1111/lam.13034. 2018

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

BRANDT, M. E.; LOCKHART, S. R. Recent Taxonomic Developments with *Candida* and Other Opportunistic Yeasts. **Curr Fungal Infect Rep.**, [S.L.], v. 6, n. 3, p.170-177. doi: 10.1007/s12281-012-0094-x. 2012

CARVALHO, G. C.; DE OLIVEIRA, R. A. P.; ARAUJO, V. H. S.; SÁBIO, R. M.; DE CARVALHO, L. R.; BAUAB, T. M.; CORRÊA, I.; CHORILLI, M. Prevalence of vulvovaginal candidiasis in Brazil: A systematic review. **Med Mycol.**, [S.L.], v. 4, n. 59. p. 946-957. doi: 10.1093/mmy/myab034. 2021

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

CASTELO-BRANCO, D. S. C. M.; AMANDO, B. R.; OCADAQUE, C. J.; AGUIAR, L.; PAIVA, D. D. Q.; DIÓGENES, E. M.; GUEDES, G. M. M.; COSTA, C. L., SANTOS-FILHO, A. S. P.; ANDRADE, A. R. C.; CORDEIRO, R. A.; ROCHA, M. F. G.; SIDRIM, J. J. C. Mini-review: from *in vitro* to *ex vivo* studies: an overview of alternative methods for the study of medical biofilms. **Biofouling**. [S.L.], v. 36, n. 9, p. 1129-1148. doi: 10.1080/08927014.2020.1859499. 2020

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

CECCARANI, C.; FOSCHI, C.; PAROLIN, C.; D'ANTUONO, A.; GASPARI, V.; CONSOLANDI, C.; LAGHI, L.; CAMBONI, T.; VITALI, B.; SEVERGNINI, M.; MARANGONI, A. Diversity of vaginal microbiome and metabolome during genital infections. **Sci Rep**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 14095. doi: 10.1038/s41598-019-50410-x. 2019.

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

CHENG, G.; YEATER, K. M.; HOYER, L. L. Cellular and molecular biology of *Candida albicans* estrogen response. **Eukaryot Cell.**, [S.L.], v. 5, n. 1, p. 180-191. doi: 10.1128/EC.5.1.180-191.2006. 2006

CHEW, S.Y.; THAN, L.T. Vulvovaginal Candidosis: Contemporary Challenges and the Future of Prophylactic and Therapeutic Approaches. **Mycoses**, [S.L.], v. 59, n. 5, p. 262-273. doi: 10.1111/myc.12455. 2016

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard M27-A3., Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 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.

CORDEIRO, R.A.; SERPA, R.; ALEXANDRE, C.F.U.; MARQUES, F.J.F.; MELO, C.V.S.; FRANCO, J.S.; EVANGELISTA, A.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. 159, p. 1-10, 2015.

CORDEIRO, R. A.; ANDRADE, A. R. C.; PORTELA, F. V. M.; PEREIRA, L. M. G.; MOURA, S. G. B.; SAMPAIO, M. D.; PEREIRA, E. M. A.; GUEDES, G. M. M.; BANDEIRA, S. P.; LIMA-NETO, R. G. Proposal for a microcosm biofilm model for the study of vulvovaginal candidiasis. **Biofouling**, [S.L.], v. 36, n. 5, p. 610-620, doi: 10.1080/08927014.2020.1785435. 2020

CONSTERTON, J. W., GEESEY, G. G., CHENG, K. J. How bacteria stick. **Sci. Am.**, [S.L.], v. 238, n. 1, p. 86-95. 1978.

CZECHOWICZ, P.; NOWICKA, J.; GOŚCINIAK, G. Virulence Factors of *Candida* spp. and Host Immune Response Important in the Pathogenesis of Vulvovaginal Candidiasis. **Int. J. Mol. Sci.**, [S.L.], v. 23, n.11 p. 5895. doi: 10.3390/ijms23115895. 2022

DANBY, C. S.; BOIKOV, D.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; SOBEL, J. D. Effect of pH on in vitro susceptibility of *Candida glabrata* and *Candida albicans* to 11 antifungal agents and implications for clinical use. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [S.L.], v. 56, n. 3, p. 1403-1406, doi: 10.1128/aac.05025-11. 2012

D'ENFERT, C.; KAUNE, A. K.; ALABAN, L. R.; CHAKRABORTY, S.; COLE, N.; DELAVY, M.; KOSMALA, D.; MARSAUX, B.; FRÓIS-MARTINS, R.; MORELLI, M.; ROSATI, D.; VALENTINE, M.; XIE, Z.; EMRITLOLL, Y.; WARN, P. A.; BEQUET, F.; BOUGNOUX, M. E.; BORNES, S.; GRESNIGT, M. S.; HUBE, B.; JACOBSEN, I. D.; LEGRAND, M.; LEIBUNDGUT-LANDMANN, S.; MANICHANH, C.; MUNRO, C. A.; NETEA, M. G.; QUEIROZ, K.; ROGET, K.; THOMAS, V.; THORAL, C.; VAN DEN ABEELE, P.; WALKER, A. W.; BROWN, A. J. P. The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. **FEMS Microbiol Rev.**, [S.L.], v. 45, n. 3, p. fuaa060. doi: 10.1093/femsre/fuaa060. 2021

DENEGA I., D'ENFERT C., BACHELLIER-BASSI S. *Candida albicans* biofilms are generally devoid of persister cells. **Antimicrob Agents Chemother**, [S.L.], v. 63, n.5 p. e01979-18. doi: 10.1128/AAC.01979-18. 2019.

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

- DONDERS, G. G.; GRINCEVICIENE, S.; BELLEN, G.; JAEGER, M.; OEVER, J. T.; NETEA, M. G. Is non-response to fluconazole maintenance therapy for recurrent *Candida* vaginitis related to sensitization to atopic reactions? **American Journal Of Reproductive Immunology**, [S.L.], v. 79, n. 4, p. e12811. doi: 10.1111/aji.12811. 2018
- DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev.**, [S.L.], v. 15, n. 2, p. 167-193. doi: 10.1128/CMR.15.2.167-193. 2002.
- ECKERT, L. O.; HAWES, S. E.; STEVENS, C. E.; KOUTSKY, L. A.; ESCHENBACH, D. A.; HOLMES, K. K. Vulvovaginal candidiasis: clinical manifestations, risk factors, management algorithm. **Obstet Gynecol.**, [S.L.], v. 92, n. 5. p. 757–765. 1998
- FARR, A.; EFFENDY, I.; TIRRI, B. F.; HOF, H.; MAYSER, P.; PETRICEVIC, L.; RUHNKE, M.; SCHALLER, M.; SCHAEFER, A. P. A.; SUSTR, V. Guideline: vulvovaginal candidosis. **Mycoses**, [S.L.], v. 64, n. 6, p. 583-602. doi: 10.1111/myc.13248. 2021
- FIDEL JR, P.L.; CUTRIGHT, J.; STEELE, C. Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. **Infect Immun.** [S.L.], v. 68, n. 2, p. 651-657. doi: 10.1128/IAI.68.2.651-657. 2000
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J.; SZEWZYK, U.; STEINBERG, P.; RICE, S. A.; KJELLEBERG, S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nat Rev Microbiol.**, [S.L.], v. 11, n. 14, p. 563-575. doi: 10.1038/nrmicro.2016.94. 2016
- 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.
- HAMAD, M.; ABU-ELTEEN, K.H.; GHALEB, M. Estrogen-dependent induction of persistent vaginal candidosis in naïve mice. **Mycoses.** [S.L.], v. 47, n. 7, p. 304-309. doi: 10.1111/j.1439-0507.2004.00994.x. 2004
- 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**, [S.L.], v.156, p. 3635–3644, 2010.
- HE, Y.; TANG, R.; DENG, J.; CAI, T.; HE, P.; WU, J.; CAO, Y. Effects of oestrogen on vulvovaginal candidosis. **Mycoses**, [S.L.], v. 65, n. 1, p. 4-12, doi: 10.1111/myc.13385. 2021
- HONG E., DIXIT S., FIDEL P. L, BRADFORD J., FISCHER G. Vulvovaginal candidiasis as a chronic disease: diagnostic criteria and definition. **J Low Genit Tract Dis.** [S.L.], v. 18, n. 1, p. 31-38. doi: 10.1097/LGT.0b013e318287aced. 2014
- HUANG, G. Regulation of phenotypic transitions in the fungal pathogen *Candida albicans*. **Virulence**, [S.L.], v. 3, n. 3, p.251-261, 2012.

GABRILSKA, R. A.; RUMBAUGH, K. P. Biofilm models of polymicrobial infection. **Future Microbiol.** [S.L.], v. 10, n. 12, p. 1997-2015. doi: 10.2217/fmb.15.109. 2015

GONÇALVES, B.; FERREIRA, C.; CARLOS T. A.; HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; SILVA, S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors, **Critical Reviews in Microbiology.** [S.L.], v. 42, n.6 , p.905-927 doi: 10.3109/1040841X.2015.1091805. 2016

GONÇALVES B., AZEVEDO N. M., HENRIQUES M., SILVA S. Hormones modulate *Candida* vaginal isolates biofilm formation and decrease their susceptibility to azoles and hydrogen peroxide. **Med Mycol.** [S.L.], v.0, n.0, p. 1-10. doi: 10.1093/mmy/myz070. PMID: 31254346. 2019

GONÇALVES B, BERNARDO R, WANG C, SCHRÖDER MS, PEDRO NA, BUTLER G, AZEREDO J, HENRIQUES M, PEREIRA MIRA N, SILVA S. Effect of progesterone on *Candida albicans* biofilm formation under acidic conditions: A transcriptomic analysis. **Int J Med Microbiol.** [S.L.], v. 310, n. 3 p. 51414. doi: 10.1016/j.ijmm.2020.151414. 2020.

JAFARZADEH, L.; RANJBAR, M.; NAZARI, T.; ESHKALETI, M. N.; GHAREHBOLAGH, S. A.; SOBEL, J. D.; MAHMOUDI, S. Vulvovaginal candidiasis: an overview of mycological, clinical, and immunological aspects. **Journal Of Obstetrics And Gynaecology Research**, [S.L.], v. 48, n. 7, p. 1546-1560, doi: 10.1111/jog.15267. 2022.

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

KINSMAN, O. S.; PITBLADO, K.; COULSON, C. J. Effect of mammalian steroid hormones and luteinizing hormone on the germination of *Candida albicans* and implications for vaginal candidosis. **Mycoses.** [S.L.], v. 31, n. 12, p.617-626. doi: 10.1111/j.1439-0507.1988.tb04416.x. 1988

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.

KUHN, D. M.; GEORGE, T.; CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. **Antimicrob Agents Chemother.** [S.L.], v. 46, n. 6, p. 1773-1780. doi: 10.1128/AAC.46.6.1773-1780.2002. 2002.

KUMWENDA, P.; COTTIER, F.; HENDRY, A. C.; KNEAFSEY, D.; KEEVAN, B.; GALLAGHER, H.; TSAI, H.; HALL, R. A. Estrogen promotes innate immune evasion of *Candida albicans* through inactivation of the alternative complement system. **Cell Reports**, [S.L.], v. 38, n. 1, p. 110183. doi: 10.1016/j.celrep.2021.110183. 2022.

LAFLEUR, M. D., KUMAMOTO, C. A., AND LEWIS, K. *Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells. **Antimicrob. Agents Chemother.** [S.L.], v. 50,p. 3839–3846. doi: 10.1128/AAC.00684-06. 2006

- LASARTE, S.; ELSNER, D.; GUÍA-GONZÁLEZ, M.; RAMOS-MEDINA, R.; SÁNCHEZ-RAMÓN, S.; ESPONDA, P.; MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M.A.; RELLOSO, M.. Female sex hormones regulate the Th17 immune response to sperm and *Candida albicans*. **Human Reproduction**, [S.L.], v. 28, n. 12, p. 3283-3291. doi: 10.1093/humrep/det348. 2013
- LEBEAUX, D.; CHAUHAN, A.; RENDUELES, O.; BELOIN, C. From *in vitro* to *in vivo* models of bacterial biofilm-related infections. **Pathogens**, [S.L.], 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**, [S.L.], 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**, [S.L.], v. 45, n. 2, p. 515-522, 2014.
- LOPES, J. P.; LIONAKIS, M. S. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 89-121. doi:10.1080/21505594.2021.2019950. 2021.
- LUAN, T.; LIU, X.; MAO, P.; WANG, X.; RUI, C.; YAN, L.; WANG, Y.; FAN, C.; LI, P.; ZENG, X. The role of 17 $\beta$ -estrogen in *Candida albicans* adhesion on human vaginal epithelial cells via fak phosphorylation. **Mycopathologia**, [S.L.], v. 185, n. 3, p. 425-438. doi: 10.1007/s11046-020-00440-1. 2020
- MAKANJUOLA, O.; BONGOMIN, F.; FAYEMIWO, S. An update on the roles of non-albicans *Candida* species in vulvovaginitis. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 4, n. 4, p. 121. doi:10.3390/jof4040121. 2018
- MASCARENHAS, R. E. M.; MACHADO, M. S. C.; SILVA, B. F. B. C.; PIMENTEL, R. F. W.; FERREIRA, T. T.; LEONI, F. M. S.; GRASSI, M. F. R. Prevalence and risk factors for bacterial vaginosis and other vulvovaginitis in a population of sexually active adolescents from Salvador, Bahia, Brazil. **Infectious Diseases In Obstetrics And Gynecology**, [S.L.], v. 2012, p. 1-6. doi: 10.1155/2012/378640. 2012
- MCKLOUD, E.; DELANEY, C.; SHERRY, L.; KEAN, R.; WILLIAMS, S.; METCALFE, R.; THOMAS, R.; RICHARDSON, R.; GERASIMIDIS, K.; NILE, C. J. Recurrent Vulvovaginal Candidiasis: a dynamic interkingdom biofilm disease of *Candida* and *Lactobacillus*. **Msystems**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. e0062221. doi: [10.1128/msystems.00622-21](https://doi.org/10.1128/msystems.00622-21). 2021
- 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**, [S.L.], 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**, [S.L.], v. 13, n2, p.1006-1014, 2017.

MUZNY, C. A.; SCHWEBKE, J. R. Biofilms: an underappreciated mechanism of treatment failure and recurrence in vaginal infections. **Clinical Infectious Diseases**, [S.L.], v. 61, n. 4, p. 601-606. doi: 10.1093/cid/civ353. 2015

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

OLIVEIRA, F. A.; PFLEGER, V.; LANG, K.; HEUKELBACH, J.; MIRALLES, I.; FRAGA, F.; SOUSA, A. Q.; STOFFLER-MEILICKE, M.; IGNATIUS, R.; KERR, L. F. S. Sexually transmitted infections, bacterial vaginosis, and candidiasis in women of reproductive age in rural Northeast Brazil: a population-based study. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 102, n. 6, p. 751-756. doi: 10.1590/s0074-02762007000600015. 2007

PRASAD, R.; DEVAUX, F.; DHAMGAYE, S.; BANERJEE, D. Response of pathogenic and non-pathogenic yeasts to steroids. **The Journal Of Steroid Biochemistry And Molecular Biology**, [S.L.], v. 129, n. 1-2, p. 61-69. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.11.011. 2012

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

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

RICHARDSON, J. P.; WILLEMS, H. M. E.; MOYES, D. L.; SHOAIE, S.; BARKER, K. S.; TAN, S. L.; PALMER, G. E.; HUBE, B.; NAGLIK, J. R.; PETERS, B. M. Candidalysin drives epithelial signaling, neutrophil recruitment, and immunopathology at the vaginal mucosa. **Infection And Immunity**, [S.L.], v. 86, n. 2, p. e00645-17. doi: 10.1128/iai.00645-17. 2018

RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C.; GREGORIO, M. C.; MOLARES-VILA, A.; LÓPEZ-BARCENAS, A.; FABBROCINI, G.; BARDHI, B.; SINANI, A.; SÁNCHEZ-BLANCO, E.; ARENAS-GUZMÁN, R.; HERNANDEZ-CASTRO, R. Biofilms and vulvovaginal candidiasis. **Colloids Surf B Biointerfaces**. [S.L.], v. 1n. 174, p. 110-125. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018. 2019

RODRÍGUEZ-CERDEIRA, C.; MARTÍNEZ-HERRERA, E.; CARNERO-GREGORIO, M.; LÓPEZ-BARCENAS, A.; FABBROCINI, G.; FIDA, M.; EL-SAMAHY, M.; GONZÁLEZ-CESPÓN, J. L. Pathogenesis and clinical relevance of *Candida* biofilms in vulvovaginal candidiasis. **Front Microbiol**. [S.L.], v. 11, n. 11, p. 544480. doi: 10.3389/fmicb.2020.544480. 2020

RUDNEY, J. D.; CHEN, R.; LENTON, P.; LI, J.; LI, Y.; JONES, R. S.; REILLY, C.; FOK, A. S.; APARICIO, C. A reproducible oral microcosm biofilm model for testing dental materials. **J Appl Microbiol**. [S.L.], v. 113, n. 6, p. 1540-1553. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05439.x. 2012

RUMBAUGH, K. P.; SAUER, K. Biofilm dispersion. **Nat Rev Microbiol**. [S.L.], v. 18, n.10, p.571-586. doi: 10.1038/s41579-020-0385-0. 2020



SARDI, J. C. O.; SILVA, D. R.; ANIBAL, P. C.; BALDIN, J. J. C. M. C.; RAMALHO, S. R.; ROSALEN, P. L.; MACEDO, M. L. R.; HOFLING, J. F. Vulvovaginal Candidiasis: epidemiology and risk factors, pathogenesis, resistance, and new therapeutic options. **Current Fungal Infection Reports**, [S.L.], v. 15, n. 1, p. 32-40. doi: 10.1007/s12281-021-00415-9. 2021

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**, [S.L.], 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**, [S.L.], v. 61, n. 9, p.1-14, 2017.

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

SILVERTHORN, D. **Fisiologia Humana: Uma Abordagem Integrada**, 7ª Edição, Artmed, 2017.

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

SOBEL, J. D.; FARO, S.; FORCE, R.W.; FOXMAN, B.; LEDGER, W. J.; NYIRJESY, P. R.; REED, B. D.; SUMMERS, P. R. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. **Am J Obstet Gynecol**. [S.L.], v. 178, n. 2, p. 203-211. doi: 10.1016/s0002-9378(98)80001-x. 1998

SOBEL J. D. Vulvovaginal candidosis. **Lancet**. [S.L.], v. 9, n. 369, p.1961-1971. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60917-9. 2007

\_\_\_\_\_ Genital candidiasis. **Medicine**, [S.L.], v. 42, n. 7, p.364-368, 2014.

\_\_\_\_\_ Recurrent vulvovaginal candidiasis. **Am J Obstet Gynecol**. [S.L.], v. 214, n. 1, p.15-21. doi: 10.1016/j.ajog.2015.06.067. Epub 2015 Jul 9. PMID: 26164695. 2016

SPACEK, J.; BUCHTA, V.; JÍLEK, P.; FÖRSTL, M. Clinical aspects and luteal phase assessment in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. **European Journal Of Obstetrics & Gynecology And Reproductive Biology**, [S.L.], v. 131, n. 2, p. 198-202. doi: 10.1016/j.ejogrb.2006.03.009. 2007

SPITZER, M.; WIEDERHOLD, N. P. Reduced antifungal susceptibility of vulvovaginal *Candida* species at normal vaginal pH levels: Clinical Implications. **J Low Genit Tract Dis**[S.L.], v. 22, n. 2, p. 152-158. doi: 10.1097/LGT.0000000000000383. 2018

SUDBERY, P. E. Growth of *Candida albicans* hyphae. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 9, n. 10, p. 737-748, doi: 10.1038/nrmicro2636. 2011

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.

TANEJA, V. Sex Hormones Determine Immune Response. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 9, p. 1-15. doi: 10.3389/fimmu.2018.01931. 2018

TARRY, W.; FISHER, M.; SHEN, S.; MAWHINNEY, M. *Candida albicans*: the estrogen target for vaginal colonization. **Journal Of Surgical Research**, [S.L.], v. 129, n. 2, p. 278-282. doi: 10.1016/j.jss.2005.05.019. 2005

TOMAS, 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. pp. 732–739, 2007.

TORTELLI, B. A.; LEWIS, W. G.; ALLSWORTH, J. E.; MEMBER-MENEH, N.; FOSTER, L. R.; RENO, H. E.; PEIPERT, J. F.; FAY, J. C.; LEWIS, A. L. Associations between the vaginal microbiome and *Candida* colonization in women of reproductive age. **Am J Obstet Gynecol**. [S.L.], v. 222, n. 5, p. 471.e1-471.e9. doi: 10.1016/j.ajog.2019.10.008. 2020.

TOURNU, H; VAN DIJCK, P. *Candida* Biofilms and the Host: models and new concepts for eradication. **International Journal Of Microbiology**, [S.L.], v. 2012, p. 1-16. doi: 10.1155/2012/845352. 2012.

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

VERARDI, G.; CENCI, M. S.; MASKE, T. T.; WEBBER, B.; SANTOS, L. R. Antiseptics and microcosm biofilm formation on titanium surfaces. **Braz Oral Res**. [S.L.], v. 30, n. 1, p. 1-6. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0030. 2016.

WAINWRIGHT, J.; HOBBS, G.; NAKOUTI, I. Persister cells: formation, resuscitation and combative therapies. **Arch Microbiol**. [S.L.], v. 203, n. 10, p. 5899-5906. doi: 10.1007/s00203-021-02585-z. 2021

WALL, G.; MONTELONGO-JAUREGUI, D.; VIDAL BONIFACIO, B.; LOPEZ-RIBOT, J.L.; UPPULURI, P. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. **Curr Opin Microbiol**. [S.L.], v. 52, n. 0, p. 1-6. doi: 10.1016/j.mib.2019.04.001. 2019

WIJGERT, J. H. H. M. The Vaginal Microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization? **Plos One**, [S.L.], 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**, [S.L.], v. 168, n. 9-10, p.859-864, 2017.

WILLEMS, H. M. E.; AHMED, S. S.; LIU, J.; XU, Z.; PETERS, B. M. Vulvovaginal candidiasis: a current understanding and burning questions. **J. Fungi.**, [S.L.], v. 6, n. 1:27. <https://doi.org/10.3390/jof6010027> 2020

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**, [S.L.], v.5, p. 224-234, 2013.

WU, X.; ZHANG, S.; LI, H.; SHEN, L.; DONG, C.; SUN, Y.; CHEN, H.; XU, B.; ZHUANG, W.; DEIGHTON, M.; QU, Y. Biofilm formation of *Candida albicans* facilitates fungal infiltration and persister cell formation in vaginal candidiasis. **Front. Microbiol.** [S.L.], v. 11, p. 1117. doi: 10.3389/fmicb.2020.01117. 2020

WUYTS, J.; VAN DIJCK, P.; HOLTAPPELS, M. Fungal persister cells: The basis for recalcitrant infections? **PLoS Pathog.** [S.L.], v. 14, n. 10, p. e1007301. doi: 10.1371/journal.ppat.1007301. 2018.

YANO, J.; SOBEL, J. D.; NYIRJESY, P.; SOBEL, R.; WILLIAMS, V. L.; YU, Q.; NOVERR, M. C.; FIDEL, P. L. Current patient perspectives of vulvovaginal candidiasis: incidence, symptoms, management and post-treatment outcomes. **Bmc Women'S Health**, [S.L.], v. 19, n. 48, p. 1-9. doi: 10.1186/s12905-019-0748-8. 2019

ZHANG, X.; ESSMANN, M.; BURT, E. T.; LARSEN B. Estrogen effects on *Candida albicans*: a potential virulence-regulating mechanism. **J Infect Dis.** [S.L.], v. 181, n. 4, p. 1441-1446. doi: 10.1086/315406. 2000

## 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: \_\_\_\_\_

## ANEXOS

## ANEXO -A

## Componentes dos meios MSFV (Meio Simulador de Fluido Vaginal) e RPMI 1640 1640

Componentes	Meio Simulador de Fluido Vaginal <sup>a</sup> (g/L)	RPMI 1640 1640 (g/L)
Glicose	10	2
NaCl	3,5	6,0
KCl	1,5	0,4
Ácido Lático	2	-
Ácido Acético	1	-
Cisteína	0,5g	-
Ureia	0,5	-
Tween 80	1,064	-
Glicogênio	5g	-
Sulfato de Magnésio	-	0,049
Nitrato de Cálcio	-	0,1
Fosfato de sódio	-	0,8
VITAMINAS	-	*
AMINOÁCIDOS	-	**
pH	4,2 – 4,5	7,0

<sup>a</sup> Adaptado de Tomás e Nader-Macías (2007). Redução do Glicogênio de 10g/L para 5g/L.

\* Biotina 0,0002; D-pantotênico 0,00025; Riboflavina 0,002; Ácido fólico 0,001; PABA 0,001; Piridoxina HCl 0,001; Niacinamida 0,001; Cloreto de colina 0,003; Mio-inositol 0,035; Tiamina HCl 0,001; Vitamina B12 0,000005.

\*\*L-isoleucina 0,050; L-leucina 0,050; L-asparagina 0,05; L-arginina 0,2; Ácido L-glutâmico: 0,02; L-arginina 0,2; Ácido L-aspártico 0,02; L-cistina 0,0652; L-glutamina 0,3; Glicina 0,01; L-histidina 0,015; L-hidroxiprolina 0,020; L-lisina 0,04; L-metionina 0,015; L-fenilalanina 0,015; L-prolina 0,02; L-serina 0,03, L-treonina 0,02; L-triptofano 0,005; L-tirosina 0,029; L-valina 0,02; Glutaciona 0,001.