



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS
APLICADAS À FARMÁCIA

LUCIENE DE CASSIA FARIAS PAIVA

Imagem da ultraestrutura e viabilidade de *Candida albicans* e espécies não-*albicans* vaginais aderidas ao dispositivo contraceptivo intrauterino através de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal a laser

Maringá
2010

LUCIENE DE CASSIA FARIAS PAIVA

Imagem da ultraestrutura e viabilidade de *Candida albicans* e espécies não-*albicans* vaginais aderidas ao dispositivo contraceptivo intrauterino através de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal a laser

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Análises Clínicas
Área de concentração: Análises Clínicas

Orientador: Prof^a Dr^a Márcia Edilaine Lopes Consolaro
Co-Orientador: Prof^a Dr^a Terezinha Inez Estivalet Svidzinski

Maringá
2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

LUCIENE DE CASSIA FARIAS PAIVA

Imagem da ultraestrutura e viabilidade de *Candida albicans* e espécies não-*albicans* vaginais aderidas ao dispositivo contraceptivo intrauterino através de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal a laser

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia do Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Análises Clínicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a. Dr^a. Márcia Edilaine Lopes Consolaro
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^a. Dr^a. Cíntia Gandolfi Boer
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Lilian Cristiane Baeza
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Marcia Cristina Furlaneto
Universidade Estadual de Londrina

Aprovado em: 18 de fevereiro de 2010

Local de defesa: Bloco I-90, sala 04, *Campus* da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

A Deus.

À minha mãe, Wanda (*in memorium*).

Ao meu marido, Marcelo.

Aos meus filhos, Pedro Antônio e Júlia.

Aos meus amigos e todos que contribuíram para a realização deste trabalho...

Dedico...

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me possibilitou alcançar este importante objetivo.

À professora doutora Márcia Edilaine Lopes Consolaro, pela orientação, confiança e pelos preciosos ensinamentos.

À professora doutora Terezinha Inez Estivalet Svidzinski, pela co-orientação na execução deste trabalho, amizade e carinho.

À equipe do Laboratório de Micologia da Universidade Estadual de Maringá, pela colaboração e pelos ensinamentos compartilhados durante este período.

Às secretárias Luciane e Amélia, do Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, pela eficiência e disponibilidade durante o curso.

Aos amigos do Curso de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia, em especial à Pedrina, Edilson e Mariana pela agradável convivência e pelo companheirismo.

Ao meu marido Marcelo Boeing, pelo seu amor, paciência e apoio ofertados durante a execução do mestrado.

Aos meus filhos Pedro Antônio e Júlia, por serem tão amorosos, queridos e compreensivos, enquanto me dedicava apenas às minhas atividades acadêmicas.

À minha família e aos meus amigos, pelo estímulo e pela dedicação.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Imagem da ultraestrutura e viabilidade de *Candida albicans* e espécies não-*albicans* vaginais aderidas ao dispositivo contraceptivo intrauterino através de microscopia eletrônica de varredura e microscopia confocal a laser

RESUMO

Candidíase vulvovaginal (CVV) é um processo infeccioso do trato geniturinário inferior feminino caracterizado pelo crescimento anormal de fungos leveduriformes que fazem parte da microbiota vaginal e que podem tornar-se patogênicos quando em desequilíbrio com as defesas do hospedeiro. A aderência e a produção de biofilme são considerados os principais fatores de virulência de espécies de *Candida*. Através da adesão ocorre a colonização dessas leveduras em diversas partes do organismo do hospedeiro, possibilitando a formação de biofilme. A aderência das leveduras ao dispositivo contraceptivo intrauterino (DIU) poderia facilitar o desenvolvimento de CVV e CVV recorrente (CVVR) nas pacientes suscetíveis usuárias deste método contraceptivo. O objetivo deste estudo foi avaliar aderência de *C. albicans* e espécies não-*albicans* vaginais em DIU, bem como aspectos da adesão e viabilidade das células fúngicas através de imagens microscópicas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia confocal de varredura a laser (MCVL). Para os ensaios de aderência foram utilizados isolados vaginais de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae*. Como corpos de prova foram utilizados fragmentos de DIUs (TCu 380A). MEV e MCVL demonstraram a adesão de todos os isolados vaginais nas partes do DIU (fio, parte sem cobre e parte recoberta por cobre) e a viabilidade das leveduras em todas as situações especificadas. Conclui-se que todas as partes do DIU contribuem para a retenção de leveduras no trato genital. Além disso, a elevada concentração de células leveduriformes no fio deste parece indicar a importância deste segmento para a manutenção das leveduras a nível vaginal e possibilidade de ascensão das mesmas ao útero.

Palavras-chave: *Candida* spp, dispositivo contraceptivo intrauterino, adesão, biofilme, ultraestrutura, viabilidade

Scanning electron and confocal scanning laser microscopy imaging of the ultrastructure and viability of vaginal *Candida albicans* and non-*albicans* species adhered to an intrauterine contraceptive device

ABSTRACT

Vulvovaginal candidiasis (VVC) is an infectious process of the female genitourinary tract, characterized by abnormal growth of yeasts that belong to the normal vaginal microbiota, and which could become pathogenic when unbalance of host defenses occur. The adherence and biofilm production are considered the main virulence factors associated to *Candida* species. Through adhesion, colonization of these yeasts occurs in several parts of the host organism, allowing the formation of biofilm. The adherence of yeasts to intrauterine device (IUD) could facilitate the development of VVC and recurrent VVC (RVVC) in susceptible patients who use this contraceptive method. The objective of this work was to evaluate the adherence of *C. albicans* and species non-*albicans* isolated from vaginal exudate of patient with VVC in IUD, as well as the aspects of adhesion and viability of fungal cells throughout microscopical images obtained by scanning electron microscopy (SEM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM). For the adherence assays, there were utilized vaginal isolates of *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. As specimens, there were used fragments of IUD (TCu 380A). SEM e CLSM demonstrated adhesion of all vaginal isolates in different parts of the IUD (tail, part without copper, and part covered with copper) and viability of yeasts in all specified conditions. It is concluded that all parts of IUD contribute to retention of yeasts in the genital tract. Besides that, high concentration of yeast cells in the string indicates the importance of this segment for the maintenance of yeasts in relation to vaginal site and also the possibility of their ascension to the uterus.

Keywords: *Candida* spp, intrauterine contraceptive device, adhesion, biofilm, ultrastructure, viability

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1	DIU. Modelo Tcu380A.....	17
-----------------	--------------------------	----

CAPÍTULO 2

Figura 1	MEV. <i>Candida albicans</i> e espécies não- <i>albicans</i> aderidas no fio do DIU, após 48 h de contato.....	48
Figura 2	MCVL. <i>Candida albicans</i> aderidas no fio do DIU, após 48 h e 30 dias de contato.....	49
Figura 3	MEV. Leveduras não- <i>albicans</i> aderidas no fio do DIU, após 48 h de contato.....	51
Figura 4	MCVL. Leveduras não- <i>albicans</i> aderidas no fio do DIU, após 48 h de contato.....	52
Figura 5	MEV. <i>Candida albicans</i> e espécies não- <i>albicans</i> aderidas na parte sem cobre do DIU, após 48 h de contato.....	54
Figura 6	MEV. Leveduras não- <i>albicans</i> aderidas na parte sem cobre do DIU, após 48 h de contato.....	55
Figura 7	MCVL. <i>Candida glabrata</i> aderidas na parte sem cobre do DIU, após 48 h de contato.....	56
Figura 8	MCVL. <i>Candida albicans</i> e espécies não- <i>albicans</i> aderidas na parte sem cobre do DIU, após 48 h de contato.....	57
Figura 9	MEV. <i>Candida albicans</i> e espécies não- <i>albicans</i> aderidas na parte recoberta por cobre do DIU, após 48 h de contato.....	58
Figura 10	MCVL. <i>Candida albicans</i> e espécies não- <i>albicans</i> aderidas na parte recoberta por cobre do DIU, após 48 h de contato.....	59

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas das publicações científicas: *Microscopy and Microanalysis*.

Disponível em:

<<http://journals.cambridge.org/action/displayJournal?jid=MAM>>

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I.....	10
1.1	Candidíase vulvovaginal (CVV).....	10
1.2	Candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR).....	11
1.3	Fatores predisponentes do hospedeiro.....	12
1.4	Fatores de virulência das leveduras.....	13
1.5	Aderência.....	14
1.6	Formação de biofilme.....	14
1.7	Biofilme X CVV.....	16
1.8	Dispositivo intrauterino (DIU).....	16
1.9	Justificativa.....	18
1.10	Objetivos.....	19
1.11	Referências.....	20
2	CAPÍTULO II.....	27
2.1	Scanning electron and confocal scanning laser microscopy imaging of the ultrastructure and viability of vaginal <i>Candida albicans</i> and non- <i>albicans</i> species adhered to an intrauterine contraceptive device	28
3	CAPÍTULO III.....	60
3.1	Conclusões.....	60
3.2	Perspectivas Futuras.....	61

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

1.1 Candidíase vulvovaginal

Candidíase vulvovaginal (CVV) é um processo infeccioso do trato genitourinário inferior feminino caracterizado pelo crescimento anormal de fungos leveduriformes que fazem parte da microbiota residente e que podem tornar-se patogênicos quando em desequilíbrio com as defesas do hospedeiro (Silva et al., 2008; Corrêa et al., 2009). Segundo Ziarrusta (2002), ocorre a passagem destas leveduras do estado colonizador (assintomáticos) a agentes infecciosos (vaginite sintomática). No entanto, os fatores responsáveis por essa transformação e os mecanismos que resultam destes efeitos patológicos ainda não são completamente compreendidos.

Em geral, 85 a 95% dos casos de CVV são causados por *Candida albicans* e os demais por outras espécies denominadas como espécies não- *albicans* (Pichová et al., 2001; Sobel, 2007). Alguns estudos demonstram que em algumas populações a frequência de leveduras não-*albicans* vem aumentando (Rosa & Rumel, 2004; Ferraza et al., 2005; García et al., 2006). *C. glabrata* é a segunda espécie mais frequente, embora tenham sido descritas infecções por outras espécies tais como: *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula* spp., *Trichosporon* spp., dentre outras (Sobel, 1993; Cotran et al., 2000; Corsello et al., 2003; Consolaro et al., 2004; Zardo & Mezzari, 2004; De Vos et al., 2005).

Atualmente não há dados sobre a incidência real de CVV devido ao fato de ser uma doença sub-notificada e pelos escassos estudos representativos com a população em geral (Sobel, 2007). No entanto, o diagnóstico é cada vez mais frequente na prática clínica e sua incidência tem aumentado significativamente, tornando-se o tipo mais comum de vaginite aguda nos países tropicais e a segunda infecção genital mais frequente nos Estados Unidos e em certas regiões do Brasil, precedida apenas pela vaginose bacteriana, sendo na Europa a primeira causa de vulvovaginites (Dan et al., 2002; Ziarrusta, 2002; Corsello et al., 2003). Em estudos no Brasil encontraram-se prevalências variando entre 19,3 e 37,0% (Aleixo et al., 1999; Ribeiro et al., 2001; Rosa & Rumel, 2004).

Afeta entre 70 e 75% das mulheres em idade fértil, sendo que destas, 40 a 50% vivenciarão novos surtos e 5 a 8% atingirão o caráter recorrente, que é definido como a ocorrência de quatro ou mais episódios de CVV no período de 12 meses (Mardh et al., 2002; Marrazzo, 2003; Patel et al., 2004; Sobel, 2007).

Essa infecção caracteriza-se clinicamente pela ocorrência de prurido vulvar intenso, ardor, dispareunia e pela eliminação de um corrimento vaginal de cor esbranquiçado, em grumos, com aspecto de “leite coalhado”. O prurido constitui-se no sintoma mais importante quando a CVV é comparada a vulvovaginites de outras etiologias. Com frequência, a vulva e a vagina encontram-se edemaciadas e hiperemiadas, algumas vezes, acompanhadas de disúria e sensação de queimadura. Em alguns casos é possível observar a presença de lesões satélites vulvares, como escoriações. Os sintomas se intensificam no período pré-menstrual, quando a acidez vaginal aumenta. A ausência de sintomas parece apresentar uma associação importante com espécies não-*albicans* (Sobel, 1990; Fidel, 2002; Rylander et al., 2004; Ozcan et al., 2006; Sobel, 2007).

A principal fonte de leveduras vaginais é o trato gastrointestinal. Através de um processo chamado transmissão endógena, as mesmas são veiculadas para a vagina por auto-inoculação, onde se adaptam e se desenvolvem, podendo causar distúrbios imediatos ou constituir-se em reservatório para re-infecções posteriores. A transmissão sexual também é aceita, apesar de sua contribuição para a patogênese da infecção ainda permanecer desconhecida. No entanto, evidências epidemiológicas sugerem que há transmissão de leveduras através do contato anogenital, e particularmente, orogenital (Fidel & Sobel, 1996; Reed et al., 2003; Bradshaw et al., 2005).

1.2 Candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR)

Aproximadamente 5 a 8% das mulheres com CVV desenvolvem CVVR, a qual é definida usualmente como a ocorrência de quatro ou mais episódios da doença no período de 12 meses (Marrazzo, 2003; Sobel, 2007). Ao contrário das mulheres que tem episódios esporádicos de CVV, aquelas com o caráter recorrente não se beneficiam de uma diminuição na frequência de episódios sintomáticos com o passar da idade (Foxman et al., 1998).

Acredita-se que a CVVR esteja relacionada com uma depressão nos processos imunes da mucosa normal, o que permitiria uma situação favorável da mesma ao micro-organismo,

pelo fato de ser encontrada alta incidência de CVVR em mulheres com imunidade celular prejudicada (Fidel & Sobel, 1996).

A patogênese da CVVR entre mulheres que não tem condições predisponentes aparentes, que são a grande maioria, está sob investigação. No entanto, espécies não-*albicans*, especialmente *C. glabrata*, têm sido relacionadas freqüentemente com CVVR, as quais são menos sensíveis às drogas azólicas, comumente utilizadas no tratamento de CVV e CVVR (Sobel, 1993; Sobel, 2007).

Embora o intestino seja a fonte inicial da colonização vaginal por espécies de *Candida*, há alguma controvérsia no que diz respeito ao papel do trato intestinal como fonte de re-infecção em mulheres com CVVR (Sobel, 2007).

1.3 Fatores predisponentes do hospedeiro

A expressão da relação parasita/hospedeiro depende do balanço entre a virulência do micro-organismo e as defesas do hospedeiro. Embora CVV seja uma patologia monomicrobiana, sua causa é multifatorial. Assim, do ponto de vista do hospedeiro, a colonização prévia por leveduras e posterior diminuição da capacidade de resposta imunológica observada em algumas condições, parecem favorecer a infecção (Sobel, 2007).

A gravidez, o uso de contraceptivos orais de altas dosagens e terapia de reposição hormonal, por serem situações de hiperestrogenismo, determinam altos níveis de glicogênio, resultando num aumento do substrato nutricional dos fungos e favorecendo a infecção da mucosa vaginal. Por outro lado, o uso de progestogênios confere às mulheres certa proteção contra episódios de CVV, tendo em vista os níveis de estradiol baixos, como no período de lactação (Rosa & Rumel, 2004).

A presença de ciclos menstruais regulares tem sido identificada como relevante fator de risco para a CVV, com maior incidência de casos a partir do pico de estradiol. O diabetes mellitus não controlado promove alterações metabólicas, como o aumento dos níveis de glicogênio vaginal, que podem ser significativas para o surgimento de colonização e infecção por *Candida* (Dennerstein, 1998).

O uso de antibióticos parece estar associado à destruição da microbiota bacteriana vaginal, particularmente dos lactobacilos, diminuindo a competição por nutrientes, o que favorece o surgimento da CVV (Sobel, 1990; Ziarrusta, 2002).

Hábitos higiênicos inadequados podem ser fatores de risco para a contaminação vaginal, levando resíduos de fezes para as roupas íntimas e favorecendo o desenvolvimento da CVV (Rosa & Rumel, 2004).

O uso de roupas íntimas justas e/ou de fibras sintéticas, determinando pouca aeração nos órgãos genitais e aumentando a umidade, também predispõe à CVV (Holanda et al., 2007).

Doenças imunossupressoras, doenças alérgicas, como a rinite e asma brônquica, e usuárias crônicas de corticóides, também favorecem a infecção (Fernandes & Machado, 1996; Nardin et al., 2000; Holanda et al., 2007).

Especula-se, ainda, que pequenos traumas como o ato sexual, dieta alimentar muito ácida, fatores genéticos, como polimorfismos em grupos sanguíneos, idade, atividade sexual, bem como causas idiopáticas têm sido relacionadas com a predisposição para a colonização por *Candida* spp (Holanda et al., 2007; Sobel, 2007).

1.4 Fatores de virulência das leveduras

A patogenicidade ou virulência de um micro-organismo é definida como a sua capacidade de determinar doença, sendo esta mediada por múltiplos fatores. Estas condições são específicas para cada micro-organismo e para cada isolado de determinado agente. Podem variar de hospedeiro para hospedeiro e mesmo entre os diferentes tecidos de um mesmo hospedeiro (Ghannoum & Radwan, 1990).

A virulência das espécies patogênicas de *Candida* spp depende de vários fatores, tais como adesão a substratos inertes e biológicos, germinação favorecendo a colonização e facilitando a invasão tissular, variabilidade genotípica, produção de toxinas e enzimas extracelulares hidrolíticas (proteases e fosfolipases), variabilidade antigênica, imunomodulação dos mecanismos de defesa do hospedeiro, hidrofobicidade da superfície celular, bem como o “switch fenotípico” (Calderone & Fonzi, 2001; Sobel, 2007). Outros fatores, como a atividade hemolítica e a resistência ao peróxido de hidrogênio, ainda são pouco estudadas, especialmente em isolados vaginais (Shinobu et al., 2007).

Os mais investigados são aqueles relacionados com a parede celular, como a adesão e a produção de enzimas extracelulares proteolíticas. Primeiramente porque a parede celular propicia o crescimento do patógeno e em segundo, porque as enzimas proteolíticas estão

envolvidas no processo de penetração do micro-organismo, enquanto as biomoléculas conferem a capacidade de aderência às superfícies mucosas, podendo resultar em colonização e infecção dos tecidos do hospedeiro. Em geral, os fungos patogênicos possuem a capacidade de superar as barreiras do sistema imune do hospedeiro (Chandra et al., 2001; Tamura et al., 2007).

Uma das grandes contribuições para a virulência de *Candida* spp é a sua versatilidade na adaptação a uma variedade de diferentes habitats e a formação de biofilmes (Costerton et al., 1995).

1.5 Aderência

Um dos principais fatores de patogenicidade do gênero *Candida* é a aderência, sendo o primeiro estágio para a colonização dessas leveduras em diversas partes do organismo do hospedeiro, com subsequente disseminação quando ocorre um desequilíbrio nas defesas do mesmo (Hazen et al., 2001). Vários mecanismos de aderência de *Candida* spp têm sido propostos, incluindo atração eletrostática, interação hidrofóbica e envolvimento de macromoléculas específicas presentes na superfície do micro-organismo (adesinas), que interagem com receptores específicos nas células ou superfícies inertes (Jabra-Rizki et al., 2001). Nas células epiteliais vaginais foi descrita a presença das fibronectinas como receptores para as adesinas de espécies de *Candida*, sobretudo em determinadas fases do ciclo menstrual (Klotz et al., 1985).

Devido à importância e significância da aderência, alguns estudos *in vivo* e *in vitro* têm sido desenvolvidos para quantificar e caracterizar a aderência de *C. albicans* a superfícies celulares inanimadas (Shin et al., 2002; Irie et al., 2006; Camacho et al., 2007; Chassot et al., 2008; Auler et al., 2009; Silva et al., 2009).

1.6 Formação de biofilme

Estuda-se também a aderência de um micro-organismo avaliando a sua capacidade de formar biofilmes, que constituem um outro tipo de aderência, na qual formam-se agregados multicelulares, produzindo polímeros extracelulares que constituem uma matriz estrutural e facilitam a aderência a superfícies. Sua formação ocorre em resposta a uma variedade de

condições, incluindo alta densidade celular, privação de nutrientes e estresse físico ambiental (O'Toole et al., 2000).

Atualmente, biofilmes são conhecidos como comunidades organizadas, que geralmente, são constituídos por vários gêneros e espécies de micro-organismos, envoltos em suas matrizes extracelulares, que por sua vez são formadas por componentes do hospedeiro e produtos bacterianos secretados. Geralmente a composição da matriz do biofilme inclui além de água, carboidratos, proteínas, fósforo, glicose e hexosaminas. No entanto, uma grande parcela da matriz ainda necessita ser identificada (Watnick & Kolter, 2000; Douglas, 2003; Silva et al., 2009).

Organismos em biofilmes comportam-se de maneira diferente daqueles suspensos livremente (planctônicos) e têm se mostrado relativamente refratários à terapia médica. Estudos sugerem que nos biofilmes ocorre uma complexa interação dos micro-organismos entre si e com as células do hospedeiro, através da liberação de moléculas sinalizadoras conhecidas como “quorum-sensing”, as quais são essenciais para sua formação e manutenção (Ramage et al., 2001; Hogan et al., 2004; Kojic & Darouiche, 2004).

Uma proporção significativa de infecções humanas envolve biofilmes. A formação de biofilmes bacterianos em torno de dispositivos médicos implantados tem sido amplamente investigada. Mas até recentemente, pouca atenção tem sido dada sobre a formação de biofilmes fúngicos. Espécies de *Candida* estão surgindo como importantes patógenos nosocomiais, e um dispositivo implantado com um biofilme detectável é frequentemente associado a essas infecções (Kojic & Darouiche, 2004).

Cada vez mais encontram-se estudos na literatura relacionando biofilmes de *Candida* com infecções relacionadas a dispositivos médicos e métodos para a avaliação *in vitro* destes. A formação de biofilmes de *Candida* tem importante repercussão clínica devido à sua maior resistência à terapia antifúngica convencional e da proteção contra as defesas imunológicas do hospedeiro (Kojic & Darouiche, 2004; Silva et al., 2009).

A formação de biofilme de *C. albicans* apresenta três fases de desenvolvimento: a adesão de leveduras na superfície do dispositivo (fase inicial), a formação de uma matriz de comutação dimórfica de células leveduriformes para formas de hifas (fase intermediária) e aumento da matriz, apresentando uma arquitetura tridimensional (fase de maturação). A formação e estrutura de biofilmes de *Candida* são influenciadas pela natureza da superfície de

contato, fatores ambientais, morfogênese da levedura, bem como das espécies envolvidas (Hawser & Douglas, 1994; Chandra et al., 2001).

Além de fatores inerentes ao hospedeiro, tem sido postulado que existem diferenças na patogenicidade de isolados de *Candida* spp. Em estudo *in vitro* de aderência e formação de biofilme em superfície de catéter venoso central, observou-se que isolados de *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* formam mais biofilme que de *C. albicans* (Camacho et al., 2007). Em outro estudo Shin et al. (2002), mostraram que *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* produzem quantidades significativamente maiores de biofilme quando o meio é suplementado com 8% de glicose.

1.7 Biofilme X CVV

Em CVV, a avaliação da capacidade de formação de biofilme é importante devido à possibilidade de sua ocorrência em dispositivos intra-uterinos (DIU) e em anel vaginal contraceptivo, como demonstrado por alguns autores (Pruthi et al., 2003; Pál et al., 2005; Camacho et al. 2007; Chassot et al., 2008; Auler et al., 2009). Porém, apresenta-se também importante nas CVV e CVVR não relacionadas a estes contraceptivos, isto porque algumas células fúngicas na mucosa vaginal podem existir como uma mistura de espécies formando biofilmes, inclusive com bactérias da microbiota vaginal. Estas leveduras têm maior resistência à terapia antifúngica convencional e isto pode ser responsável pela não erradicação da *C. albicans* do lúmen vaginal, explicando, pelo menos em parte, a ocorrência de CVVR (Chandra et al., 2001; Douglas, 2003; Al-Fattani & Douglas, 2004).

Em estudos *in vitro* têm se observado que isolados de espécies não-*albicans* produzem mais biofilmes e de maior consistência, quando comparados a isolados de *C. albicans* (Shin et al., 2002; Camacho et al., 2007). Porém, pouco se sabe sobre a aderência e formação de biofilme destas leveduras ao DIU, que constitui-se em um corpo estranho implantado por longos períodos na mucosa uterina, e assim, comportando-se como um possível reservatório de células leveduriformes (Chassot et al., 2008).

1.8 Dispositivo contraceptivo intra-uterino (DIU)

O DIU é um dos métodos mais prevalentes e eficazes de contracepção reversíveis. Milhões de DIUs são inseridos anualmente em todo o mundo. E em países em

desenvolvimento é um dos métodos de contracepção mais procurado pelas mulheres (Lago et al., 2003).

A geração atual de DIUs é composta por uma variedade de materiais. Atualmente os DIUs tem apresentado inovação em design (Nova T, CuNovaT e Lippes Loop) e de materiais (série TCu-380, série TCu-220 e série multiload MLCu). DIUs que liberam hormônios de forma constante (Progestasert e LNG-20) também estão disponíveis (Pruth et al., 2003).



TCu 380A

Em geral, estes dispositivos induzem uma reação inflamatória local para se defender contra a entrada de um corpo estranho através de infiltração de neutrófilos, mononucleares e plasmócitos no endométrio, a partir da qual os componentes celulares e humorais são liberados para a cavidade uterina. Concomitante a isto, os íons cobre liberados de um DIU com filamentos de cobre (Cu-DIU) aumentam a resposta inflamatória e atingem concentrações que são tóxicas para os espermatozóides e embriões (Toder et al., 1988; Beltran-Garcia et al., 2000; Pruth et al., 2003).

Assim, em primeiro lugar, o Cu-DIU é corroído no fluido uterino e libera íons cúpricos, a presença destes íons irá inibir a motilidade ou a viabilidade dos espermatozóides e/ou óvulo, bem como prejudicar a reação acrossômica entre espermatozóides e ovócitos. Em segundo lugar, o Cu-DIU produz uma reação humoral e celular inflamatória local dentro da cavidade uterina, tubas uterinas e muco cervical. Esta reação, bem como a presença dos íons cobre, é espermicida. Em terceiro lugar, a capacitação espermática também pode ser inibida devido à presença dos íons cúpricos no fluido uterino. Portanto, considera-se que estas mudanças são responsáveis pelos efeitos contraceptivos e que a dissolução do cobre é o principal fator para a contracepção (Ortiz et al., 1996; Beltran-Garcia et al., 2000; Xia et al., 2007).

Estudos têm demonstrado que efetivamente o DIU impede a fertilização, não prejudicam a satisfação sexual e são rentáveis. No entanto, podem apresentar alguns efeitos colaterais, como dor pélvica, menorrágia, sangramento intermenstrual, perfuração uterina e além destas complicações, associa-se com colonização de micro-organismos nestes dispositivos implantados (Hodoglugil et al., 2000; Pruth et al., 2003) .

JUSTIFICATIVA

O uso de DIU constitui-se em um método muito comum usado no planejamento familiar em todo o mundo. Apesar dos seus benefícios, existem estudos relacionando o uso de DIU com a ocorrência de infecções vulvovaginais, uterinas e fetais, culminando até com a morte materna e/ou fetal (Hodoglugil et al., 2000; Agarwal et al., 2004; Musmar et al., 2004).

Chassot et al. (2008) demonstraram a possibilidade de adesão e formação de biofilme de *C. albicans* em DIU. Porém, pouco se sabe sobre isto em relação às espécies não-*albicans*, que em algumas populações tem aumentado em frequência nas CVVs.

Considerando que a adesão e a formação de biofilme estão entre os principais fatores de virulência de leveduras, podendo predispor a um processo patogênico, estudos nesta área em relação ao DIU são muito importantes, especialmente para pacientes com CVVR.

OBJETIVOS

GERAIS

1. Avaliar aderência de *C. albicans* e espécies não-*albicans*, isoladas de exsudato vaginal de paciente com CVV, em dispositivo contraceptivo intrauterino (DIU), a formação e viabilidade do biofilme.
2. Avaliar através de imagens microscópicas aspectos da adesão e viabilidade de *C. albicans* e espécies não-*albicans* isoladas de pacientes com CVV.

ESPECÍFICOS

1. Promover a adesão *in vitro* de *C. albicans* e espécies não-*albicans* ao DIU.
2. Avaliar aspectos da aderência *in vitro* das leveduras ao DIU, pelo emprego de microscopia eletrônica de varredura.
3. Avaliar a viabilidade das leveduras aderidas ao DIU, pelo emprego de coloração com corantes fluorescentes e análise por microscopia confocal.

Referências Bibliográficas

1. AGARWAL, K., SHARMA, U. & ACHARYA, V. (2004). Microbial and cytopathological study of intrauterine contraceptive device users. *Indian J Med Sci* 58, 394-399.
2. AL-FATTANI, M.A. & DOUGLAS, L.J. (2004). Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 3291-3297.
3. ALEIXO NETO, A., HAMDAN, J.S. & SOUZA, R.C. (1999). Prevalência de *Candida* na flora vaginal de mulheres atendidas num serviço de planejamento familiar. *Rev Bras Ginecol Obstet* 21, 441-445.
4. AULER, M.E., MORREIRA, D., RODRIGUES, F.F.O., ABRÃO, M.S., MARGARIDO, P.F.R., MATSUMOTO, F.E., SILVA, E.G., SILVA, B.C.M., SCHNEIDER, R.P. & PAULA, C.R. (2009). Biofilm formation on intrauterine devices in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Med Mycol* 7, 1-6.
5. BELTRAN-GARCIA, M. J., ESPINOSA, A., HERRERA, N. & PEREZ-ZAPATA, A.J. (2000). Formation of copper oxychloride and reactive oxygen species as causes of uterine injury during copper oxidation of Cu-IUD. *Contraception* 61, 99-103.
6. BRADSHAW, C.S., MORTON, A.N., GARLAND, S.M., MORRIS, M.B., MOSS, L.M. & FAIRLEY, C.K. (2005). Higher-risk behavioral practices associated with bacterial vaginosis compared with vaginal candidiasis. *Obstet Gynecol* 106, 105–114.
7. CALDERONE, R.A. & FONZI, W.A. (2001). Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* 9, 327-335.
8. CAMACHO, D.P., GASPARETTO, A. & SVIDZINSKI, T.I.E. (2007). The effect of chlorhexidine and gentian violet effect on the adherence of *Candida* spp. to urinary catheters. *Mycopathologia* 163, 261-266.
9. CHANDRA, J., KUHN, D.M., MUKHERJEE, P.K., HOYER, L.L., MCCORMICK, T. & GHANNOUM, M.A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug Resistance. *J Bacteriol* 183, 5385-5394.

10. CHASSOT, F., NEGRI, M.F.N., SVIDZINSKI, A.E., GASPARETTO, A., PERALTA, R.M., SVIDZINSKI, T.I.E. & CONSOLARO, M.E. (2008). Can the intrauterine contraceptive devices to be a *Candida albicans* reservoir? *Contraception* 77, 355-359.
11. CONSOLARO, M.E.L., BERTONI, T.A., YOSHIDA, C.S., PERALTA, R.M., MAZUCHELI, J. & SVIDZINSKI, T.I.E. (2004). Correlation of *Candida* species and symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil. *Rev Iberoam Micol* 21, 202-205.
12. CORRÊA, P.R., DAVID, P.R.S., PERES, N.P., CUNHA, K.C. & ALMEIDA, M.T.G. (2009). Caracterização fenotípica de leveduras isoladas da mucosa vaginal em mulheres adultas. *Rev Bras Ginecol Obstet* 31, 177-181.
13. CORSELLO, S., SPINILLO, A., OSNENGO, G., PENNA, C., GUASCHINO, S., BELTRAME, A., BLASI, N. & FESTA, A. (2003). An epidemiological survey of vulvovaginal candidiasis in Italy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 110, 66-72.
14. COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D.E., KORBER, D.R. & LAPPIN-SCOTT, H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49, 711-745.
15. COTRAN, R.; KUMAR, V. & COLLINS, T. (2000). *Robbins. Patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara-Koogan.
16. DAN, M.; POCH, F. & LEVIN, D. (2002). High rate of vaginal infections caused by non-*C. albicans* species among asymptomatic women. *Med Mycol* 40, 383-386.
17. DENNERSTEIN, G. (1998). Pathogenesis and treatment of genital candidiasis. *Aust Fam Physician* 27, 363-369.
18. DE VOS, M.M., CUENCA-ESTRELLA, M., BOEKHOUT, T., THEELEN, B., MATTHIJS, N., BAUTERS, T., NAILIS, H., DHONT, M.A., RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. & NELIS, H.J. (2005). Vulvovaginal candidiasis in a Flemish patient population. *Clin Microbiol Infect* 11, 1005-1011.
19. DOUGLAS, L.J. (2003). *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* 11, 30-36.
20. FERRAZA, M.H.S.H.; MALUF, M.L.F.; CONSOLARO, M.E.L.; SHINOBU, C.S.; SVIDZINSKI, T.I.E. & BATISTA, M.R. (2005). Caracterização de leveduras isoladas

- da vagina e sua associação com candidíase vulvovaginal em duas cidades do sul do Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet* 27, 58-63.
21. FERNANDES, C.E. & MACHADO, R.B. (1996). Aspectos etiopatogênicos, diagnósticos e terapêuticos da candidíase vulvovaginal. *Rev Bras Medicin* 7, 100-104.
 22. FIDEL JR, P.L. (2002). Distinct protective host defenses against oral and vaginal candidiasis. *Med Mycol* 40, 359-375.
 23. FIDEL JR, P.L. & SOBEL, J.D. (1996). Immunopathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Rev Clin Microbiol* 9, 335-348.
 24. FOXMAN, B., MARSH, J.V., GILLESPIE, B. & SOBEL, J.D. (1998). Frequency and response to vaginal symptoms among white and African American women: results of a random digit dialing survey. *J Womens Health* 1998; 7: 1167-74.
 25. GARCÍA HEREDIA, M., GARCÍA, S.D., COPOLILLO, E.F., CORA ELISETH, M., BARATA, A.D., VAY, C.A., DE TORRES, R.A., TIRABOSCHI, N. & FAMIGLIETTI, A.M. (2006). Prevalence of vaginal candidiasis in pregnant women. Identification of yeasts and susceptibility antifungal agents. *Rev Argent Microbiol* 38, 9-12.
 26. GHANNOUM, M.A. & RADWAN, S.S. (1990). *Candida adherence to epithelial cells*. New York: CRC Press.
 27. HAZEN, K.C., WU, J.G. & MASUOKA, J. (2001). Comparison of hydrophobic properties of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Infect Immun* 69, 779-786.
 28. HAWSER, S.P. & DOUGLAS, L.J. (1994). Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. *Infect. Immun* 62, 915- 921.
 29. HODOGLUGIL, N.N.S., ASLAN, D. & BERTAN, M. (2000). Intrauterine device use and some issues related to sexually transmitted disease screening and occurrence. *Contraception* 61, 359-364.
 30. HOGAN, D.A., VIK, A. & KOLTER, R.A. (2004). *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Mol Microbiol* 54, 1212-1223.
 31. HOLANDA, A.A.R., FERNANDES, A.C.S., BEZERRA, C.M., FERREIRA, M.A.F., HOLANDA, M.R.R., HOLANDA, J.C.P. & MILAN, E.P. (2007) Candidíase

- vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. *Rev Bras Ginecol Obstet* 29, 3-9.
32. IRIE, M.M.T., CONSOLARO, M.E.L., GUEDES, T.A., DONATTI, L., PATUSSI, E.V. & SVIDZINSKI, T.I.E. (2006). A simplified technique for evaluating the adherence of yeasts to human vaginal epithelial cells. *J Clin Lab Anal* 20, 195-203.
 33. JABRA-RIZKI, M.A., FALKER, W.A., MERZ, W.G., BAQUI, A.A.M.A., KELLEY, J.I. & MEILLER, T.F. (2001). Cell surface hydrophobicity - associated adherence of *Candida dubliniensis* to human buccal epithelial cells. *Rev Iberoam Micol* 18, 17-22.
 34. KLOTZ, S.A., DRUTZ, D.J. & ZAJIC, J.E. (1985). Factors governing adherence of *Candida* species to plastic surfaces. *Infect Immun* 50, 97-101.
 35. KOJIC, E.M. & DAROUICHE, R.O. (2004). *Candida* Infections of Medical Devices. *Clin Microbiol Rev* 17, 255–267.
 36. LAGO, R.F., SIMÕES, J.A., BAHAMONDES, L., CAMARGO, R.P.S., PEROTTI, M. & MONTEIRO, I. (2003). Follow-up of users of intrauterine device with and without bacterial vaginosis and other cervicovaginal infections. *Contraception* 68, 105–109.
 37. MARDH, P.A., RODRIGUES, A.G., GENC, M., NOVIKOVA, N., MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J., & GUASCHINO, S. (2002). Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis: a review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapy. *Int J STD AIDS* 13, 522-539.
 38. MARRAZZO, J.M. (2003). Vulvovaginal candidiasis – over the counter doesn't seem to lead to resistance. *BMJ* 326, 993-994.
 39. MUSMAR, S.G., MUSMAR, M. & ALTELL, M.A.I. (2004). Effect of IUD (intrauterine device) on reproductive tract infection (RTI) in the northern west bank. *Middle East Journal of Family Medicine* 5.
 40. NARDIN, M.E., MORANO, S., AHUMADA, C., VOLTA, G., FERNANDES, S. & MENDES, E. (2000). Prevalencia de la candidiasis vulvovaginal y su relacion com algunos factores de riesco. *Rev Arg Micol*.
 41. O'TOOLE, G.A., KAPLAN, H.B. & KOLTER, R. (2000). Biofilm formation as microbiol development. *Ann Rev Microbiol* 54, 49-79.

42. ORTIZ, M.E., CROXATTO, H.B. & BARDIN, C.W. (1996). Mechanisms of action of intrauterine devices. *Obstet Gynecol Surv* 51, S42–51.
43. OZCAN, S.K., BUDAK, F., YUCESYOY, G., SUSEVER, S. & WILLKE, A. (2006). Prevalence, susceptibility profile and proteinase production of yeasts causing vulvovaginitis in Turkish women. *APMIS* 114, 139-145.
44. PÁL,Z., URBÁN, E., DÓSA, E., PÁL, A. & NAGY, E. (2005). Biofilm formation on intrauterine devices in relation to duration of use. *J Med Microbiol* 54, 1199-1203.
45. PATEL, D., GILLESPIE, B., SOBEL, J., LEAMAN, D., NYIRJESY, P., WEITZ, M. & FOXMAN, B. (2004). Risk factors for recurrent vulvovaginal candidiasis in women receiving maintenance antifungal therapy: results of a prospective cohort study. *Am J Obst Gyn* 190, 644-653.
46. PICHOVÁ, I., PAVLICKOVÁ, J., DOSTÁL, J., DOLEJSI, E., HRUSKOVÁ-HEIDINGSFELDOVÁ, O., WEBER, J., RUMML, T. & SOUCEK, M. (2001). Secreted aspartic proteinases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*: inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem* 268, 2669-2677.
47. PRUTH, V., AL-JANABI, A. & PEREIRA, B.M.J. (2003). Characterization of biofilm formed on intrauterine devices. *Indian J Med Microbiol* 21, 161-165.
48. RAMAGE, G., WALLE, K.V., WICKES, B.L. & LÓPEZ-RIBOT, J.L. (2001). Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 18, 163-170.
49. REED, B.D., ZAZOVE, P., PIERSON, C.L., GORENFL, O.D.W. & HORROCKS J. (2003). *Candida* transmission and sexual behaviors as risks for a repeat episode of *Candida* vulvovaginitis. *J Womens Health* 12, 979–989.
50. RIBEIRO, M.A., DIETZE, R., PAULA, C.R., DA MATTA, D.A. & COLOMBO, A.L. (2001). Susceptibility profile of vaginal yeast isolates from Brazil. *Mycopathologia* 151, 5-10.
51. ROSA, M.I. & RUMEL, D. (2004). Fatores associados à candidíase vulvovaginal: estudo exploratório. *Rev Bras Ginecol Obstet* 26, 65-70.
52. RYLANDER, E., BERGLUND, A.L., KRASSNY, C. & PETRINI, B. (2004). Vulvovaginal *Candida* in a young sexually active population: prevalence and

- association with oro-genital sex and frequent pain at intercourse. *Sex Transm Infect* 80, 54-57.
53. SHIN, J.H., KEE, S.J., SHIN, M.G., KIM, S.H., SHIN, D.H., LEE, S.K., SUH, S.P. & RYANG, D.W. (2002). Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from other sources. *J Clin Microbiol* 40, 1244-1256.
54. SHINOBU, C.S., OGATTA, S.F.Y., BIZERRA, F., FURLANETO, L., PERALTA, R.M., SVIDZINSKI, T.I.E. & CONSOLARO, M.E.L. (2007). Lack of association between genotypes and virulence factors in *C. albicans* strains isolated from vaginal secretion. *Braz J Microbiol* 38, 467-471.
55. SILVA, C.R.G., MELO, K.E., LEÃO, M.V.P., RUIS, R. & JORGE, A.O.C. (2008). Presença de *Candida* nas mucosas vaginal e bucal e sua relação com IgA salivar. *Rev Bras Ginecol Obstet* 30, 300-305.
56. SILVA, S.S., HENRIQUES, M., MARTINS, A., OLIVEIRA, R., WILLIAMS, D. & AZEREDO, J. (2009). Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Micol* 20, 1-9.
57. SOBEL, J. D. (1990). Vaginal infections in adult women. *Med Clin North Am* 74, 1575-1602.
58. SOBEL, J. D. (1993). Candidal vulvovaginitis. *Clin Obstet Gynecol* 36, 153-165.
59. SOBEL, J. D. (2007). Candidiasis vulvovaginal. *Lancet* 369, 1961-1971.
60. TAMURA, N.K., NEGRI, M.F.N., BONASSOLI, L.A. & SVIDZINSKI, T.I.E. (2007). Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. *Rev Soc Bras Med Trop* 40, 91-93.
61. TODER, V., MADANES A. & GLEICHER N. (1988) Immunologic aspects of IUD action. *Contraception* 37, 391-403.
62. XIA, X., XIE, C., WANG, Y., CAI, S., ZHU, C. & YANG, X. (2007). The forces imposed by the novel T-shape Cu/LDPE nanocomposite intrauterine devices on the simulated uterine cavity. *Contraception* 76, 326-330.
63. ZARDO, V. & MEZZARI, A. (2004). Os antifúngicos nas infecções por *Candida* sp. *News Lab* 63, 136-136.

64. ZIARRUSTA, G.B. (2002). Vulvovaginitis candidiásica. *Rev Iberoam Micol* 19, 22-24.
65. WATNICK, P. & KOLTER, R. (2000). Biofilm, City of Microbes. *J Bacteriol* 182, 2675–2679.

CAPÍTULO II

Artigo: “Scanning electron and confocal scanning laser microscopy imaging of the ultrastructure and viability of vaginal *Candida albicans* and non-*albicans* species adhered to an intrauterine contraceptive device”

Scanning electron and confocal scanning laser microscopy imaging of the ultrastructure and viability of vaginal *Candida albicans* and non-*albicans* species adhered to an intrauterine contraceptive device

Brief title: Imaging of *Candida* spp adhesion in IUD

Luciene C. Farias Paiva¹, Lucélia Donatti², Eliana V. Patussi¹, Terezinha I. E. Svizdinski¹ and Márcia E. Lopes-Consolaro^{1*}

¹*Department of Clinical Analysis, State University of Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brazil*

²*Department of Cell Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, 85131-990, Paraná, Brazil*

*Corresponding author. E-mail: melconsolaro@yahoo.com.br

Department of Clinical Analysis, State University of Maringá. Av. Colombo, 5790, Maringá, Paraná/Brazil, CEP: 87020-900. Phone: +55 44 3261 4795; FAX: +55 44 3261 4860.

Abstract: Although bacterial biofilms have been studied in detail, the adhesion of *Candida albicans* and non-*albicans* species to the intrauterine contraceptive device (IUD) is not clear. The objective of this study was to evaluate aspects of imaging of the ultrastructure and viability of vaginal yeasts adhered to different parts of an IUD, through scanning electron (SEM) and confocal scanning laser (CSLM) microscopy. We studied yeasts isolated from a patient with vulvovaginal candidiasis: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, and *Saccharomyces cerevisiae*. A suspension of each yeast was prepared and incubated with IUD parts (tail, without copper, and copper-covered). SEM and CSLM showed that all the vaginal yeasts adhered on all the parts of the IUD and demonstrated viability, including 30 days after contact for *C. albicans*. Possibly irregularities of the IUD surface contribute to the adherence process. Although all of the IUD parts contribute to the retention of yeasts in the genital tract, the high concentration of yeast cells on the IUD tail may indicate the importance of this segment in maintaining the colonization by the yeast cells, because the tail forms a bridge between the external environment, the vagina that is colonized by yeast cells, and the upper genital tract where there is no colonization.

Key words: Vaginal yeasts, intrauterine contraceptive device, image, adhesion, ultrastructure, viability

INTRODUCTION

Vulvovaginal candidiasis (VVC) affects millions of women around the world every year. These are infections caused by the abnormal growth of yeasts on the mucosa of the female genital tract. *Candida albicans* is the most frequent agent, whereas more recently non-*albicans* species have been identified as common pathogens, including *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula* spp., and *Trichosporon* spp. (Consolaro et al., 2004; Sobel, 2007). The occurrence of VVC seems to have increased during recent decades, and many predisposing factors have been suggested to explain this trend. The use of the intrauterine contraceptive device (IUD) is not among these factors, and a possible link between the IUD and *Candida* colonization or infection has been little investigated (Chassot et al., 2008; Auler et al., 2009).

Studies have demonstrated the capacity of *Candida* spp. to adhere to both cellular and inanimate surfaces (Irie et al., 2006; Souza et al., 2009). As a consequence of the property of adherence, the microorganisms can produce biofilms, which are aggregates of unicellular microorganisms forming multicellular structures (O'Toole et al., 2000). Biofilms are structured microbial communities in which the microbial cells irreversibly attach to a surface or interface and become embedded in a matrix of extracellular polymeric substances produced by these cells (Costerton et al., 1999; Davey & O'Toole, 2000; Donlan, 2001; Donlan & Costerton, 2002; Andes et al., 2004). Pathogenic bacteria and fungi can form biofilms on the inert surfaces of implanted devices such as catheters and prosthetic cardiac valves. The major complication associated with the use of these medical implants is the risk of serious infection, causing public-health problems (Mukherjee et al., 2003; Pál et al., 2005). Microorganisms involved in biofilms are generally more resistant to antimicrobials than single-cell planktonic microorganisms, and are also more resistant to the defense mechanisms of the host. This

makes them a continuing source of infection (Donlan & Costerton, 2002; Mukherjee & Chandra, 2004).

Although bacterial biofilms have been studied in detail (O'Toole et al., 2000), studies on medically important fungal biofilms have only recently been suggested (Mukherjee et al., 2003). Very little is known about yeasts from VVC patients, especially non-*albicans* species. Moreover, the formation of biofilm on genital devices such as IUDs is not well understood. If a biofilm develops on an IUD, it could stimulate the development of VVC or recurrent VVC (RVVC), which is defined by at least four symptomatic episodes in one year (Sobel, 2007). To develop more information on the behavior of yeasts on genital devices, we studied aspects of imaging of the ultrastructure and viability of vaginal *Candida albicans* and non-*albicans* species adhered to IUD surfaces through scanning electron (SEM) and confocal scanning laser (CSLM) microscopy.

MATERIALS AND METHODS

Yeasts

We used six strains of yeasts that were isolated from a VVC patient. The strains were identified in the Laboratory of Medical Mycology of the State University of Maringá, Paraná, Brazil, where they have been stored, since their identification, in 10% glycerinated water at -20 °C. The yeast isolates were identified through classical methods (Kurtzman & Fell, 1998) and also by Seminested PCR (Ahmad et al., 2002). We used one isolate of each of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, and *Saccharomyces cerevisiae*. A suspension of each yeast was prepared in a concentration of 3×10^7 yeasts/ml (Shin et al., 2002), counted in a Neubauer chamber, for the adherence assays.

Preparation of IUD samples

A Model TCu 380A IUD, adopted by the Brazilian Ministry of Health for patients in the public-health system, was aseptically cut into three pieces, making three different fragments: (1) 5-mm pieces of the IUD covered with copper wire; (2) 5mm pieces of the IUD without copper wire (both of these fragments had an average area of 79.522 mm²); and (3) 10-mm pieces of the tail, averaging 61.262 mm².

Adherence assay

The IUD fragments were incubated in a 24-well microplate with a previously standardized yeast suspension for 48 h at 37 °C under constant agitation for the non-*albicans* species, and for 48 h and 30 days for the *C. albicans* strain. Next, the fragments were washed three times to remove the non-adhered yeast cells, and then the IUD fragments with adhered yeast cells were fixed as described below.

Scanning electron microscopy (SEM)

After being washed three times with 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), the IUD fragments were fixed in a solution of 2.5% glutaraldehyde dissolved in 0.1 M cacodylate buffer (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) (Karnovsky, 1965), and then dehydrated in an ascending alcohol series. The critical point was obtained in a Balzers CPD-010 (Balzers Instruments, Balzers, Liechtenstein) with carbonic gas. Metallization in gold was carried out in a Balzers SCD-030 (Balzers Instruments, Balzers, Liechtenstein). The adhesion of all the yeasts tested on the IUD parts was observed and photographed with the use of a JEOL-JSM 6360 LV scanning electron microscope (JEOL Ltda., Tokyo, Japan) at the Electron Microscopy Center, Federal University of Paraná.

Confocal scanning laser microscopy (CSLM)

The IUD fragments were stained with the FUN-1 (50 μ M) component of the LIVE/DEAD yeast viability kit (Molecular Probes, Inc., Oregon, OR, USA) and concanavalin A (ConA) conjugate (Alexa Fluor 488 conjugate) (200 mM), according to the manufacturer's instructions. This stain colors both live and dead cells. All the yeast cells were stained with the FUN-1 dye and observed with a diffusely distributed green fluorescence. Metabolically active cells process this dye, which results in a shift from green to red fluorescence within the intravacuolar structures. ConA binds to glucose and mannose residues of cell-wall polysaccharides, and is observed as green fluorescence. Due to colocalization of fluorescent dyes (FUN-1 and ConA), the metabolically active cells appear yellow to orange during multichannel image capture (Chandra et al., 2001; Andes et al., 2004).

The stained IUD fragments were transferred to a microscope slides, fixed with synthetic Canada Balsam (Pró-Cito Soldan Cytological Products Ltd., Brazil), and cover-glasses were applied, to obtain permanent slide mounts. The adhered yeasts were observed

with a disk-based confocal microscope (Axiovert 200; Carl Zeiss AIM Version 3.5.5, Gottingen, Germany) equipped with a mercury arc lamp at the Central Microscopy, Complex Central Support Research, State University of Maringá. Depth measurements were taken at regular intervals across the IDU parts. Confocal images of green (ConA) and red (FUN-1) fluorescence were made simultaneously using the Z-stack mode. Imaging of FUN-1-stained cells was accomplished by using a protocol with an excitation wavelength of 488 nm and emission bands at 528 and 617 nm for green and red, respectively. The ConA protocol included excitation and emission wavelengths of 490 and 528 nm, respectively. Images were processed for display by using a Zeiss LSM image browser (version 4.0.0.0).

RESULTS

General adhesion to IUD

The SEM revealed that the *C. albicans* and non-*albicans* species adhered perfectly and closely to all three parts of the IUD (Figs. 1, 3, 5, 6, 9). The CSLM images showed that all the yeasts remained viable (yellow color) in the adhered state after 48 h of contact, and up to 30 days specifically for *C. albicans* (Figs. 2, 4, 7, 8, 10), also on all the IUD parts.

Adhesion to the IUD tail

The tail of the IUD showed the most adhered *C. albicans* and non-*albicans* species, and they remained viable after adhesion (Figs. 1, 2, 3, 4). SEM revealed several yeasts in blastoconidia form, intimately attached to the surface irregularities of the IUD tail (Figs. 1A-F). As seen by SEM, these irregularities were numerous and apparently with many different depths (Figs. 1A-F, 3A-F). Most of the yeasts adhered to the tail of the IUD only in the blastoconidia form: *C. albicans* after 48 h of contact (Figs. 1A, 1B, 2A, 2B, 2C), *C. glabrata* (Figs. 1C, 1D, 4A, 4B, 4C), *C. guilliermondii* (Figs. 1E, 1F, 4D), *C. tropicalis* (Figs. 3C, 3D, 4G, 4H), and *S. cerevisiae* (Figs. 3E, 3F, 4I, 4J). Only *C. parapsilosis* showed adhesion in both the blastoconidia and hyphae-like forms (Figs. 3A, 3B, 4E, 4F). *C. albicans* showed adhesion in the two forms, blastoconidia and hyphae-like, only after 30 days of contact with the tail (Figs. 2D, 2E, 2F).

We observed budding yeasts by SEM and CSLM: *C. albicans* (Figs. 1B, 2B), *C. guilliermondii* (Fig. 1E), *C. parapsilosis* (Figs. 3A, 3B, 4F), and *S. cerevisiae* (Figs. 3F, 4J).

The extracellular matrix material of the biofilm was observed near the blastoconidia forms or with embedded microorganisms (Figs. 1F, 3D).

Adherence on the IUD part without copper

The adhesion on IUD without copper was in all aspects very similar to the tail, with both *C. albicans* and non-*albicans* species adhered (Figs. 5, 6, 7, 8), and these also remained viable after adhesion (Figs. 7, 8). The IUD parts without copper also had a very irregular surface, and many yeasts aggregated in the blastoconidia form could be seen perfectly and closely attached to the irregularities (Figs. 5, 6).

Most of the yeasts adhered in the blastoconidia form: *C. albicans* after 48 h (Figs. 5A, 5B, 8A), *C. glabrata* (Figs. 5C, 5D, 7), *C. guilliermondii* (Figs. 5E, 5F, 8B), *C. tropicalis* (Figs. 6C, 6D, 8C), and *S. cerevisiae* (Figs. 6E, 6F, 8E). Only *C. parapsilosis* showed adhesion in both blastoconidia and hyphae-like forms (Figs. 6A, 6B, 8D).

We observed budding yeasts by SEM and CSLM, in *C. glabrata* (Fig. 7B) and *C. parapsilosis* (Figs. 6A, 6B). The extracellular matrix material of the biofilm was observed close to the blastoconidia form or with embedded microorganisms (Figs. 5B, 6D).

Through CSLM, we showed *C. glabrata* adhered in blastoconidia form on the IUD without copper wire after 48 h of contact, and stained with FUN-1 and ConA. The image capture was set for observation in green fluorescence (ConA) (Fig. 7A), in red fluorescence (FUN-1) (Fig. 7B), and in simultaneous observation in both green and red fluorescence, where yeast cells fluorescing in yellow are metabolically active (Fig. 7C). The CSLM images of all other yeasts were made with simultaneous observation of both green and red fluorescence with metabolically active yeast cells in yellow (Figs. 2, 4, 8, 10). By CSLM, *C. parapsilosis* was also observed adhered to the IUD parts without copper, in both blastoconidia and hyphae-like forms (Fig. 8D).

Adherence on copper-covered IUD parts

Adhesion on copper-covered IUD parts was observed in good detail by SEM (Fig. 9), apparently in smaller numbers than on the tail or on the parts without copper. The aspects of adherence on the copper-covered IUD were very similar to the other parts. The irregular surface was not observable by SEM on this IUD part, because of the many artifacts (Fig. 9).

Most of the yeasts showed adhesion in blastoconidia form: *C. albicans* (Fig. 9A), *C. glabrata* (Fig. 9B), *C. guilliermondii* (Fig. 9C), *C. tropicalis* (Fig. 9E), and *S. cerevisiae* (Fig. 9F). Again, only *C. parapsilosis* showed adhesion in both blastoconidia and hyphae-like forms (Fig. 9D). Budding yeasts were also observed (Figs. 9A, 9C, 9D, 9F).

The observation of adherence by CSLM was difficult, but viable yeasts were detected in the blastoconidia form in all the isolates tested, including *C. parapsilosis* (Figs. 10A-F).

DISCUSSION

Studies of the relationship between IUDs and yeasts from VVC and RVVC patients are important, because the IUD method is highly effective in preventing pregnancy and is also very cost-effective. It is one of the most popular methods of contraception in the world today. More than 80 million women use IUDs for contraception worldwide, and their effectiveness rivals that of tubal sterilization (Peterson et al., 1996; Pál et al., 2005). VVC is an extremely common fungal infection that remains a significant problem worldwide (Mardh et al., 2002). Several risk factors have been indicated in regard to its etiology, but the use of the IUD was not recognized as a predisposing factor in the late 1980s (Parewijck et al., 1988).

All parts of the IUD allowed the adherence of the yeast cells studied. This situation is similar to that occurring in other cavities, such as the mouth, where it is clear that the use of prostheses predisposes the patient to develop candidiasis, as confirmed by many studies (Walker et al., 2000). Curiously, fungal biofilm on IUDs has been little studied. This lack of interest is surprising, because IUDs are foreign surfaces that are implanted for long periods in the uterine mucosa, and the tail acts as a reservoir for yeast cells (Chassot et al., 2008). Recently, Auler et al. (2009) studied IUDs removed from users, and observed biofilms with yeasts through both scanning-electron-microscopy analysis and culture, suggesting the possibility that the majority of microorganisms in biofilm had been present on these surfaces for long periods.

Our results suggest that all IUD parts contribute to the retention of *C. albicans* and non-*albicans* species in the genital tract. Furthermore, CSLM showed that all the yeasts on all the IUD parts remained viable after 48 h of contact, and *C. albicans* remained viable after 30 days. Their viability was confirmed by observation of budding yeasts by SEM and CSLM. The high concentration of yeast cells was observed principally on the IUD tail, and may

indicate the importance of this segment in maintaining the yeast cells colonization, as the tail forms a bridge between the external environment, the vagina that is colonized by yeast cells, and the upper genital tract where there is no colonization. Parewijck et al. (1988) showed that IUD users had significantly more yeast cells in the vagina (20%) than did non-users (6%), and Demirezen et al. (2005) showed that IUD users had more *Candida* infections (14%) than did non-users (8%). The present study agreed with the clinical impressions that the IUD predisposes to colonization and infection by yeast cells and development of VVC or RVVC (Chassot et al., 2008).

It was possible to observe many surface irregularities on the IUD tail and on the part without copper, where blastoconidia and hyphae-like forms were perfectly and closely attached. Possibly these irregularities contribute to the adherence process.

The finding of adhered and viable yeasts on the copper-covered part of the IUD was surprising, because the role of copper ions is definitely important for this kind of contraception device, not only for their effects on estrogen receptors (El-badrawi & Hafez, 1981) and reducing the pregnancy rate (Zipper et al., 1969), but also for the protective role of copper ions against microorganisms (Duguid et al., 1980). These Cu^{2+} ions also protect the cervical-vaginal microbiota against microorganisms better than plastic devices, via the weak antibacterial and antifungal action of copper salts (Duguid et al., 1980). However, the interaction of *Candida* cells with this part of the device is not well studied (Demirezen et al., 2005).

Copper release from the device decreases during the second year (Kosonen, 1980; Jarvela & Allonen, 1986), which may partly explain why these infections occur predominantly in patients who use them for long periods (Demirezen et al., 2005). Concordant with our results, Auler et al. (2009) also detected *C. albicans* adhered on the

copper-covered part of the IUD removed from the users, and suggested that these microorganisms present on the surface of the upper part of the coil may also constitute a source of infection for patients with VVC.

C. parapsilosis was the only yeast of those studied that showed two forms, blastoconidia and hyphae-like forms, on all the IUD parts. Interestingly, this occurred with *C. albicans* on the IUD tail only after 30 days of contact, indicating that the viability of the yeast may increase over a longer period of IUD use. Similarly, Demirezen et al. (2005) observed that longer IUD usage promotes dimorphism of *Candida*, and suggested that with longer IUD use, the probability of *Candida* infection increases.

The extracellular matrix material was observed on the IUD tail and the part without copper, suggesting biofilm formation. Auler et al. (2009) stated that if microbial biofilms form on the surface of an IUD, they may cause infection in a susceptible host. This is very important for VVC and RVVC, because approximately 70-75% of adult women have at least one episode of VVC during their lifetime. Some of these patients will experience repeated episodes, and 5-8% will develop RVVC (Sobel, 2007), which has been resolved in IUD users by the removal of the device (Parewijck et al., 1988)

All our results concord with clinical observations. There exist reports of intrauterine fetal death and maternal sepsis caused by *C. albicans* and *C. tropicalis* in women with retained IUDs (Segal et al., 2001; Barth et al., 2002). Hsu et al. (2007) reported that a long-standing IUD may increase the chances that *C. glabrata* will bypass the cervical mucus barrier (Soper, 1996). Although vaginal colonization with *Candida* is frequent during pregnancy and its transmission to the fetus is rare (Darmstadt et al., 2000; Horn et al., 2001; Segal et al., 2001), this transmission was conducted by an IUD in all cases (Demirezen et al., 2005). The use of IUDs has been also linked to pelvic inflammatory disease. *Candida* species

infection should be considered in individuals in whom a tuboovarian abscess is unresponsive to conventional antibiotic therapy, particularly in patients with risk factors for *Candida* infection and the presence of an IUD (Hsu et al., 2007).

CONCLUSIONS

In conclusion, this is one of the first detailed studies on imaging of the ultrastructure and viability of *C. albicans* and non-*albicans* species isolated from VVC patients, and adhered on their IUDs. All vaginal yeast cells evaluated in this study adhered on all the parts of the IUD, and demonstrated viability for the period of time studied, including 30 days for *C. albicans*. Other important characteristics of the fungus-IUD interactions were described. Irregularities of the IUD surface may contribute to the adherence process. Although all the parts of the IUD contribute to the retention of yeasts in the genital tract, the high concentration of yeast cells on the IUD tail may indicate the importance of this segment in maintaining the yeast-cell colonization, because the tail forms a bridge between the external environment, the vagina that is colonized by yeast cells, and the upper genital tract where there is no colonization.

REFERENCES

- AHMAD, S., KHAN, Z., MUSTAFA, A.S., & KHAH, Z.U. (2002). Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with cultura, antigen detection, and biochemical methods or species identification. *J Clin Microbiol* 40, 2483-2489.
- ANDES, D., NETT, J., OSCHEL, P., ALBRECHT, R., MARCHILLO, K. & PITULA, A. (2004). Development and Characterization of an In Vivo Central Venous Catheter *Candida albicans* Biofilm Model. *Infect Immun* 72, 6023–6031.
- AULER, M.E., MORREIRA, D., RODRIGUES, F.F.O., ABRÃO, M.S., MARGARIDO, P.F.R., MATSUMOTO, F.E., SILVA, E.G., SILVA, B.C.M., SCHNEIDER, R.P. & PAULA, C.R. (2009). Biofilm formation on intrauterine devices in patients with recurrent vulvovaginal candidiasis. *Med Mycol* 7, 1-6.
- BARTH, T., BROSCHEIT, J., BUSSEN, S. & DIETL, J. (2002). Maternal sepsis and intrauterine fetal death resulting from *Candida tropicalis* chorioamnionitis in a woman with retained intrauterine contraceptive device. *Acta Obstet Gynecol Scand* 81, 981–982.
- CHANDRA, J., KUHN, D. M., MUKHERJEE, P. K., HOYER, L. L., McCORMICK, T. & GHANNOUM, M. A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug Resistance. *J Bacteriol* 183, 5385-5394.
- CHASSOT, F., NEGRI, M.F.N., SVIDZINSKI, A.E., GASPARETTO, A., PERALTA, R.M., SVIDZINSKI, T.I.E. & CONSOLARO, M.E.L. (2008). Can the intrauterine contraceptive devices to be a *Candida albicans* reservoir? *Contraception* 77, 355-359.
- CONSOLARO, M.E.L., ALBERTONI, T.A., YOSHIDA, C.S., MAZUCHELI, J., PERALTA, R.M. & SVIDZINSKI, T.I.E. (2004). Correlation of *Candida* species and

- symptoms among patients with vulvovaginal candidiasis in Maringá, Paraná, Brazil. *Rev Iberoam Micol* 21, 202–205.
- COSTERTON, J.W., STEWART, P.S. & GREENBERG, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318–1322.
- DARMSTADT, G.L., DINULOS, J.G. & MILLER, Z. (2000). Congenital cutaneous candidiasis: clinical presentation, pathogenesis, and management guidelines. *Pediatrics* 105, 438–444.
- DAVEY, M.E. & O'TOOLE, G.A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 847–867.
- DEMIREZEN, S., DIRLIK, O.O. & BEKSAC, M.S. (2005). The association of *Candida* infection with intrauterine contraceptive device. *Cent Eur J Public Health* 13, 32–34.
- DONLAN, R.M. (2001). Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis* 33, 1387–1392.
- DONLAN, R.M. & COSTERTON, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15, 167–193.
- DUGUID, H.L., PARRAT, D. & TRAYNOR, R. (1980). Actinomyces-like organisms in cervical smears from women using intrauterine contraceptive devices. *Brit Med J* 281, 534–536.
- EL-BADRAWI, H.H. & HAFEZ, E.S. (1981). Mechanism of action of IUDs: an ultrastructural view. *Contracept Deliv Syst* 2, 201–217.

- HORN, L.C., NENOFF, P., ZIEGERT, M. & HOCKEL, M. (2001). Missed abortion complicated by *Candida* infection in a woman with rested IUD. *Arch Gynecol Obstet* 264, 215–217.
- HSU, W.C., LEE, Y.H. & CHANG, D.Y. (2007). Tuboovarian Abscess Caused by *Candida* in a Woman with an Intrauterine Device. *Gynecol Obstet Invest* 64, 14–16.
- IRIE, M.M.T., CONSOLARO, M.E.L., GUEDES, T.A., DONATTI, L., PATUSSI, E.V. & SVIDZINSKI, T.I.E. (2006). A simplified technique for evaluating the adherence of yeasts to human vaginal epithelial cells. *J Clin Lab Anal* 20, 195-203.
- JARVELA, S. & ALLONEN, H. (1986). Copper-silver T: The classic T resuscitated. *Contracept Fertil Sex* 14, 45–47.
- KARNOVSKY, M.J. (1965). A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J Cell Biol* 27, 137-138.
- KOSONEN, A. (1980). Copper in the uterus. *Br J Sex Med* 7: 40–43.
- KURTZMAN, C.P. & FELL, F.W. (1998). *The yeast. A taxonomia study*. Amsterdam, NL: Elsevier, Inc.
- MARDH, P.A., RODRIGUES, A.G., GENC, M., NIVIKOVA, N., MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J. & GUASCHINO, S. (2002) Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis: a review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapy. *Int J STD AIDS* 13, 522-539.
- MUKHERJEE, P.K. & CHANDRA, J. (2004). *Candida* biofilm resistance. *Drug Resist Updat* 7, 301-309.

- MUKHERJEE, P.K., CHANDRA, J., KUHN, D. & GHANNOUM, M.A. (2003). Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect Immun* 71, 4333–4340.
- O'TOOLE, G., KAPLAN, H.B. & KOLTER, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 54, 49–79.
- PÁL,Z., URBÁN, E., DÓSA, E., PÁL, A. & NAGY, E. (2005). Biofilm formation on intrauterine devices in relation to duration of use. *J Med Microbiol* 54, 1199-1203.
- PAREWIJCK, W., CLAEYS, G., THIERY, M. & VAN KETS, H. (1988). Candidiasis in women fitted with an intrauterine contraceptive device. *Br J Obstet Gynaecol* 95, 408–410.
- PETERSON, H.B., XIA, Z., HUGHES, J.M., WILCOX, L.S., TYLOR, L.R. & TRUSSELL, J. (1996). The risk of pregnancy after tubal sterilization: findings from the US Collaborative Preview of Sterilization. *Am J Obstet Gynecol* 174, 1161–1170.
- SEGAL, D., GOHAR, J., HULEIHEL, M. & MAZOR, M. (2001). Fetal death associated with asymptomatic intrauterine *Candida albicans* infection and a retained intrauterine contraceptive device. *Scand J Infect Dis* 33, 77–78.
- SHIN, J.H., KEE, S.J., SHIN, M.G., KIM, S.H., SHIN, D.H., LEE, S.K., SUH, S.P. & RYANG, D.W. (2002). Biofilm production by isolates of *Candida* species recovered from nonneutropenic patients: comparison of bloodstream isolates with isolates from others sources. *J Clin Microbiol* 40, 1244-1256.
- SOBEL, J.D. (2007). Candidiasis vulvovaginal. *Lancet* 369, 1961-1971.

- SOPER, D.E. (1996). Genitourinary infections and sexually transmitted diseases. In *Novak's Gynecology*, Berek, J.S. (Ed), pp. 432–436. Baltimore: Williams & Williams.
- SOUZA, P.C., STORTI-FILHO, A., SOUZA, R.J., DAMKE, E., MELLO, I.C., PEREIRA, M.W., SVIDIZINSKI, T.I. & LOPES-CONSOLARO, M.E. (2009). Prevalence of *Candida* sp. in the cervical-vaginal cytology stained by Harris-Shorr. *Arch Gynecol Obstet* 279, 625-629.
- ZIPPER, J.A., TATUM, H.J., PASTANE, L., MEDEL, M. & RIVERA, M. (1969) Metallic copper as an intrauterine contraceptive adjunct to the “T” device. *Am J Obstet Gynecol* 105, 1274–1278.
- WALKER, J.T., BRADSHAW, D.J., BENNET, A.M. & FULFORD, M.R. (2000). Microbial biofilm formation and contamination of Dental-Init water systems in general dental practice. *Appl Environ Microbiol* 66, 3363–3367.

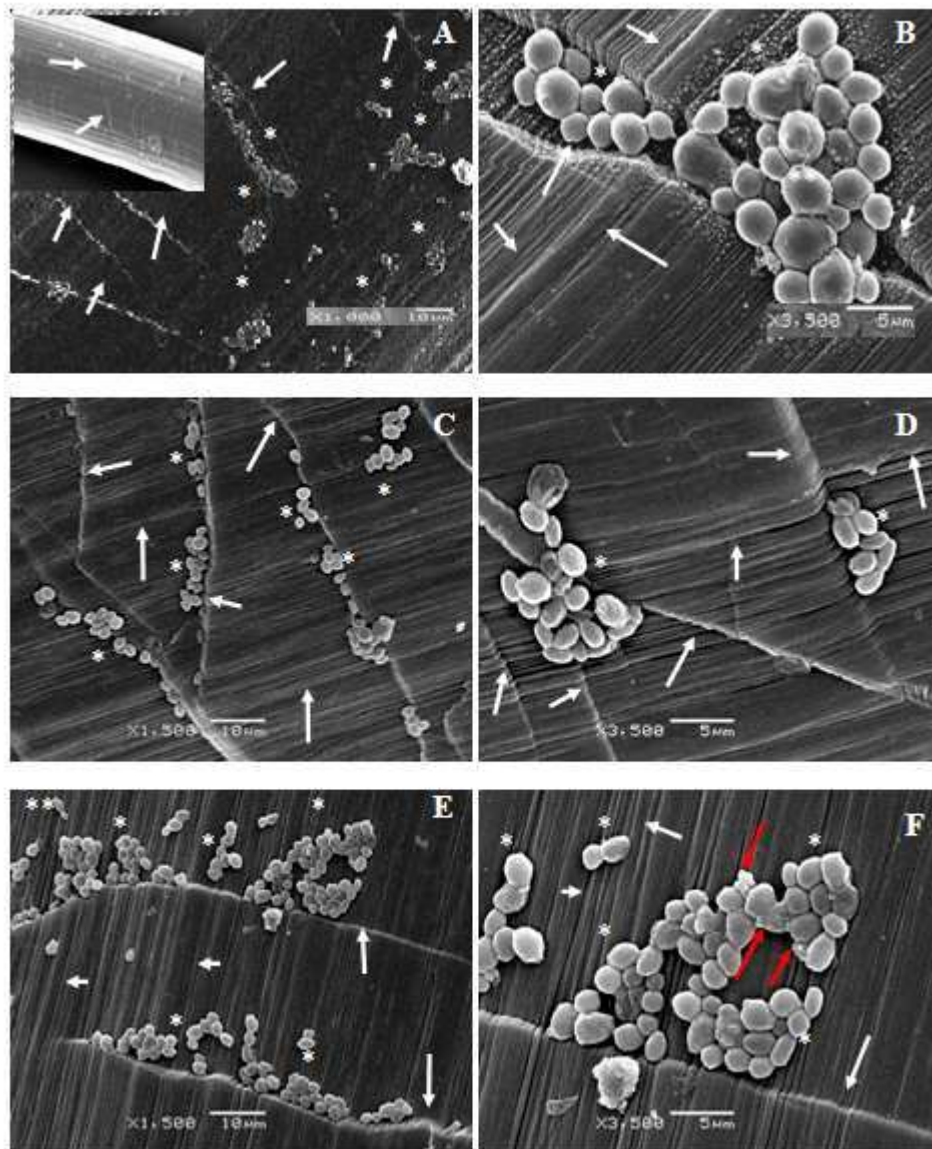


Figure 1. Scanning electron microscopy (SEM) showing vaginal yeasts adhered on the tail of an IUD after 48 h of contact. Several yeasts in blastoconidia form (*) can be seen closely attached to the surface irregularities of the IUD. Observe the very irregular surface of the IUD (white arrows) (A-F). (A, B) *Candida albicans* cells adhered on the IUD surface. (C, D) *Candida glabrata*. (E, F) *Candida guilliermondii*. (B) Details of the yeasts budding, also observed in lower magnification in E (**). (F) Matrix material of the biofilm near blastoconidia (red arrows). Scale bars: (A, C, E) 10 μm , (B, D, F) 5 μm .

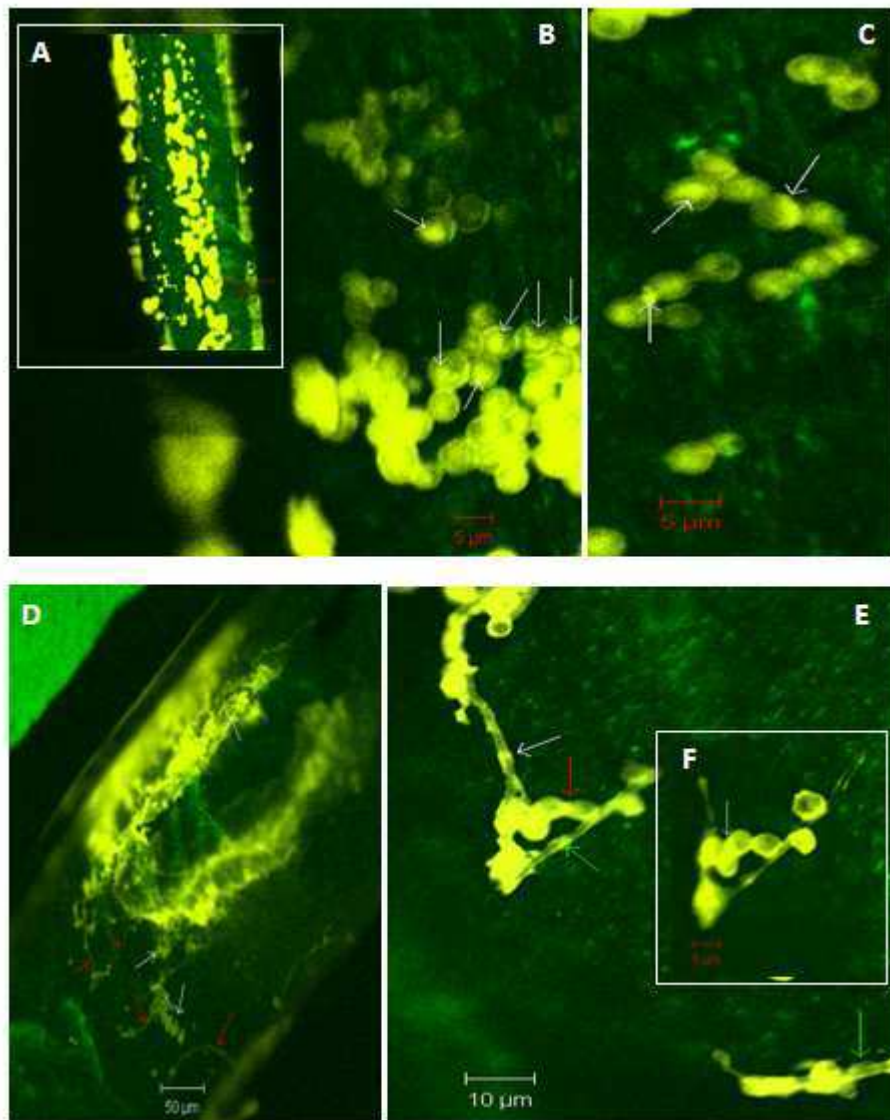


Figure 2. Confocal laser scanning microscopy (CSLM) of vaginal yeasts adhered on IUD tail, with both FUN-1 and ConA stains. Image capture was set for simultaneous observation of both green and red fluorescence, and yeast cells fluorescing yellow are metabolically active. **(A, B, C)** *C. albicans* adhered after 48 h of contact with IUD tail. **(A)** Yeast adhered in blastoconidia form. **(B, C)** More details of the yeast adherence. Metabolically active cells result in a shift from yellow fluorescence within intravacuolar structures (white arrows). **(D, E, F)** *C. albicans* adhered after 30 days on an IUD tail. **(D)** Yeast adhered in blastoconidia (white arrow) and hyphae-like forms (red arrows). **(E, F)** Greater detail of the IUD tails and *C. albicans* adherence. Metabolically active cells (yellow fluorescence) within intravacuolar

structures were observed in both blastoconidia (white arrows) and hyphae-like forms (green or red arrows). Scale bars (**A, B, C, F**) 5 μm , (**D**) 50 μm , (**E**) 10 μm .

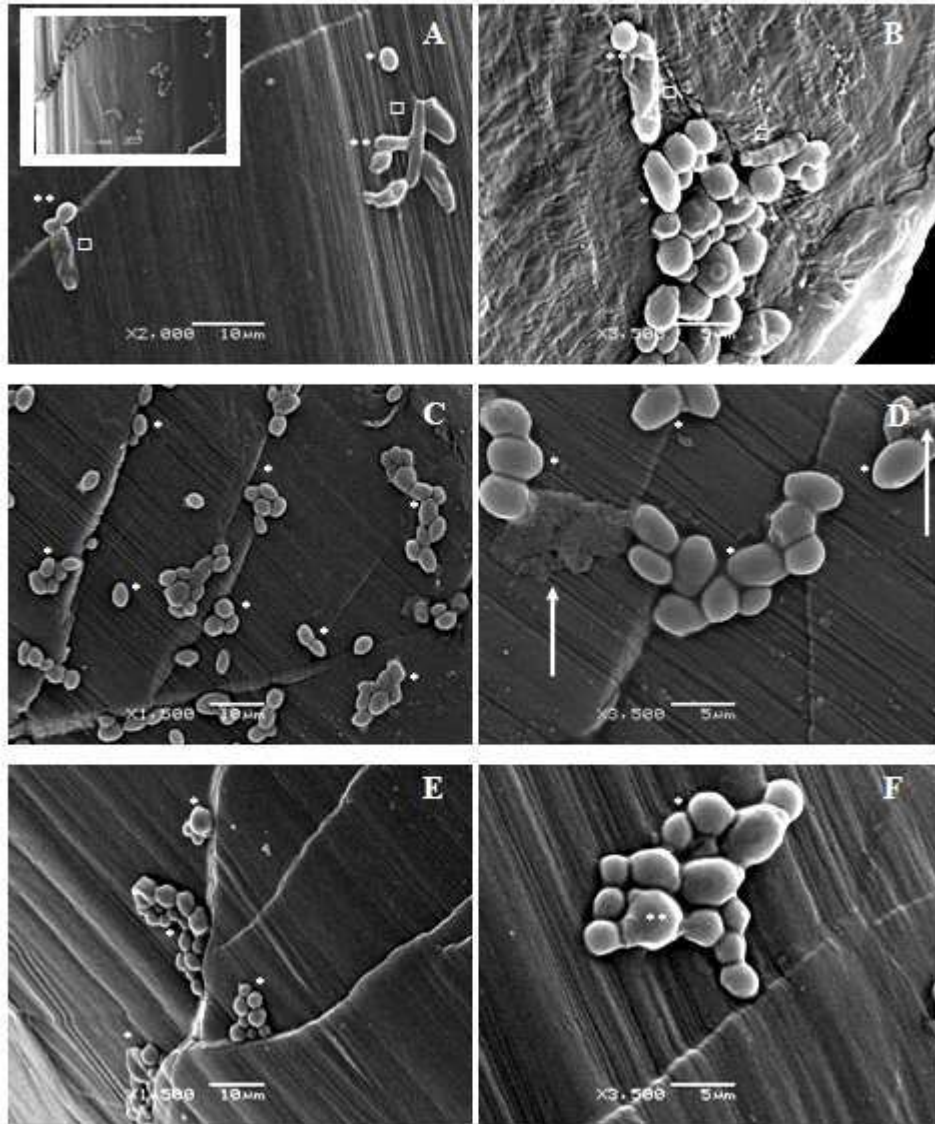


Figure 3. Scanning electron microscopy (SEM) showing vaginal yeasts adhered on the tail of an IUD after 48 h of contact. (A-F) Several yeasts in blastoconidia form can be seen intimately attached to the surface irregularities of the IUD tail. Observe the irregular surface of the IUD. (A, B) *C. parapsilosis* adhered in blastoconidia form and also in hyphae-like form (□). (C, D) *Candida tropicalis*. (E, F) *Saccharomyces cerevisiae*. (A, B, F) Details of the yeasts budding (**). (D) Matrix material of the biofilm close to the blastoconidia (white arrows). Scale bars: (A, C, E) 10 μm, (B, D, F) 5 μm.

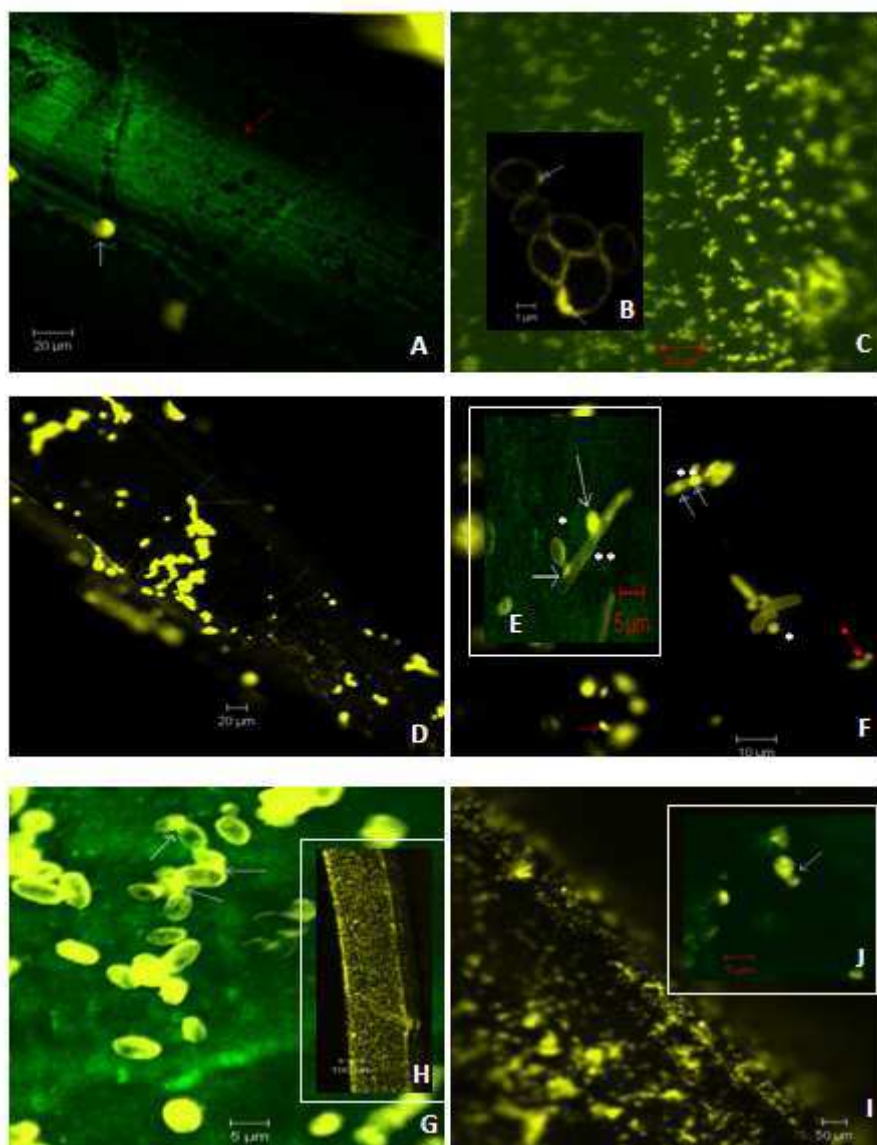


Figure 4. Confocal laser scanning microscopy (CSLM) of non-*albicans* species adhered on the IUD tail after 48 h of contact, and stained with both FUN-1 and ConA. Image capture was set for simultaneous observation of both green and red fluorescence, and yeast cells fluorescing yellow are metabolically active. (A, B, C) *C. glabrata* adhered in blastoconidia form (white arrow) to the IUD tail (red arrow). (B, C) This yeast adhered abundantly in the blastoconidia form. (B) Greater detail of metabolically active cells, resulting in a shift from yellow fluorescence within intravacuolar structures (white arrows). (D) *C. guilliermondii* adhered in blastoconidia form. (E, F) *C. parapsilosis* adhered in blastoconidia (*) and hyphae-like forms (**). (E) Greater detail of metabolically active cells, resulting in a shift

from yellow fluorescence within intravacuolar structures (white arrows). **(F)** Greater detail of the metabolically active cells (yellow fluorescence) within intravacuolar structures, as observed in both blastoconidia and hyphae-like forms (white arrows). *C. parapsilosis* budding cells (red arrows). **(G, H)** *C. tropicalis* adhered abundantly in blastoconidia form. **(I, J)** *S. cerevisiae* adhered abundantly in blastoconidia form. **(J)** Greater detail of the metabolically active cells (yellow fluorescence) observed in blastoconidia form (white arrow). Scale bars **(A, C, D)** 20 μm , **(B)** 1 μm , **(E, G, J)** 5 μm , **(F)** 10 μm , **(H)** 100 μm , **(I)** 50 μm .

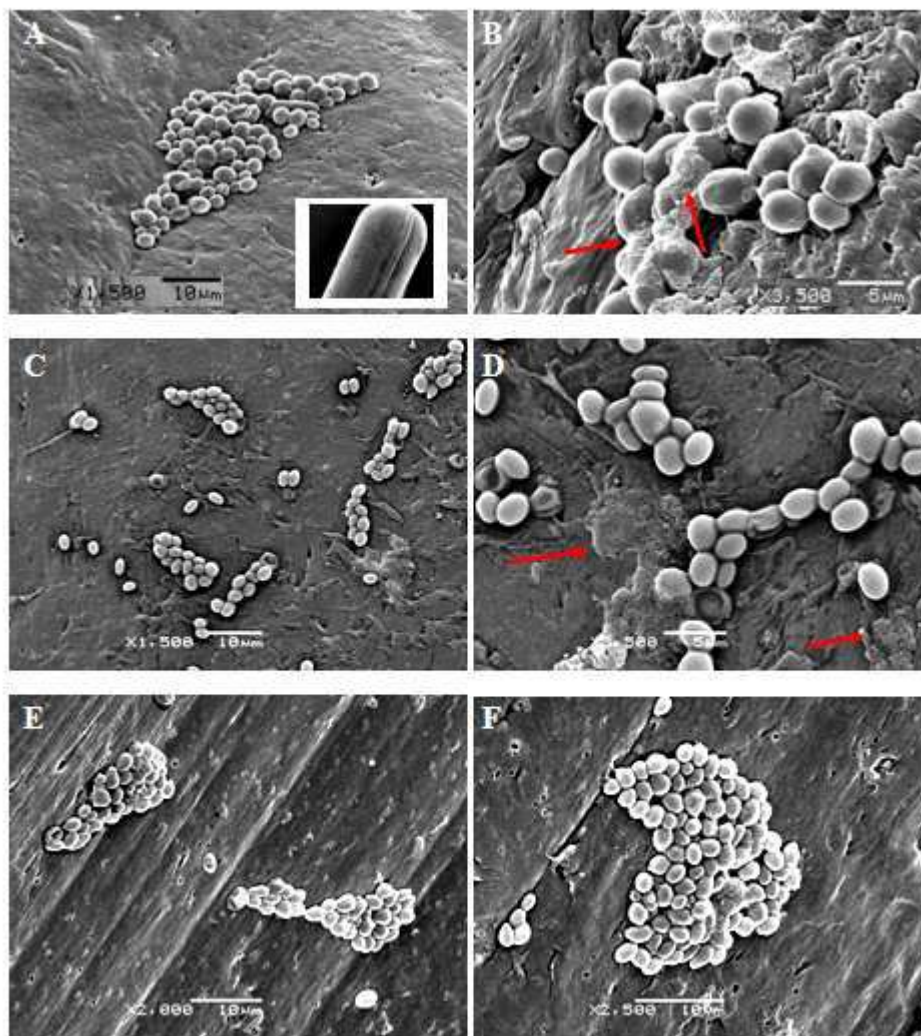


Figure 5. Scanning electron microscopy (SEM) showing yeasts adhered on an IUD part without copper, after 48 h of contact. Several yeasts aggregated in blastoconidia form can be seen perfectly and closely attached to the surface irregularities of this IUD part. **(A, B)** *C. albicans*. **(C, D)** *C. glabrata*. **(E, F)** *C. guilliermondii*. **(A-F)** Note also the irregular surface of the IUD part without copper. **(B)** Matrix material of the biofilm with embedded blastoconidia (red arrows). **(D)** Matrix material of the biofilm near the blastoconidia (red arrows). Scale bars: **(A, C, E, F)** 10 μm , **(B, D)** 5 μm .

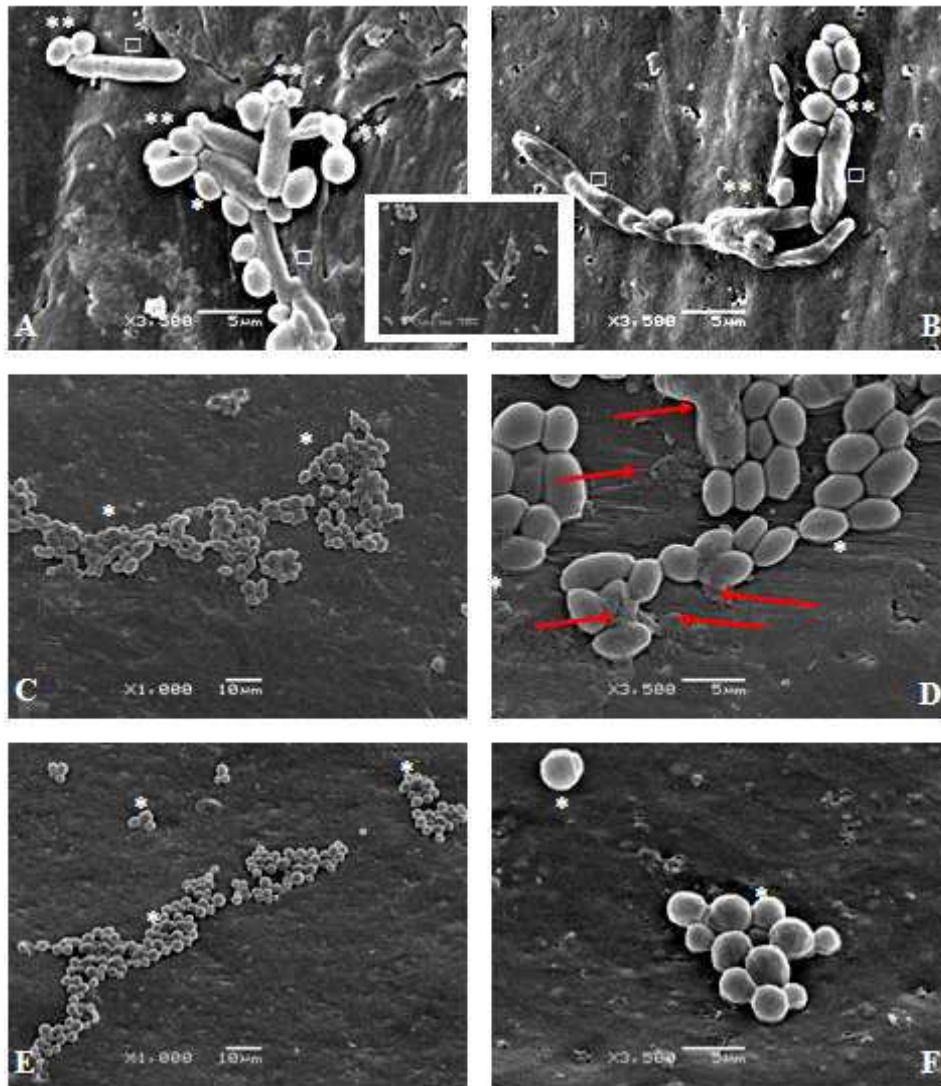


Figure 6. Scanning electron microscopy (SEM) showing yeasts adhered on an IUD part without copper, after 48 h of contact. Several yeasts aggregated in blastoconidia form can be seen perfectly and closely attached to the surface irregularities of the IUD without copper. (**A**, **B**) *C. parapsilosis* adhered in blastoconidia and also hyphae-like forms (□). (**C**, **D**) *C. tropicalis* and (**E**, **F**) *S. cerevisiae* adhered in blastoconidia form. (**A-F**) Very irregular surface of the IUD part without copper. (**A**, **B**) Details of the yeasts budding (**). (**D**) Matrix material of the biofilm near the blastoconidia (red arrows). Scale bars: (**C**, **E**) 10 μm , (**A**, **B**, **D**, **F**) 5 μm .

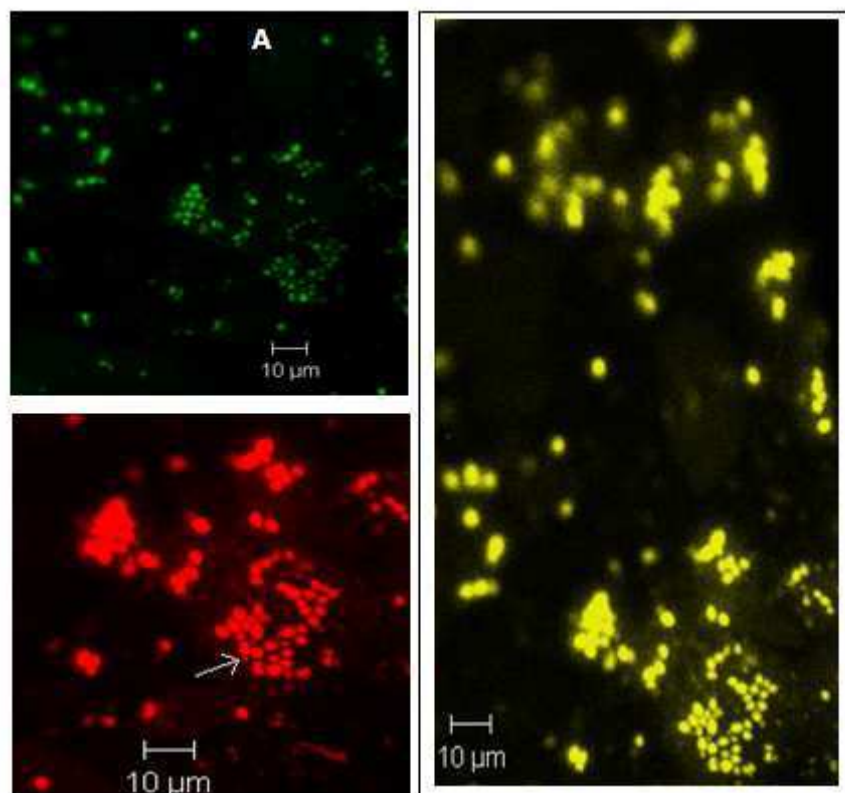


Figure 7. Confocal laser scanning microscopy (CSLM) of *Candida glabrata* adhered on pieces of the IUD without copper wire after 48 h of contact, and stained with both FUN-1 and ConA. **(A)** Image capture was set for observation in green fluorescence (ConA). **(B)** Image capture was set for observation in red fluorescence (FUN-1). **(C)** Image capture was set for simultaneous observation of both green and red fluorescence, and yeast cells fluorescing yellow are metabolically active. **(A, B, C)** *C. glabrata* adhered in blastoconidia form. Scale bars **(A, B, C)** 10 µm.

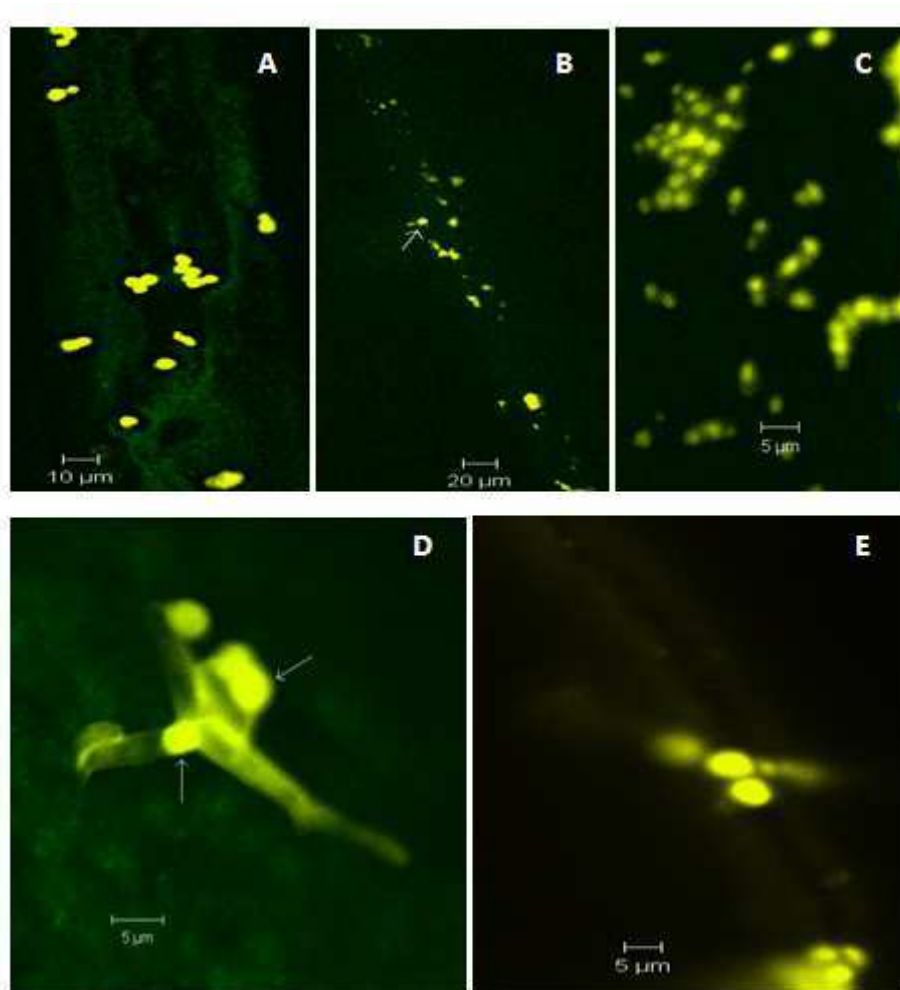


Figure 8. Confocal laser scanning microscopy (CSLM) of *Candida* spp. adhered on pieces of the IUD without copper wire, after 48 h of contact, stained with both FUN-1 and ConA. Image capture was set for simultaneous observation of both green and red fluorescence, and yeast cells fluorescing yellow are metabolically active. *C. albicans* (A), *C. guilliermondii* (B), *C. tropicalis* (C), and *S. cerevisiae* (E) adhered in blastoconidia form (white arrow). (D) *C. parapsilosis* adhered in blastoconidia and hyphae-like forms. Note metabolically active cells (yellow fluorescence) within intravacuolar structures in both blastoconidia and hyphae-like forms (white arrows). Scale bars (A) 10 µm, (B) 20 µm, (C, D, E) 5 µm.

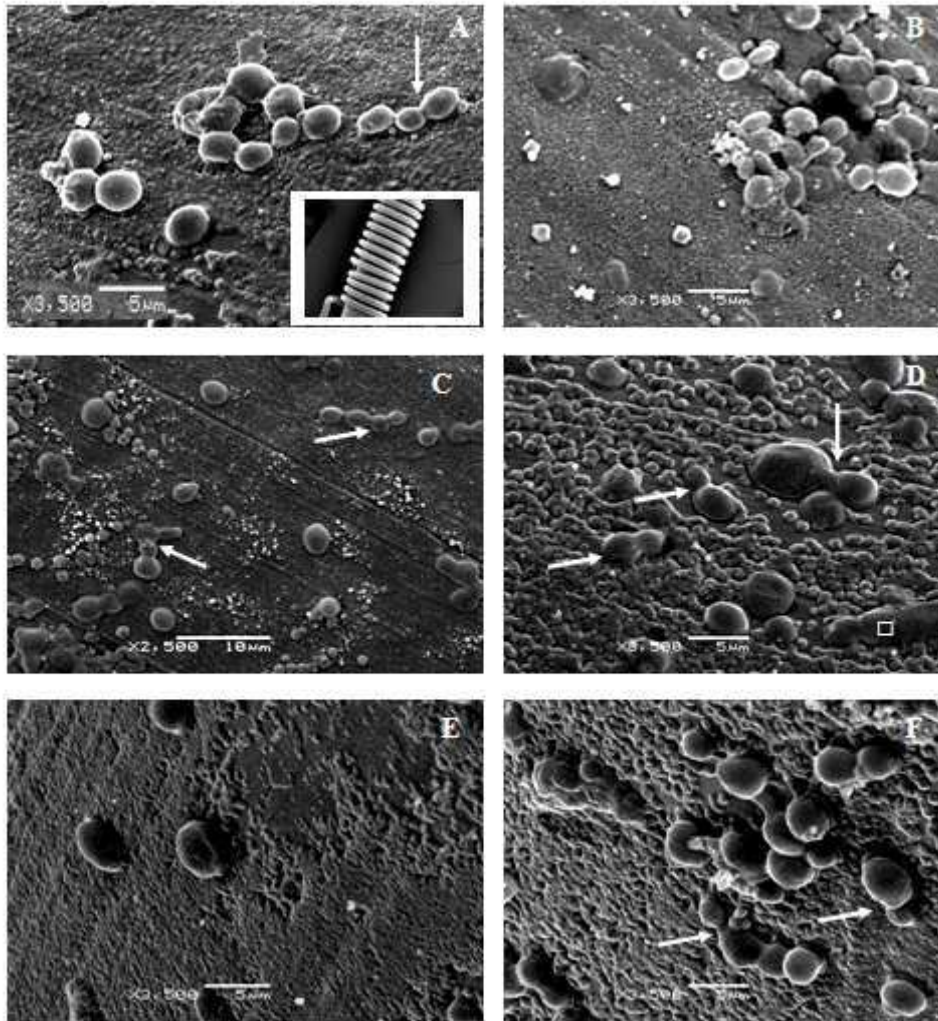


Figure 9. Scanning electron microscopy (SEM) showing copper-covered IUD part after 48 h of contact. (A- F) Copper-covered part of the IUD with various blastoconidia-form cells perfectly adhered. Surface with many artifacts. (A) *C. albicans*. (B) *C. glabrata*. (C) *C. guilliermondii*. (D) *C. parapsilosis*; only this yeast adhered in the blastoconidia form and also in the hyphae-like form (□). (E) *C. tropicalis*. (F) *S. cerevisiae*. (A, C, D, F) Details of the yeasts budding (white arrows). Scale bars: (A, B, D, E, F) 5 μm, (C) 10 μm.

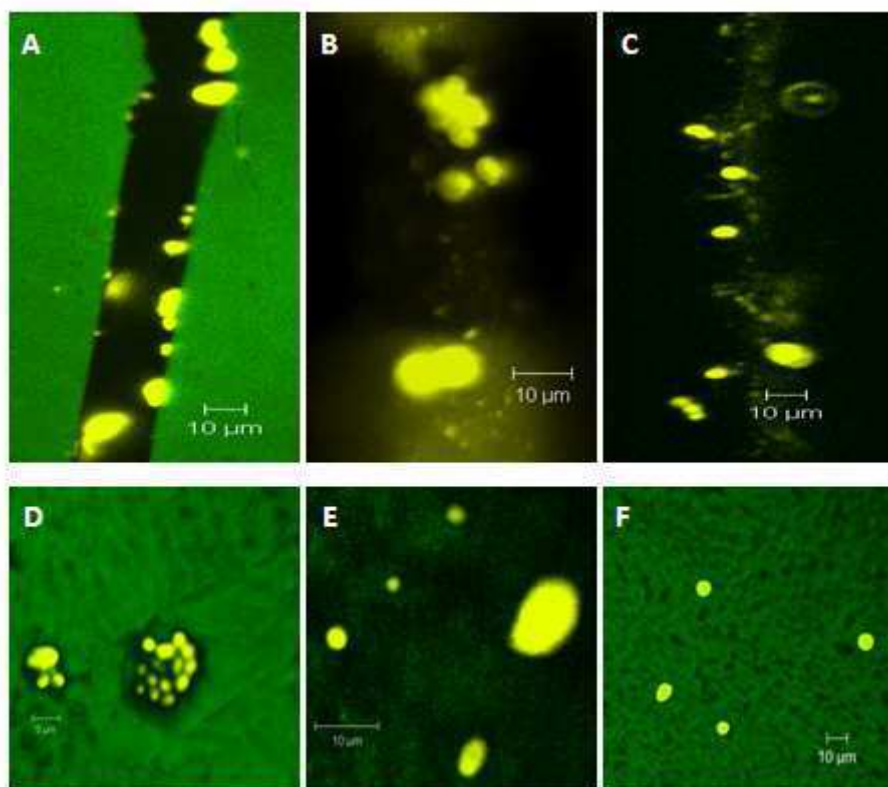


Figure 10. Confocal laser scanning microscopy (CSLM) of *Candida* species adhered on pieces of the IUD with copper wire after 48 h of the contact, stained with both FUN-1 and ConA stains. Image capture was set for simultaneous observation of both green and red fluorescence, and yeast cells fluorescing yellow are metabolically active. **(A)** *C. albicans*. **(B)** *C. glabrata*. **(C)** *C. guilliermondii*. **(D)** *C. parapsilosis*. **(E)** *C. tropicalis*. **(F)** *S. cerevisiae*. All yeasts adhered in blastoconidia form. Scale bars **(A, B, C, E, F)** 10 μm , **(D)** 5 μm .

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

1. Este trabalho foi um dos primeiros a realizar um estudo mais detalhado sobre a imagem da ultraestrutura e viabilidade da adesão de *C. albicans* e espécies não-*albicans*, isoladas de pacientes com CVV, em DIU.
2. Todas as células leveduriformes vaginais avaliadas neste estudo aderiram às três partes distintas do DIU (fio, parte sem cobre e parte recoberta por cobre). A adesão foi comprovada pelo emprego de MEV e MCVL, que demonstraram aspectos da adesão e viabilidade das leveduras, após 48 h de contato, além de 30 dias para *C. albicans*.
3. A MEV evidenciou a superfície irregular do DIU, o que poderia contribuir com o processo de adesão das células fúngicas ao dispositivo médico.
4. A MCVL demonstrou leveduras em brotamento, que conferem viabilidade das células, bem como, o processo de germinação da *C. albicans*, observada através da presença de pseudo-hifas, quando em contato com o dispositivo por 30 dias.
5. Os íons Cu^{2+} que possuem ação antibacteriana e antifúngica não mostraram atividade frente às leveduras testadas, fato este demonstrado pela adesão das mesmas na parte do DIU recoberta pelo filamento de cobre.
6. Além de todas as partes do DIU contribuírem para a retenção das leveduras no trato genital, a elevada concentração de leveduras presentes na cauda do mesmo poderia indicar a importância deste segmento para a manutenção da colonização de células fúngicas, uma vez que a cauda faz uma ponte entre o ambiente externo e o trato genital superior, onde não há colonização.

7. Os resultados obtidos apontam fortes evidências de que a aderência das leveduras avaliadas ao DIU poderia facilitar o desenvolvimento de CVV, e especialmente de CVVR nas usuárias deste método contraceptivo susceptíveis à patologia.

PERPECTIVAS FUTURAS

- Realizar novos estudos *in vitro* com outras leveduras vaginais passíveis de causar CVV;
- Realizar estudos com pacientes usuárias de DIU, com intuito de avaliar o dispositivo após sua retirada, bem como aspectos referentes ao histórico prévio de CVV e outros fatores de risco para a doença;
- Realizar estudos para verificação do padrão de resistência aos antifúngicos de leveduras extraídas de DIUs removidos;
- Realizar estudos *in vitro* com dispositivos intrauterinos que liberam hormônios contraceptivos.